

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Možnosti využití proteinů klíčtčích slin
v humánní medicíně**

Bakalářská práce

Anna Kovařiková

Školitel: Prof. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

České Budějovice 2019

Kovaříková, A., 2019: Možnosti využití proteinů klíštěcích slin v humánní medicíně. [The use of tick salivary proteins as new therapeutics, BSc. Thesis, in Czech] - 51 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This bachelor thesis discusses tick salivary proteins with antihemostatic and immunomodulatory properties. The thesis describes a mechanism of action of such molecules and provides a survey of molecules that have been studied in animal models of human diseases. In the last chapter, the topic of non-human therapeutics and their potential issues is evaluated.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně 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 jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdání 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.

České Budějovice

.....

Anna Kovaříková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli prof. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za zadání skvělého tématu, poskytnutí mnoha příležitostí a ochotu se mnou kdykoliv vše prodiskutovat a odpovědět na mé dotazy. Dále bych ráda poděkovala své rodině a blízkým za podporu během celé doby studia a panu inženýru Antalovi mimo jiné za pomoc s tvorbou diagramů.

OBSAH

1	Cíle práce.....	1
2	Úvod.....	1
3	Klíšťata.....	2
3.1	Rozdělení.....	2
3.2	Získávání potravy.....	2
3.3	Funkce klíštěcích slin.....	3
4	Hemostáza.....	4
4.1	Princip hemostázy.....	4
4.2	Vliv klíštěcích slin na hemostázu.....	4
4.2.1	Vliv klíštěcích slin na vazokonstrikci.....	5
4.2.2	Vliv klíštěcích slin na koagulační kaskádu.....	5
4.2.3	Vliv klíštěcích slin na shlukování krevních destiček.....	6
5	Imunitní systém.....	8
5.1	Princip imunitního systému.....	8
5.2	Vliv klíštěcích slin na imunitní systém hostitele.....	8
5.2.1.1	Vliv klíštěcích slin na přirozenou imunitní odpověď.....	10
5.2.1.1.1	Vliv klíštěcích slin na komplementový systém.....	10
5.2.1.1.2	Vliv klíštěcích slin na zánětlivý proces.....	10
5.2.1.2	Vliv klíštěcích slin na získanou imunitní odpověď.....	12
6	Klíštěcí molekuly s potenciálem využití v humánní medicíně.....	15
6.1	Evasiny.....	15
6.1.1	Struktura a funkce chemokinů.....	15
6.1.2	Evasin-1.....	16
6.1.3	Evasin-3.....	17
6.1.4	Evasin-4.....	18
6.2	OmCI.....	19

6.3	Proteiny vázající histamin	21
6.4	Salp15	23
6.5	Sialostatin L.....	24
6.6	Ixolaris	26
6.7	Amblyomin-X.....	28
6.8	IAFGP.....	31
7	Diskuze	33
8	Závěr.....	37
9	Seznam internetových zdrojů	38
10	Seznam použité literatury	39

1 CÍLE PRÁCE

- Přehled molekul klíštěcích slin s antihemostatickými nebo imunomodulačními účinky.
- Využití klíštěcích proteinů k léčbě lidských chorob – testování na zvířecích modelech.
- Posouzení možnosti využitelnosti proteinů klíštěcích slin k léčbě konkrétních lidských onemocnění (alergie, autoimunity, poruchy hemostázy).

2 ÚVOD

Pro svůj vývoj a reprodukci potřebují klíšťata krev získanou přísátím na hostitele. Standardně by hostitel na poškození kůže a přítomnost sajícího klíštěte reagoval spuštěním mechanismů vedoucích k vypuzení klíštěte a zhojení rány. Mezi tyto mechanismy patří například tvorba krevní zátky, aktivace koagulační kaskády, vazokonstrikce a zánětlivé procesy. Během miliony let trvající koevoluce hostitele a parazita si však klíšťata vyvinula molekuly potřebné k překonání imunitní odpovědi hostitele. Prostřednictvím velkého počtu biologicky aktivních protizánětlivých, antikoagulačních a vasodilatačních molekul bylo klíšťatům umožněno sání dokončit a pokračovat tak ve svém životním cyklu (Kazimírová and Štibrániová, 2013).

Od 80. let 20. století probíhají intenzivní studie zkoumající aktivitu, vlastnosti a mechanismus působení bioaktivních komponent klíštěcích slin (Kazimírová, 2008). Jedním z hlavních cílů těchto studií bylo detailněji prozkoumat úlohu slin v přenosu patogenů.

Po objasnění účinku molekul klíštěcích slin na hemostázu, zánětlivé reakce a další děje imunitního systému došlo ke zkoumání jejich využitelnosti v humánní medicíně, neboť právě takové procesy jsou podkladem mnoha patologických jevů. Na základě výsledků studií bylo nalezeno hned několik látek, které by skutečně mohly znamenat naději pro vývoj nových terapeutických prostředků. Mezi takové molekuly a zároveň i ty, kterým se bude věnovat tato práce, patří evasiny, histamin vázající proteiny, Sialostatin L, Ixolaris, Amblyomin-X, Salp15, rEV576 a IAFGP.

Idea toho, že klíšťata nejsou jen patogeny přenášející škodliví parazité, ale mohou fungovat i jako zdroj nových farmaceutik, představuje v lékařském světě významný objev. Z důvodu častých vedlejších účinků, kontraindikací současných léků a masivního rozvoje rezistence k antibiotikům, totiž potřeba nových léčiv neustále stoupá.

3 KLÍŠŤATA

3.1 ROZDĚLENÍ

Klíšťatovci jsou řád patřící do podtřídy roztočů, třídy pavoukoců, podkmene klepítkačů, kmene členovců. Tento řád je rozdělený do třech hlavních čeledí – *Ixodidae* (klíšťatovití, tvrdá klíšťata), *Argasidae* (klíšťákovití, měkká klíšťata) a *Nuttalliellidae* (Anderson and Magnarelli, 2008).

Do největší čeledi *Ixodidae* (702 druhů) patří rody klíšťat jako *Amblyomma*, *Ixodes*, *Rhipicephalus* a další. V případě čeledi *Argasidae* pak například rody *Ornithodoros* a *Argos*. Čeleď *Nuttalliellidae* se skládá pouze z jednoho rodu *Nuttalliella* (Guglielmone et al., 2010; Hoogstraal and Aeschlimann, 1982). Celkem bylo popsáno 896 druhů klíšťat (Guglielmone et al., 2010).

Název tvrdá a měkká klíšťata vychází ze skutečnosti, že u klíšťatovitých (*Ixodidae*) je přítomen dorsální štít, který u klíšťákovitých (*Argasidae*) chybí. Tvrdá klíšťata se vyskytují v zalesněných a zaplevelených oblastech, kde žijí jeleni, dobytek, psi, drobní savci a ostatní hostitelé. Vyžadují vlhká a chladná prostředí. Měkká klíšťata naopak obývají zvířecí nory, doupata, chátrající lidská stavení a dobře prospívají i v teplých a suchých podmínkách. Čeleď *Nuttalliellidae* je malá a málo prozkoumaná, má kombinaci vlastností tvrdých i měkkých klíšťat (Anderson and Magnarelli, 2008).

3.2 ZÍSKÁVÁNÍ POTRAVY

Na rozdíl od ostatních krev sajících členovců získávají klíšťata hostitelovu krev po delší dobu. Poté, co se klíštěti podaří zakotvit se pomocí hypotosomu v kůži hostitele, krev z poškozených cév začne proudit do místa poranění a vytvoří tak zásobárnu (Sonenshine, 2014).

Zástupci čeledi *Argasidae* jsou s konzumací krve hotovi v rámci minut, maximálně hodin. Jejich hmotnost se zvýší až desetinásobně. Během krmení nebo krátce po jeho dokončení vylučuje klíště vodu koxálními žlázami, a tím koncentruje přijatou potravu. Následně se přeplněné klíště odloučí a najde si bezpečné útočiště, kde může získanou potravu strávit (Sonenshine, 2014).

Klíšťata z čeledi *Ixodidae* vylučují ze svých slinných žláz cement, který postupně tvrdne a dovolí tak pevnější připevnění k hostiteli. To umožňuje této čeledi sát krev až po dobu několika týdnů. Sají pomalu a vytvářejí si novou kutikulu, díky které dokáží do těla vměstnat enormní množství krve (Sonenshine, 2014). Čeledi *Ixodidae* se v průběhu krmení zvyšuje

hmotnost až 200x. Potrava je zkoncentrována vyměšováním přebytečné vody slinnými žlázami zpět do hostitele (Binnington and Kemp, 1980).

3.3 FUNKCE KLÍŠTĚCÍCH SLIN

Klíštěcí slinné žlázy vylučují směs, která plní řadu funkcí během parazitující i neparazitující fáze. Mimo to, že má během krmení vliv na imunitní systém hostitele, také upevňuje klíště ke kůži hostitele pomocí sekrece cementu. Mezi další funkce klíštěcích slin patří také vylučování přebytečné vody a iontů, sekrece hygroskopického roztoku, který je uložen v oblasti sacího ústrojí klíštěte a hydratuje ho během jeho neparazitující fáze, nebo usnadňování přenosu patogenů do hostitele. Dále také slinné žlázy produkují sekret, který lubrikuje spermatofor při jeho přenosu do samice v průběhu kopulace (Izabel et al., 2011).

4 HEMOSTÁZA

4.1 PRINCIP HEMOSTÁZY

Hemostáza je velice sofistikovaný proces, který zahrnuje hned několik cest, které ale nejsou přesně oddělené, přizpůsobených k zabránění nadbytečných ztrát krve. Mezi takovéto cesty patří vazokonstrikce, koagulační kaskáda a shlukování krevních destiček. Společně tyto složky vedou k zástavě krvácení v místě cévního poškození. Jsou aktivované různými cestami.

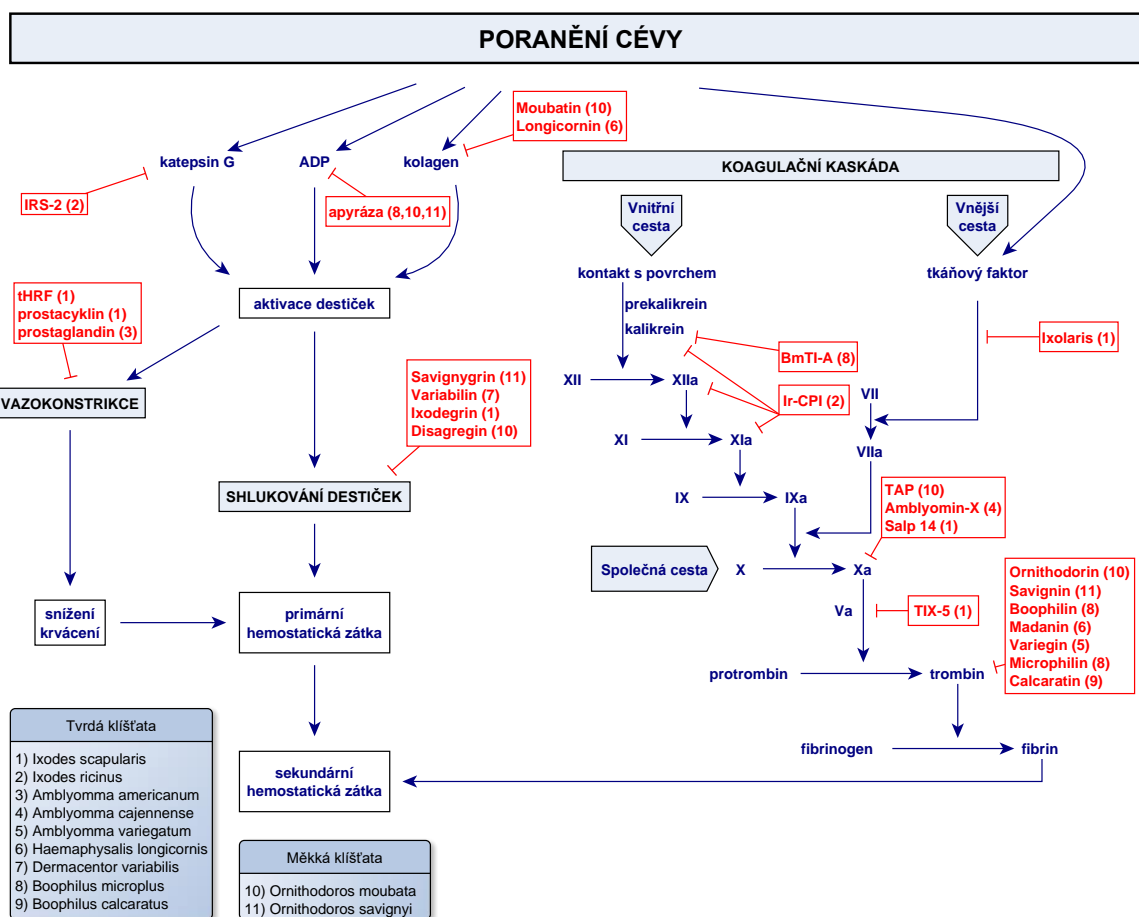
Prvním mechanismem hemostatické odpovědi je vazokonstrikce. Na počátku tohoto děje stojí aktivace krevních destiček, která probíhá prostřednictvím mnoha faktorů, jako je například obnažený kolagen, trombin, katepsin G nebo ADP uvolněný z poškozených buněk. Takto aktivované destičky poté vylučují látky (např. serotonin, tromboxan A₂), které iniciují samotnou vazokonstrikci. Látky s podobnou funkcí vylučuje také endotelium (v jeho případě se jedná o endotelin) nebo žírné buňky (leukotrieny) (Chmelař et al., 2012).

Koagulační kaskáda zahrnuje sérii enzymatických reakcí, kde je inaktivní proenzym přeměněn do aktivní formy, která následně kaskádovitě aktivuje proenzym následující. Kaskáda může být aktivovaná vnější nebo vnitřní cestou, ty se následně spojí do cesty společné. Vnější cesta začíná poraněním cévy a zformováním komplexu tkáňového faktoru s aktivovaným faktorem VII. Vnitřní cesta koagulace započíná aktivací faktoru XII kontaktem s negativně nabitým povrchem. Na konci společné cesty je fibrinogen přeměněn na fibrin prostřednictvím trombinu.

Agregace krevních destiček nastupuje bezprostředně po cévním zranění. Destičky přilnou k subendoteliální tkáni a aktivují se výše zmíněnými látkami, které se navážou na receptory na povrchu destiček. To vede k řetězci chemických reakcí, jichž výsledkem je agregace destiček a vytvoření primární hemostatické zátky, která je následně vyztužena fibrinem vzniklým koagulační kaskádou.

4.2 VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA HEMOSTÁZU

Aby klíště získalo potravu sáním na hostiteli, musí obelstít jeho hemostatický systém, který by za normálních okolností vedl k zacelení rány a tím pádem k přerušení sání klíštěte. Proto si klíšťata vyvinula řadu antikoagulant, vazodilatant a látek zamezujících agregaci krevních destiček (Andrade et al., 2005). Schéma mechanismu účinku včetně klíštěcích druhů, z kterých byly takové látky izolovány, je znázorněn v Obr. 1.



Obr. 1: Inhibice drah hemostázy molekulami izolovanými z klíštěcích slin.

Zdroj: vlastní zpracování

4.2.1 Vliv klíštěcích slin na vazokonstrikci

Aktivované krevní destičky vylučují kyselinu arachidonovou, která je následně přeměněna na tromboxan A₂. Ten je spolu se serotoninem zodpovědný za vazokonstrikci (Kazimírová and Štibrániová, 2013). Mezi látky s vazodilatačním účinkem, které byly izolované z klíštěcích slin, patří například prostacyklin získaný ze slin druhu *Ixodes scapularis* (= *Ixodes dammini*) (Ribeiro et al., 1988), prostaglandiny (Bowman et al., 1995), histamin uvolňující faktor (tHRF) (Dai et al., 2010) a serinový proteázový inhibitor IRS-2 (*I. ricinus* serpin), který inhibuje činnost katepsinu G (Chmelař et al., 2011).

4.2.2 Vliv klíštěcích slin na koagulační kaskádu

Klíštěcí sliny obsahují skupinu molekul inhibujících trombin. Jsou jimi Ornithodorin (van de Locht et al., 1996), Savignin (Nienaber et al., 1999), Boophilin (Macedo-Ribeiro et al., 2008), Variegin (Koh et al., 2007), Madanin-1, Madanin-2 (Iwanaga et al., 2003), Microphilin (Ciprandi et al., 2006) a Calcaratin (Motoyashiki et al., 2003).

Druhým nejčastějším faktorem koagulační kaskády, na který se zaměřují molekuly klíštěcích slin, je faktor X, který společně s faktorem V tvoří aktivátor protrombinu. Antikoagulační peptid TAP (tick anticoagulant peptide) ze slin měkkého klíštěte *Ornithodoros moubata* je zatím nejintenzivněji studovaným klíštěcím antikoagulantem. TAP je vysoce specifickým inhibítozem aktivovaného faktoru X (= FXa) (Waxman et al., 1990). Za další inhibitory FXa označujeme například proteiny Amblyomin-X (Batista et al., 2010) a Salp14 (Narasimhan et al., 2002). Charakterizovány byly také vlastnosti proteinu dříve nazývaného P23, jenž oddaluje aktivaci koagulačního systému pomocí specifického zabránění aktivace faktoru V prostřednictvím aktivovaného faktoru X. Proto byl protein přejmenován na TIX-5 (tick inhibitor of factor Xa toward factor V) (Schuijt et al., 2013).

Protein Ixolaris inhibuje komplex tkáňového faktoru s aktivovaným faktorem VII (TF-VIIa), čímž zabraňuje aktivaci faktoru X (Francischetti et al., 2002).

Vnitřní cesta koagulace je navázána na systém kalikrein-kinin. Faktor XIIa katalyzuje přeměnu prekalikreinu na kalikrein, ten zpětně napomáhá přeměně neaktivovaného faktoru XII na aktivovaný. Právě kalikrein je inhibován trypsinovým inhibítozem BmTI-A izolovaným ze slin *Boophilus microplus* (Tanaka et al., 1999). Dalším inhibítozem aktivace vnitřní cesty koagulace je Ir-CPI (coagulation contact phase inhibitor from *I. ricinus*), který specificky interaguje s aktivovaným faktorem XII, XI a kalikreinem (Decrem et al., 2009).

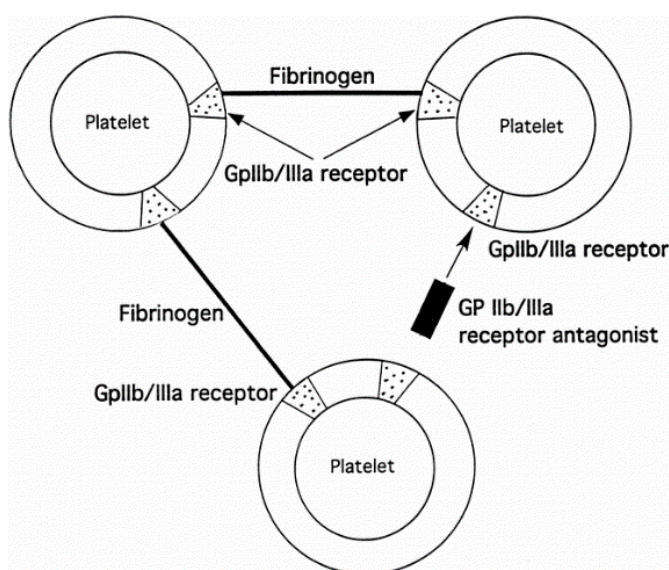
4.2.3 Vliv klíštěcích slin na shlukování krevních destiček

Klíštěcí sliny dokážou inhibovat agregaci destiček několika způsoby. Strategie, kterou volí několik druhů klíšťat (např. *Boophilus microplus* (Liyou et al., 1999), *Ornithodoros moubata* (Ribeiro et al., 1991), *Ornithodoros savignyi* (Mans et al., 1998)), je cílení na ADP – aktivátor destiček - prostřednictvím apyrázy. Apyráza je enzym hydrolyzující fosfodiesterovou vazbu v ATP a ADP, čímž z těchto aktivních komponent vzniká neaktivní AMP.

Agregaci destiček pomocí kolagenu inhibuje protein s názvem Moubatin (Keller et al., 1993), stejným mechanismem účinkuje i inhibítozem Longicornin (Cheng et al., 1999).

Hlavní adhezivní molekulou účastnící se shlukování trombocytů je membránový protein GP IIb/IIIa komplex (receptor fibrinogenu). Jedná se o integrinový receptor prezentovaný ve vysoké hustotě v granulích destiček. Za klidových podmínek se vyskytuje v inaktivní formě, až aktivace destiček umožňuje vazbu tohoto komplexu na v plazmě rozpuštěný fibrinogen nebo von Willebrand faktor přes svůj RGD (arginin – glycin – aspartát) motiv. Vazba představuje můstek mezi dvěma GP IIb/IIIa molekulami přilehlých destiček

(Rumbaut and Thiagarajan, 2010). Znázornění vazeb této molekuly je ukázáno v Obr. 2. Velká část klíšťat si vyvinula látky obsahující RGD motiv, které tak fungují jako disintegriny, neboť nahrazují fibrinogen v místě vazby a představují GP IIb/IIIa antagonisty (Kazimírová and Štibrániová, 2013). Disintegriny Savignygrin (Mans et al., 2002) a Variabilin (Wang et al., 1996) obsahují RGD motiv a inhibují agregaci trombocytů zabraňováním ostatním ligandům ve vazbě na GP IIb/IIIa. Podobným proteinem je i například Ixodegrin (Francischetti et al., 2005). Protein Disagregin neobsahuje RGD motiv, ale přesto funguje jako antagonist receptoru fibrinogenu (Karczewski et al., 1994).



Obr. 2: Schématické znázornění mechanismu GP IIb/IIIa antagonistů¹.

5 IMUNITNÍ SYSTÉM

5.1 PRINCIP IMUNITNÍHO SYSTÉMU

Imunitní systém můžeme rozdělit na přirozenou (nespecifickou) a adaptivní (specifickou) imunitu.

Přirozená imunita zahrnuje všechny typy odpovědi, které postrádají paměť. To je komplementový systém, anatomické bariéry, fagocytóza a zánět. Takovýchto procesů se účastní proteiny akutní fáze, granulocyty, žírné buňky, dendritické buňky, makrofágy a NK buňky. K rekrutaci zánětlivých buněk do místa narušeného parazitem přispívají složky komplementu, prostaglandiny a leukotrieny (Andrade et al., 2005).

Získaná imunitní odpověď je spuštěna v okamžiku, kdy aktivované antigen prezentující buňky namigrují do lymfatických uzlin, kde prezentují antigeny T-lymfocytům, jenž hrají hlavní roli v buněčné imunitní odpovědi v místě infekce nebo asistují při aktivaci B-lymfocytů a vytváření antigen-specifické humorální odpovědi (Kazimírová, 2008). Antigeny ve slinách krev sajících členovců jsou zpracovány a prezentovány imunokompetentním lymfocytům převážně Langerhansovými buňkami přítomnými v kůži (Andrade et al., 2005).

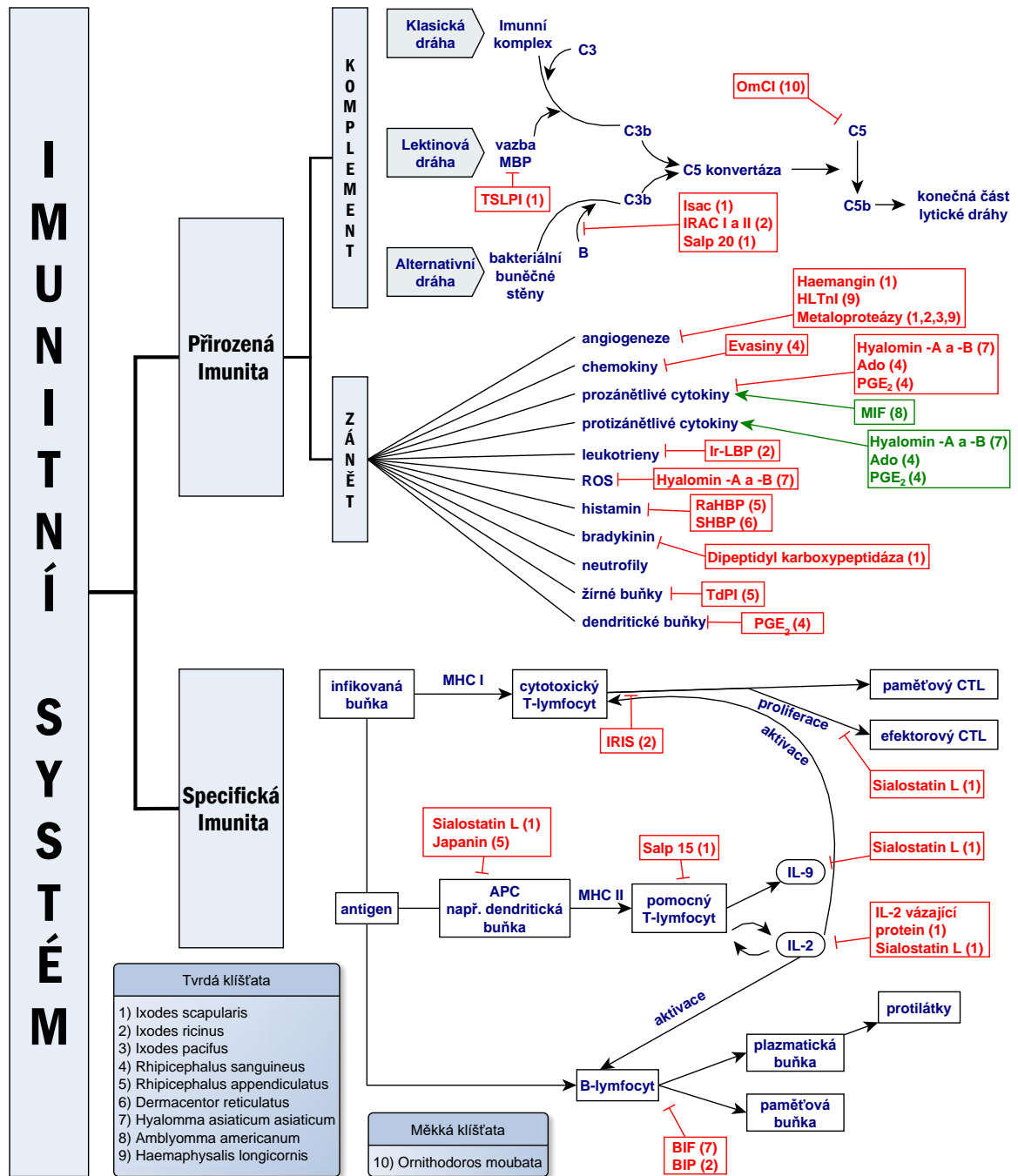
5.2 VLIV KLÍŠTĚCÍCH SLIN NA IMUNITNÍ SYSTÉM HOSTITELE

Složky klíštěcích slin umí modulovat jak přirozenou, tak i získanou imunitu hostitele, aby ochránily prisáté klíště před zánětlivou reakcí a imunitní odpovědí, která by mohla vést k přerušení jeho sání a následnému odpadnutí. Molekulární interakce mezi klíštětem a hostitelem je považovaná za jakousi soutěž mezi obrannými schopnostmi hostitele a snahami ektoparazita těmto schopnostem uniknout (Kazimírová, 2008).

Většina imunomodulačních molekul izolovaných z klíštěcích slin působí přímo či nepřímo na imunitní efektorové buňky jako například makrofágy, T-lymfocyty, B-lymfocyty, NK buňky a granulocyty (Andrade et al., 2005).

Je známo, že opakované vystavení extraktu z klíštěcích slin způsobuje potlačení produkce a sekrece cytokinů ze skupiny Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ), zatímco produkce Th2 cytokinů (např. IL-4, IL-10, IL-13) se zvyšuje. Jelikož Th2 cytokiny působí protizánětlivě, upřednostnění tohoto typu imunitní odpovědi má pozitivní význam pro přežití klíštěte, a navíc tím dochází k usnadnění přenosu patogenů. Suprese aktivity Th1 subpopulace lymfocytů inhibuje expanzi antigen specifických T-lymfocytů, aktivaci makrofágů a aktivitu NK buněk (Kazimírová and Štibrániová, 2013).

Schéma mechanismu účinku včetně druhů klíšťat, z kterých byly takové látky izolovány, je znázorněno v Obr. 3.



Obr. 3: Inhibice drah imunitního systému molekulami izolovanými z klíštěcích slin.

Zdroj: vlastní zpracování

5.2.1.1 Vliv klíčtčích slin na přirozenou imunitní odpověď

5.2.1.1.1 Vliv klíčtčích slin na komplementový systém

Aktivace komplementového systému zahrnuje sekvenční enzymatickou kaskádu, při které je část maskující aktivní místo enzymaticky odštěpena a proenzym se tím stává aktivním enzymem, který štěpí další složku v pořadí. Zatímco klasická dráha aktivace je příkladem spolupráce specifické a nespecifické imunity, alternativní dráha začíná čistě nespecificky a představuje hlavní obranu proti sajícímu klíšeti (Valenzuela et al., 2000). Třetí aktivační dráha komplementu se nazývá lektinová. Ta je obdobou klasické dráhy, jen aktivátorem není protilátka, ale sérový lektin (např. MBL – lektin vážící manózu) (Schuijt et al., 2011). Aktivace komplementového systému vede ke vzniku molekul s různorodou biologickou aktivitou v rámci zánětlivé odpovědi, opsonizaci a lýze napadajícího patogenu (Kazimírová and Štibrániová, 2013).

Specifickým inhibítorem aktivace alternativní dráhy komplementu je protein Isac (*I. scapularis* salivary anticomplement), který blokuje navázání faktoru B na C3b složku, čímž zamezuje zformování C3 konvertázy (Valenzuela et al., 2000). K proteinu Isac byly později nalezeny homologní proteiny pojmenované IRAC I a II (*I. ricinus* anti-complement), které inhibují alternativní dráhu podobným způsobem (Schroeder et al., 2007). Dalším inhibítorem komplementu vykazujícím homologii s Isac a tudíž s podobným mechanismem účinku je Salp20 (Tyson et al., 2007).

Před pár lety byl objeven protein TSLPI (Tick Salivary Lectin Pathway Inhibitor), který inhibuje vazbu MBL ke svému ligandu, a tím i celou aktivaci lektinové dráhy komplementu. Provedený výzkum dále ukázal, že TSLPI usnadňuje přenos *Borrelia burgdorferi* (Schuijt et al., 2011).

Protein OmCI (*O. moubata* complement inhibitor) ovlivňuje komplementovou kaskádu jiným způsobem než výše zmíněné molekuly. Dokáže specificky vázat C5 složku, a tudíž bránit její aktivaci C5 konvertázou. C3 složku neovlivňuje (Nunn et al., 2005).

5.2.1.1.2 Vliv klíčtčích slin na zánětlivý proces

V zánětlivé odpovědi hrají klíčovou roli neutrofilý, které představují první obranou linii po infekci nebo zranění. Plní funkci fagocytů, degradují mikroorganismy ve fagolyzozomu produkcí ROS (reaktivní formy kyslíku) a proteáz. Neutrofilý můžou ničit patogeny také bez fagocytózy vylučováním neutrofilních extracelulárních pastí (NETs) a antimikrobiálních peptidů (Amulic et al., 2012). Neutrofilý jsou na místo potřeby rekrutovány

a aktivovány mnoha faktory, například leukotrieny B4, interleukinem 8 a anafylatoxiny (složky komplementu C3a a C5a). Do místa zánětu sekretují serinové proteázy, které se účastní aktivace a inaktivace chemokinů a cytokinů a aktivace membránových receptorů. (Beaufays et al., 2008).

Jedním z proteinů klíštěcích slin, který vykazuje protizánětlivou aktivitu, je lipokalin Ir-LBP (*I. ricinus* leukotriene B4-binding protein). Specificky se váže na leukotrien B4, čímž redukuje množství aktivovaných neutrofilů v místě zánětu (Beaufays et al., 2008). Klíšťa si vyvinula schopnost manipulovat s chemokinovou sítí, která spouští rekrutaci leukocytů během zánětlivé odpovědi. Příkladem takového jevu je rodina 3 glykoproteinů nazývaná evasiny, kde každý její konkrétní zástupce (Evasin-1, -3 a -4) dokáže vázat odlišný druh chemokinů (Déruaz et al., 2013; Frauenschuh et al., 2007; Hayward et al., 2017). Ve slinách klíšťete *H. asiaticum* byly nalezeny molekuly hyalomin-A a -B, které působí proti imunitní odpovědi hostitele přímou inhibicí sekrece zánětlivých faktorů jako TNF- α , MCP-1 a IFN- γ nebo nepřímou zvýšením sekrece immunosupresivního cytokinu IL-10. Navíc ještě bylo dokázáno, že obě látky dokáží v rámci několika sekund vychytávat volné kyslíkové radikály (ROS), čímž umožňují klíšťeti nebo přenášenému patogenu uniknout oxidačnímu stresu hostitele (Wu et al., 2010). Také neproteinové molekuly se zúčastní modulace imunitního systému hostitele. Purinový nukleosid Ado (adenosine) a prostaglandin PGE₂ inhibují produkci prozánětlivých cytokinů IL-12p40, TNF- α a naopak stimulují produkci protizánětlivého IL-10. PGE₂ navíc ještě potlačuje diferenciaci dendritických buněk z krevních prekurzorů (Oliveira et al., 2011).

Do zánětlivé reakce se zapojují i žírné buňky. Protein TdPI (Tick-derived Protease Inhibitor) inhibuje lidskou β -tryptázu – serinovou proteázu hojně obsaženou v granulích dendritických buněk (Paesen et al., 2007). Hraje důležitou roli v zánětu, kde může stimulovat uvolnění granulocytových chemoatraktantů jako Il-8 a zvyšovat expresi adhezivní molekuly ICAM-1, která umožňuje infiltraci buněk do místa poranění (Payne and Kam, 2004).

Zajímavou molekulou izolovanou z klíštěcích slin druhu *Amblyomma americanum* je první známý homolog členovců k lidskému cytokinu MIF (macrophage migration inhibitory factor). Jelikož se jedná o prozánětlivý cytokin, jeho význam pro přežití klíšťete je matoucí. Jednou možnou funkcí je podpora zánětu v místě sání klíšťete za účelem zvýšení krevního zásobení, které zánět provází. V kombinaci s ostatními molekulami, které by potlačovaly jiné aspekty zánětu jako například bolest, by tato vlastnost skutečně mohla klíšťeti přinášet výhodu.

Jinou možnou funkcí klíštěcího MIF je inhibice migrace potenciálně nebezpečných makrofágů a ochrana sajícího klíštěte před jejich útokem (Jaworski et al., 2001).

Překážkou, kterou musí klíště během získávání potravy překonat, jsou procesy jako svědění, bolest a otok, díky kterým by bylo hostitelem zpozorováno a odstraněno. Bradykinin patří mezi významné mediátory bolesti a je také nejdůležitější látkou podporující tvorbu edému. K jeho produkci dochází po aktivaci prekalikreinu na kalikrein. Sliny klíštěte *I. scapularis* dokáží bradykinin degradovat pomocí dipeptidyl karboxypeptidázy s kininázovou aktivitou (Ribeiro and Mather, 1998). Když je tkáň zanícená nebo stimulovaná alergenem, začnou bazofily a žírné buňky uvolňovat histamin, který vyvolává svědění podrážděním axonových nemyelizovaných C-vláken, jenž se podílejí na vedení informace o bolesti (Shim and Oh, 2008). Histamin je jedním z hlavních mediátorů zánětu. Byly popsány 3 histamin vázající proteiny ze slin klíštěte *R. appendiculatus* nazvané Ra-HBPs (Paesen et al., 1999) a z klíštěte *D. reticulatus* zase protein SHBP, který kromě histaminu váže i serotonin, jenž působí jako jeden z hlavních mediátorů zánětu u hlodavců, zatímco u ostatních druhů reguluje agregaci trombocytů. Tento objev je příkladem adaptace parazitů na obranné mechanismy různých hostitelů (Sangamnatdej et al., 2002).

Tvorba nových krevních cév (angiogeneze) je proces nezbytný pro zhojení rány, účastní se mimo jiné také vzniku a vývoje nádorů. Zahrnuje aktivaci a uvolnění angiogenních faktorů, uvolnění proteolytických enzymů rozkládajících proteiny extracelulární matrix, migraci a proliferaci buněk endotelu a formování mikrocév. Protein Haemangin z klíštěte *H. longicornis* narušuje proces angiogeneze inhibicí proliferace endotelových buněk a vyvoláním apoptózy (Islam et al., 2009). Podobný efekt vykazuje molekula podobná troponinu I HLTnI, což napovídá tomu, že se troponin (dříve považovaný za molekulu přítomnou pouze ve svalch) účastní i jiných procesů než jen regulace kontrakce příčně pruhovaného svalu (Fukumoto et al., 2006). Metaloproteázy jsou skupina enzymů schopných hydrolyzovat komponenty extracelulární matrix (například fibrinogen a fibronectin) a stejně jako předchozí látky indukovat apoptózu buněk endotelu, a tím inhibovat angiogenezi. Byly nalezeny ve slinách několika druhů klíšťat (*I. pacifus* (Francischetti et al., 2005), *I. scapularis* (Valenzuela et al., 2002), *I. ricinus* (Decrem et al., 2008), *H. longicornis* (Harnnoi et al., 2007)).

5.2.1.2 Vliv klíštěcích slin na získanou imunitní odpověď

Specifické imunitní odpovědi se účastí B-lymfocyty, které v sekundárních lymfoidních orgánech čekají na setkání s antigenem. V případě T-dependentních antigenů jsou na jejich aktivaci třeba dva signály. První se vytváří přemostěním imunoglobulinových receptorů

antigenem, druhý zajistí pomocný T-lymfocyt (T_H). T-nezávislé antigeny (např. lipopolysacharidy) druhý signál od T_H buněk nepotřebují, neboť obsahují velké množství opakujících se epitopů, které stačí na vytvoření dostatečně velkého signálu, aby způsobil aktivaci B-lymfocytů. Následně se B-lymfocyt diferencuje na paměťovou buňku, většina však dozraje v plazmatické buňky se schopností produkce protilátek. Ve slinách klíštěte *Hyalomma asiaticum asiaticum* byl nalezen protein pojmenovaný BIF (B-cell inhibitory factor), který dokáže inhibovat proliferaci lipopolysacharidem stimulovaných B-lymfocytů (Yu et al., 2006). Látka se stejnou funkcí byla izolovaná i ze slin klíštěte *Ixodes ricinus*, dostala název BIP (B-cell inhibitory protein) (Hannier et al., 2004). Má se za to, že tyto molekuly usnadňují přenos bakterie *Borellia burgdorferi* – původce lymské boreliózy.

Proliferaci T-lymfocytů negativně ovlivňuje protein Iris (*I. ricinus* immunosuppressor). K tomu navíc navozuje Th_2 imunitní odpověď inhibicí produkce $IFN-\gamma$ (Leboulle et al., 2002).

Naivní pomocné T-lymfocyty (Th) potřebují pro svou aktivaci dva signály. První poskytuje vazba T buněčného receptoru (TCR) s MHC komplexem na povrchu antigen prezentující buňky. Druhý signál zahrnuje interakci mezi receptorem CD28 na $CD4^+$ T-lymfocytu a proteinem CD80 nebo CD86 na antigen prezentující buňce. Jakmile tyto dva signály proběhnou, Th začne proliferovat. Uvolňuje autokrinní cytokin IL-2 důležitý pro získání klonů Th lymfocytů a současně exprimuje IL-2 receptor. Protein Salp15 vykazuje inhibiční efekt TCR zprostředkované aktivace $CD4^+$ T-lymfocytů, což vede ke snížení produkce IL-2 a potlačení proliferace Th buněk (Anguita et al., 2002). Ve slinách klíštěte *Ixodes scapularis* byl objeven protein vázající IL-2, který svým účinkem zabraňuje proliferaci T lymfocytů (Gillespie et al., 2001).

Cystatiny cílí na lysozomální katepsinové proteázy, které se účastní degradace proteinů, včetně těch, které degradují antigeny na oligopeptidy prezentované s MHC II (Chmelař et al., 2017). Jedním z cystatinů nalezených v klíštěcích slinách je Sialostatin L (Kotsyfakis et al., 2006). Sialostatin L je specifický pro katepsin L, nicméně katepsin V, C, X, S a papain inhibuje také. Mezi jeho funkce patří inhibice proliferace cytotoxických T-lymfocytů, inhibice produkce IL-2 a IL-9 lymfocyty Th_9 a inhibice maturace dendritických buněk vedoucí k redukované produkci IL-12 a TNF (Chmelař et al., 2017). Ve slinách stejného klíštěte byl nalezen i protein s podobnou sekvencí - Sialostatin L2 (Kotsyfakis et al., 2007), u kterého nebyl pozorován modulační účinek na antigen prezentující buňky, ale pro přežití klíštěte je pravděpodobně také velice důležitý (Kazimírová and Štibrániová, 2013). Oba působí protizánětlivě (Chmelař et al., 2017).

Dendritické buňky propojují přirozenou a specifickou imunitu. Jsou klíčovým iniciátorem a modulátorem T-lymfocytární odpovědi a hrají důležitou roli v iniciaci a regulaci získané imunity jako celku. Ve většině periferních tkání jsou rezidentní a chovají se jako imunitní stráž, která odebírá antigeny z okolí, aby mohly být následně rozpoznány T-lymfocyty. Skrze své PRR receptory detekují patogenní struktury nebo tkáňové poškození. Jako odpověď na takový stimul podléhají dendritické buňky programovaným fenotypickým a funkčním změnám zakončených maturací, během nichž migrují z periferie do sekundárních lymfatických tkání. Tam aktivují naivní antigen specifické T-lymfocyty expresí specializovaných stimulačních molekul. Je zřejmé, že manipulace s dendritickými buňkami poskytuje mechanismus, pomocí kterého by paraziti nebo patogeny mohli ovlivnit získanou imunitní odpověď buď inhibicí odpovědi jako celku (například zabráněním aktivace T-lymfocytů dendritickými buňkami) nebo vedením odpovědi jiným směrem. Klíčový protein kombinující schopnost přeprogramovat maturaci dendritických buněk a inhibovat jejich proliferaci se nazývá Japanin. Než aby jednoduše maturaci inhiboval, dokáže ji navést úplně jiným směrem. Blokuje sekreci LPS indukovaných zánětlivých Th1 cytokinů, podporuje sekreci protizánětlivého IL-10 a redukuje expresi klíčové kostimulační molekuly CD86. Mimo jiné také inhibuje diferenciaci dendritických buněk z monocytů. Zatím žádná jiná známá molekula nemá tak široké spektrum vlivu na maturaci dendritických buněk se schopností modulovat imunitní odpověď na takové množství rozdílných stimulů (Preston et al., 2013).

6 KLÍŠTĚCÍ MOLEKULY S POTENCIÁLEM VYUŽITÍ V HUMÁNNÍ MEDICÍNĚ

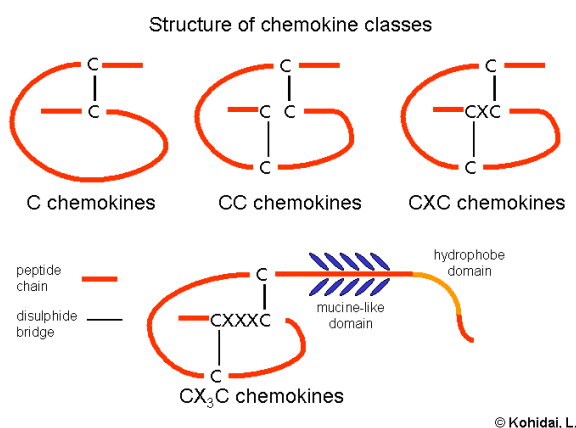
6.1 EVASINY

6.1.1 Struktura a funkce chemokinů

Rekrutace imunitních buněk je nezbytnou součástí nastolení imunitní odpovědi, která když je nekontrolována, může vést k nechtěnému zánětu. Farmaceutický průmysl se několik desetiletí snaží inhibovat nepřiměřenou rekrutaci lymfocytů ovlivněním chemokinového systému, bohužel s omezeným výsledkem (Bonvin et al., 2016).

Chemokiny zahrnují velkou proteinovou rodinu, která aktivuje specifické receptory spřažené s G proteinem. Vazba chemokinů s receptory přítomnými na leukocytech způsobí adhezi migrujících buněk na endotelie cév prostřednictvím integrinů, extravazaci buněk z krve do tkáně proti koncentračnímu gradientu, a nakonec buněčnou aktivaci (Allen et al., 2007).

Tradičně se chemokiny a jejich receptory dělí do 4 podrodin (CXC, CC, C, CX₃C) na základě společných strukturních charakteristik a přítomnosti cysteinových zbytků na ligandu (Obr. 4). Písmeno C reprezentuje cystein a X/X₃ jednu nebo tři necysteinové aminokyseliny. V roce 2002 byl představen systém nomenklatury, podle něhož je každý ligand a receptor identifikovaný podle příslušné podrodiny a identifikačního čísla. Například CCL2 znamená chemokinový ligand podrodiny CC číslo 2. Podobně se receptory značí písmenem R. Je třeba dodat, že chemokiny vykazují redundantní efekt - mnoho různých ligandů se váže na ten samý receptor a mnoho ligandů zase na různé receptory (Allen et al., 2007).



Obr. 4: Struktura chemokinů ².

Navzdory klíčové roli v imunitním systému jsou chemokiny a jejich receptory spojené i s neobyčejným množstvím patologických jevů. Ty zahrnují autoimunitní onemocnění (lupénku, revmatoidní artritidu, roztroušenou sklerózu), plicní onemocnění (astma,

chronickou obstrukční plicní chorobu, plicní fibrózu), rakovinu, vaskulární onemocnění nebo i AIDS (Allen et al., 2007).

Aby klíště prodloužilo svůj čas strávený na hostiteli, vylučuje do místa sání látky ovlivňující obranný systém člověka. Ukázalo se, že klíštěcí druh *Rhipicephalus sanguineus* produkuje 3 glykoproteiny nazvané evasiny, jenž vážou chemokiny hostitele, čímž inhibují migraci leukocytů do místa sání. Díky této vlastnosti tvoří evasiny hodnotnou zásobárnu protizánětlivých proteinů s možností budoucího léčebného využití (Hayward et al., 2017).

6.1.2 Evasin-1

Z hlediska schopnosti vazby na chemokiny vykazuje Evasin-1 ze zkoumaných evasinů nejvyšší specifitu, neboť váže pouze tři úzce příbuzné chemokiny – CCL3, CCL4 a CCL18, čímž v myších modelech inhibuje migraci neutrofilů. Je však nutno podotknout, že existuje znatelný rozdíl v rekrutaci myších a lidských leukocytů. Zatímco myší neutrofilové exprimují CCR1 (jeden z receptorů pro CCL3), v případě lidského organismu není CCL3 primárním mediátorem rekrutace neutrofilů, jelikož jeho receptory CCR1 a CCR5 jsou exprimovány především monocyty a makrofágy (Bonvin et al., 2016).

Studie ukázala, že schopnost Evasinu-1 vázat CCL3 by mohla být využita k léčbě plicní fibrózy. Tato nemoc je charakteristická zánětem plicní tkáně, rozpadem alveolárních struktur a proliferací intersticiálních fibroblastů. Klinické studie a pokusy na zvířecích modelech již v minulosti dokázaly souvislost mezi přítomností konkrétních chemokinů a plicní fibrózou. Kromě CCL2 a CCL5 je pro rozvoj plicní fibrózy nezbytný chemokinový ligand CCL3 (jinak nazývaný MIP-1 α), jenž vazbou na receptor CCR5 přispívá k rekrutaci fibrocytů, neutrofilů a prozánětlivých makrofágů, což vede k následnému uvolňování profibrotických TNF- α a TGF- β z těchto buněk. Podání Evasinu-1 myši s bleomycinem vyvolanou plicní fibrózou zabránilo lokální infiltraci T-lymfocyty, neutrofilů a makrofágy a produkci prozánětlivých a profibrotických cytokinů TNF- α a TGF- β . Efekt byl srovnatelný s CCL3 deficientní skupinou myší. K pozitivnímu efektu došlo jak při preventivním podání Evasinu-1 (v den podání bleomycinu), tak při podání terapeutickém (osmý den po bleomycinu), což ukazuje prospěšné účinky Evasinu-1 i když k jeho podání dojde až po vzniklém fibrogenním poškození (Russo et al., 2011). Vzhledem k tomu, že na plicní fibrózu zatím neexistuje žádný účinný lék a choroba vykazuje poměrně nízký medián přežití 2,5 - 3,5 roku (King et al., 2011), modulace funkce chemokinu CCL3 Evasinem-1 představuje pro pacienty léčící se s tímto onemocněním velikou nadějí.

V jiném pokusu bylo zkoumáno možné použití Evasinu-1 k zabránění reakce štěpu proti hostiteli (GVHD – graft versus host disease) při alogenní transplantaci hematopoetických kmenových buněk. Takový způsob léčby se volí u řady maligních i nemaligních onemocnění jako je například akutní a chronická leukémie, lymfomy, aplastická anémie a imunodeficience. Postransplantační období je však spojeno s rizikem GVHD, kdy T-lymfocyty dárce rozpoznávají antigeny příjemce jako cizorodé a začnou proti nim reagovat. Byly popsány 3 fáze experimentální GVHD. V poslední fázi způsobí chemokiny, včetně CCL3, rekrutaci efektorových T-lymfocytů do GVHD cílových orgánů. Takový proces má za následek poškození tkáně hostitele. Podání Evasinu-1 zabránilo rekrutaci a adherenci leukocytů (převážně CD8⁺, CD4⁺ buněk a makrofágů) k endoteliálním buňkám a snížilo míru poškození tkáně. Efekt byl srovnatelný s CCL3 deficientní skupinou myši. Co je důležité, pokus dále ukázal, že zabránění GVHD Evasinem-1 nemělo vliv na žádoucí reakci štěpu proti leukémii (GVL – graft versus leukemia), při které dárcovské T-lymfocyty reagují proti zbytkovým leukemickým buňkám příjemce léčícím se s tímto onemocněním (Castor et al., 2010).

6.1.3 Evasin-3

Evasin-3 rozpoznává podmnnožinu CXC chemokinů obsahující ELR motiv (aminokyselinová sekvence kyselina glutamová – leucin – arginin). Do této podmnnožiny spadají chemokiny CXCL1, -2, -3, -5, -6 a -8, které k vazbě využívají receptor CXCR2, čímž zprostředkovávají rekrutaci neutrofilů jak u myši, tak lidí (Bonvin et al., 2016).

Když je srdeční tkáň vystavena ischemii a následně dojde k obnovení krevního oběhu, dochází v důsledku rekrutace leukocytů k takzvanému ischemicko-reperfuznímu poškození tkáně. V časně fázi reperfuze vylučují infiltrované zánětlivé buňky (převážně monocyty a neutrofilů) proteolytické enzymy a volné kyslíkové radikály (ROS), které dále napomáhají procesům vedoucím ke vzniku postischemického srdečního selhání. Pokus dokázal, že selektivní inhibice aktivity neutrofilových chemoatraktantů CXCL2, CXCL1 a CXCL8 (lidský ekvivalent myšního CXCL2) Evasinem-3 zamezuje myokardiálnímu poškození v časně fázi reperfuze. Jeho podání během ischemie zmenšilo velikost infarktového ložiska. Evasin-3 navíc ještě dokázal redukovat produkci ROS, což naznačuje, že za vylučování ROS během reperfuze jsou alespoň částečně zodpovědné infiltrované neutrofilů. Neutralizace aktivity CXC chemokinů Evasinem-3 tak může být cestou k redukci oxidačního stresu (Montecucco et al., 2010).

Dalším zánětlivým onemocněním vyznačujícím se expresí chemokinů a následnou infiltrací leukocytů, je akutní pankreatitida, při níž dochází k samonatrávení slinivky

předčasně aktivovanými enzymy. Takový proces vede k destrukci slinivkového parenchymu a kvůli uvolnění intracelulárního obsahu poškozených buněk i k lokálnímu a systematickému zánětu. Když zánět začne být nepřiměřený, leukocyty (hlavně neutrofilů) začnou kromě slinivky infiltrovat a ničit také okolní orgány, jimiž často bývají plíce. I v tomto případě dokázal Evasin-3 inhibovat bioaktivitu CXC chemokinů jak v plicích, tak ve slinivce, a tím redukovat apoptózu a nekrózu těchto orgánů. Tento prospěšný efekt ještě doplňuje fakt, že podání Evasinu-3 bylo spojeno s částečnou redukcí ROS (stejně jako v případě reperfučního poškození myokardu) (Montecucco et al., 2014).

Účinky Evasinu-3 byly dále testovány na myším modelu artritidy, kde kvůli vazbě chemokinů na CXCR2 dochází k rekrutaci neutrofilů do kloubů. Evasin-3 dokázal v dutině kolenního kloubu snížit celkový počet leukocytů o 50 %, z toho neutrofilů o 70 %. Co je zajímavé, Evasin-3 dále zabránil lokální produkci TNF- α , který je zodpovědný za zánětlivé dráždění receptorů bolesti (Déruaz et al., 2008).

6.1.4 Evasin-4

Širší selektivitu vykazuje Evasin-4, neboť dokáže interagovat nejméně s 18 chemokiny (Déruaz et al., 2013). Je však stále vysoce specifický, jelikož rozpoznává jedině chemokiny patřící do podrodiny CC. Na rozdíl od Evasinu-1 a -3 inhibuje Evasin-4 rekrutaci eozinofilů. Ze zmíněných evasinů se právě tento jeví pro vývoj nových léků jako nejvhodnější kandidát a to právě z důvodu jeho širší selektivity (Bonvin et al., 2016).

Ulcerózní kolitida a Crohnova choroba jsou chronická zánětlivá onemocnění střev neznámého původu s tendencí k relapsům a remisím. Mezi projevy ulcerózní kolitidy patří ztráta hmotnosti, krvavý či hlenovitý průjem a horečky. Etiologie těchto onemocnění zůstává neznámá, ale patrně zahrnuje nekontrolovanou aktivaci prozánětlivých mediátorů, což se projevuje zánětlivým infiltrátem v tlustém střevě s převahou neutrofilů, lymfocytů, žírných buněk a eozinofilů. Zatímco role neutrofilů v patogenezi ulcerózní kolitidy je často zdůrazňovaná, teprve nedávno se začala věnovat pozornost i funkci eozinofilů. Eozinofilní granulocyty jsou přítomné i ve zdravém střevním slizničním vazivu, kde plní důležitou funkci v obraně před nákazou parazity, nicméně byla prokázána spojitost mezi počtem eozinofilů ve sliznici a závažností onemocnění, neboť dokáží vylučovat množství prozánětlivých cytokinů. Pokus dokázal, že blokování chemokinů CCL11 Evasinem-4 snížilo přítok eozinofilů a neutrofilů, destrukci tkáně i letalitu. Taková data kromě využitelnosti Evasinu-4 také potvrzují teorii, že eozinofily a produkty jejich degranulace jsou v patogenezi ulcerózní kolitidy skutečně klíčové. Pokles infiltrace neutrofilů může souviset se skutečností, že samotné

eozinofily jsou zdrojem chemokinů, které rekrutaci neutrofilů zprostředkovávají (Vieira et al., 2009).

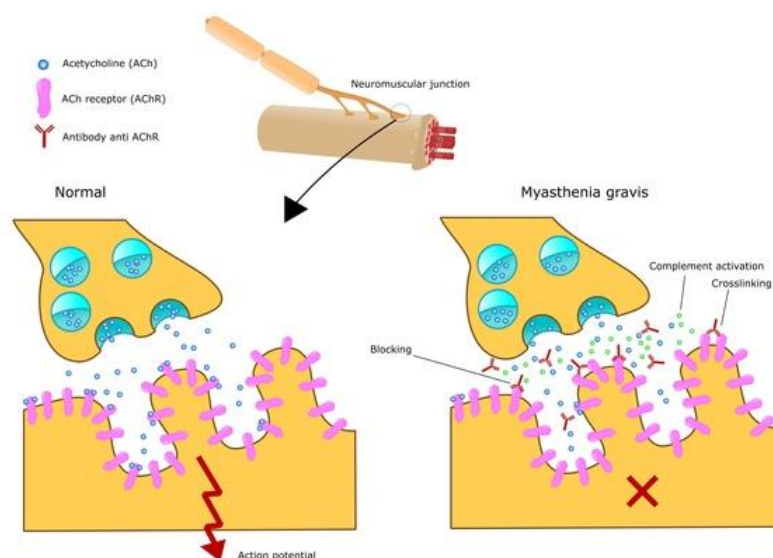
6.2 OMCI

OmCI (nazývaný také coversin nebo EV576) izolovaný z měkkého klíštěte *Ornithodoros moubata* je členem proteinové rodiny zvané lipokaliny. Strukturou je příbuzný s proteiny vázajícími histamin, které byly nalezeny v tvrdých klíšťatech. Jedná se o první lipokalin, u kterého byla dokázána schopnost inhibice C5 složky komplementu, čímž rozšířil už tak různorodé funkce této rodiny (Nunn et al., 2005), mezi které patří například často zmiňovaný transport ligandů nebo syntéza prostaglandinů (Fořtová M et al., 2013). OmCI inhibuje klasickou i alternativní dráhu komplementu tím, že vazbou na C5 složku zabraňuje její interakci s C5 konvertázou, čímž nemůže docházet k produkci C5a složky a MAC komplexu (Nunn et al., 2005). Kromě C5 dokáže OmCI vázat také prozánětlivý leukotrien B4, který způsobuje aktivaci a adhezenci leukocytů (Crooks and Stockley, 1998; Jore et al., 2016).

Léčba celkovou inhibicí komplementové kaskády přináší zejména v dlouhodobém hledisku tu nevýhodu, že znemožňuje opsoninu C3b vykonávat svou funkci, a případní pacienti by proto byli vystaveni riziku rozvoje infekcí a imunokomplexových onemocnění. Právě proto je OmCI slibným kandidátem pro výrobu terapeutických prostředků, neboť zatímco procesy spojené s aktivací C5 složky jsou potlačeny, opsonizační účinky C3b složky zůstávají neovlivněny. Důkazem toho, že inhibice komplementu na úrovni složky C5 nepřináší pro celkovou imunitu člověka výrazná omezení, může být fakt, že jedinci s deficiencí složek MAC komplexu jsou až na zvýšenou náchylnost k meningokokovým onemocněním zdraví (Hepburn et al., 2007).

Terapeutické účinky proteinu OmCI byly testovány v experimentálním modelu vzácné choroby myasthenia gravis (Soltys et al., 2009). Myasthenia gravis (MG) je chronické autoimunitní onemocnění nervosvalového přenosu. Za normálních okolností vylučuje neuron do synaptické štěrbině mediátor acetylcholin, který se váže na acetylcholinové receptory přítomné na cytoplazmatické membráně svalových vláken. V případě onemocnění MG produkují B-lymfocyty autoprotilátky proti acetylcholinovým receptorům (Obr.5). Mechanismů onemocnění je více. Protilátky se mohou vázat na acetylcholinové receptory a tím blokovat jejich vazbu s acetylcholinem. V případě obsazení dvou sousedních receptorů dochází k antigenní modulaci, která má za následek urychlenou endocytózu a degradaci receptorů. V experimentálním modelu onemocnění (EAMG) se však jako převládající mechanismus poškození ukázala lýza postsynaptické membrány vyvolaná terminálními

produkty komplementové kaskády. V důsledku těchto procesů se u pacientů projevuje svalová slabost, neboť je porušen nervosvalový přenos (Kusner et al., 2008). Pozitivní efekt proteinu OmCI se na myši projevil snížením aktivity komplementu v séru, sníženým ukládáním terminálních složek komplementu (např. C9) na nervosvalové ploténce a redukcí cytotoxicity séra. Myši, kterým byl OmCI podán, vykazovaly vyšší dobu přežití, nízkou závažnost onemocnění a nižší váhový úbytek (Soltys et al., 2009).



Obr. 5: Srovnání nervosvalové ploténky zdravého člověka s nervosvalovou ploténkou při onemocnění myasthenia gravis. ³

OmCI byl dále účinný i v prasečím modelu ischemicko-reperfučního poškození tkáně, kde komplement hraje důležitou roli. Terminální C5b-9 (MAC) komplex způsobuje aktivaci trombocytů a endoteliálních buněk, což vede k infiltraci leukocyty, ke které přispívá i anafylatoxin C5a. Jelikož aktivace C5 složky a vazba MAC komplexu na membránu přímo aktivuje inflamazóm, dokázal OmCI eliminovat indukci prozánětlivého cytokinu IL-1 β , který v inflamazómu vzniká rozštěpením proIL-1 β . Následkem tohoto byla utlumena i aktivita adhezivní molekuly endoteliálních buněk E-selektinu, jehož exprese je IL-1 β dependentní. Výsledkem byla zredukovaná velikost infarktu a zlepšení činnosti srdečních dutin (Pischke et al., 2017).

Antifosfolipidový syndrom (APS) je multisystémové autoimunitní onemocnění charakterizované arteriálními i venózními trombózami a opakovanými potraty v důsledku aktivace endoteliálních buněk, monocytů a trombocytů antifosfolipidovými protilátkami. Aktivace těchto buněk vede k následné nadprodukci adhezivních molekul, tkáňového faktoru a tromboxanu A₂ (Ruiz-Irastorza et al., 2010). Formování trombu napomáhá C3 složka

komplementu, interakce C5a s C5a receptorem a aktivace MAC komplexu. APS se obvykle léčí antikoagulanty jako heparin, warfarin nebo aspirin. I přes tento způsob léčby však u skupiny pacientů trombózy přetrvávají, zatímco další skupina se potýká s hemoragickými komplikacemi. Jelikož v experimentu na myším modelu dokázal OmCI významně inhibovat vznik venózních trombóz a zabránit produkci tkáňového faktoru, cílení na komplementovou kaskádu by mohlo představovat novou formu terapie tohoto onemocnění (Romay-Penabad et al., 2014).

Lidské tělo si vytvořilo hned několik regulátorů komplementu, aby předcházelo jeho aktivitě v místech, kde není potřeba. Poškození regulace komplementu hraje klíčovou roli v mnoha onemocněních včetně paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH). PNH je vzácné život ohrožující onemocnění hematopoézy. Dochází k mutaci genu, který kóduje enzym důležitý pro vytvoření kotvy, která připojuje k membráně proteiny (CD55 a CD59) chránící povrch destiček a erytrocytů před účinkem komplementu. Důsledkem tohoto onemocnění je komplementem vyvolaná aktivace trombocytů a hemolýza. Podání OmCI efektivně redukovalo lýzu erytrocytů (Kuhn et al., 2016). Abnormality regulátorů komplementu jsou ve velké míře přítomny také u pacientů s trombotickou mikroangiopatií (TMA). V tomto případě se jedná o přítomnost autoprotilátek proti faktoru H, který za normální situace interaguje se složkou C3, nebo o mutace v jeho genu. TMA má více forem a může vzniknout jako komplikace po transplantaci kmenových buněk. Právě na příkladu potransplantační komplikace byl dokázán pozitivní efekt OmCI. Jeho prospěšnost byla srovnatelná s běžně používanými léčivy (Goodship et al., 2017).

Předpokládá se, že OmCI by mohl být užitečný i v rámci léčby bulózního pemfigoidu (BP), atopické keratokonjunktivitidy (AK) a další formy TMA – atypického hemolyticko-uremického syndromu (aHUS) ⁴.

6.3 PROTEINY VÁZAJÍCÍ HISTAMIN

Ve slinách klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* byly objeveny tři histamin vázající proteiny (HBP) spadající do rodiny lipokalinů. Dva proteiny pojmenované Ra-HBP1 a Ra-HBP2 jsou produkovány samičkami v ranné fázi sání. Třetí protein Ra-HBP3 je vylučován během celého krmení samci, nymfami i larvami. Tento rozdíl je pravděpodobně dán skutečností, že samečci potřebují oklamat imunitní systém hostitele hned několikrát, jelikož se k hostiteli přisají vícekrát. Samice oproti tomu setrvává přichycená v jednom místě po celou dobu krmení. Ra-HBP2 a Ra-HBP3 vykazují pro histamin vysokou afinitu, zatímco v případě Ra-HBP1 je vazba slabší. Ra-HBP2 (jinak nazývaný EV131) poskytuje pro histamin dvě

vazebná místa, přičemž jedno s vyšší a druhé s nižší afinitou. Tato jeho vlastnost dělá z proteinu Ra-HBP2 slibného kandidáta pro léčbu alergického astmatu (Paesen et al., 1999).

Rozvoji alergického astmatu předchází senzibilizační fáze, během níž začnou plasmocyty produkovat protilátky třídy IgE jako odpověď na setkání alergenu s antigen prezentujícími buňkami přítomnými na sliznici. Takto vytvořené IgE nasedají na vysoce afinitní IgE receptory žírných buněk a bazofilů. Pokud se na takto senzibilizovanou žírnou nebo bazofilní buňku naváže alergen, nastává časná fáze alergické reakce. Dochází k přemostění molekul IgE a k degranulaci buňky. Hlavním farmakologicky aktivním mediátorem obsaženým v granulách je histamin, který vazbou na receptory (převážně HR1 a HR4) způsobí vazodilataci, bronchokonstrikci, produkci hlenu a svědění. Pozdní fáze se vyznačuje eozinofilní a lymfocytární infiltrací a bronchiální hyperreaktivitou. Opakované vystavení alergenu podněcuje chronický zánět vedoucí k astmatu. Již po několik desetiletí se v léčbě astmatu užívají HR1 antagonisté, ale jen s omezenými výsledky, jelikož jsou účinky histaminu zprostředkovány nejméně čtyřmi receptory nacházejícími se na odlišných buňkách i v odlišných tkáních. Neutralizace histaminu samotného by proto mohla být v rámci léčby více efektivní než antagonismus na úrovni specifického receptorového subtypu. Výsledky experimentu na imunizované myši tuto teorii podporují. Intranazální podání Ra-HBP2 (EV131) zabránilo hyperreaktivitě dýchacích cest ze 70 % a odstranilo peribronchiální zánět, plicní eozinofilii, hypersekreci hlenu a sekreci IL-4 a IL-5. Inhibiční efekt Ra-HBP2 byl srovnatelný s inhibičním efektem glukokortikoidů (Couillin et al., 2004).

Syndrom akutní dechové tísně (ARDS) je syndrom vážného akutního plicního selhání, které může vzniknout jako následek poškození plic vdechnutím cizího tělesa nebo toxické látky, tonutím, zápallem plic ale i třeba jako následek pankreatitidy, popálení nebo sepse. Hlavním rysem ARDS je zvýšená propustnost plicních kapilár a poškození epitelu alveolů. V alveolech se v důsledku zánětlivého poškození a selhání regulačních mechanismů hromadí přebytečná voda, výměna dýchacích plynů je porušena. Klíčovou roli v patogenezi ARDS hrají zánětlivé procesy – jsou uvolňovány prozánětlivé cytokiny TNF, IL-1 a IL-6, neutrofilů, dochází také k aktivaci monocytů. Mnoho pacientů umírá na multiorgánové selhání (Luh and Chiang, 2007). Protože mezi astmatem a ARDS existuje podobnost, bylo zjišťováno, zda by byl Ra-HBP2 účinný i v myším ARDS, který byl navozený vdechnutím endotoxinu. Kromě granul žírných a bazofilních buněk totiž existuje i druhý zdroj histaminu, a to neutrofilů, trombocytů, dendritické buňky a T-lymfocyty, které vylučují de novo utvořený histamin ihned po jeho syntéze. Výrazný vzestup této aktivity je pozorován po stimulaci prozánětlivými

cytokiny nebo bakteriálními produkty. Ra-HBP2 vazbou na histamin utlumil bronchokonstrikci, sekreci TNF, únik plazmy z kapilár, rekrutaci neutrofilů i lokální poškození tkáně (Ryffel et al., 2005).

6.4 SALP15

Salp15 je protein izolovaný ze slin klíštěte *Ixodes scapularis* schopný inhibovat aktivaci CD4⁺ T-lymfocytů (Th). Přeskupení TCR komplexu a molekuly CD28 naivního T-lymfocytu spouští řadu intracelulárních signalizačních drah, které vedou k aktivaci specifických transkripčních faktorů. Klíčovým cytokinem, jehož gen je regulován těmito transkripčními faktory, je IL-2. Tento autokrinní cytokin způsobuje masivní proliferaci dalších T-lymfocytů. Spolu s produkcí IL-2 dochází během aktivace Th lymfocytů ke zvýšené expresi alfa řetězce IL-2 receptoru na Th buňce (Anguita et al., 2002). Salp15 se váže na molekulu CD4 (Juncadella et al., 2007), čímž narušuje TCR signalizaci ve velmi brzké fázi procesu aktivace. Tím dochází k inhibici transkripce genu pro IL-2. V důsledku toho není umožněna proliferace dalších Th buněk a jejich diferenciaci v buňky efektorové (Anguita et al., 2002).

Kromě signalizační dráhy Th lymfocytů ovlivňuje Salp15 také funkci dendritických buněk. Dendritické buňky rozeznávají antigeny pomocí TLR a CLR receptorů. DC-SIGN je jeden z CLR receptorů, jenž je exprimován dendritickými buňkami. Salp15 má schopnost interagovat s DC-SIGN, čímž aktivuje serine/threonine kinázu Raf-1. To vede ke snížení stability mRNA pro IL-6 and TNF- α , poškození remodelingu nukleozomu na úrovni IL-12p35 promotoru a v konečném důsledku k poklesu produkce prozánětlivých cytokinů IL-12p70, IL-6 a TNF- α . To následně zapříčiňuje inhibici dendritickými buňkami zprostředkované aktivace T-lymfocytů, pro kterou jsou prozánětlivé cytokiny potřebné. Lokální interakce Salp15 s dendritickými buňkami poskytuje výhodu nejen klíštěti, které může sát na hostiteli delší dobu, ale také usnadňuje infekci spirochétám *B. burgdorferi*. (Hovius et al., 2008).

Oba děje (vazba Salp15 na CD4 molekulu Th lymfocytu i inhibice prozánětlivých cytokinů vazbou na DC-SIGN) vedou k poklesu počtu efektorových T-lymfocytů a oslabení specifické imunity hostitele (Hovius et al., 2008).

K vyvolání alergického astmatu je potřebná aktivace Th2 CD4⁺ T-lymfocytů. Th2 buňky produkují cytokiny IL-4, IL-5 a IL-13, jež způsobují izotypový přesmyk B-lymfocytů zapříčiňující produkci protilátek IgE. Protože Salp15 inhibuje signalizaci T-lymfocytů, předpokládá se, že by mohl zabránit patologickému působení CD4⁺ T-lymfocytů v myším modelu alergického astmatu. Skutečně se ukázalo, že Salp15 dokázal redukovat všechny

zkoumané rysy astmatu včetně bronchiální hyperreaktivity, eozinofilie a produkce IL-4, IL-5 a IL-13 efektorovými Th lymfocyty. Vliv proteinu Salp15 na alergické astma se velmi podobal vlivu histamin vázajícího proteinu Ra-HBP2 (Paveglio et al., 2007).

Salp15 by mohl znamenat pokrok v léčbě onemocnění HIV. Virus lidské imunodeficiency HIV způsobuje nemoc AIDS neboli syndrom získané imunitní nedostatečnosti. Infekce savčích buněk závisí na specifické interakci mezi obalovými proteiny viru a povrchovými proteiny hostitelské buňky. Počáteční interakce mezi virovým obalovým glykoproteinem gp120 a koreceptorem CD4 T-lymfocytu způsobuje konformační změnu, která umožňuje glykoproteinu interagovat s jedním z chemokinových koreceptorů (CCR5 nebo CXCR4) na povrchu savčí buňky. Po interakci mezi gp120 a chemokinovým koreceptorem dochází ve spolupráci s dalším glykoproteinem gp41 ke splynutí buněčné membrány s obalem viru a proniknutí virových částic do buňky. Cílem současných studií je blokovat interakci mezi gp120 a CD4 nebo blokovat fúzi virové a buněčné membrány. Protože se vazebné místo Salp15 na CD4 molekule může překrývat s místem vazby gp120, protein Salp15 byl zkoumán jako potencionální blokátor gp120-CD4 interakce. Výsledky experimentu ukázaly, že Salp15 interaguje s obalovým glykoproteinem gp120 viru HIV-1, neutralizuje ho a zabraňuje jak interakci gp120-CD4, tak i fúzi virové a hostitelské buňky. Salp15 může proto posloužit jako nový templát pro identifikaci epitopů přítomných na obalovém proteinu, které by mohly mít přínos v rámci výroby neutralizační protilátky (Juncadella et al., 2008).

Salp15 nepřináší bakterii *Borrelia burgdorferi* výhodu jen ve smyslu oslabené imunity modulací funkce dendritických buněk a T-lymfocytů, ale také přímou vazbou na její povrchový protein OspC, čímž bakterii chrání před protilátkami zprostředkovanou imunitní odpovědí hostitele. *B. burgdorferi* je přenašečem infekčního onemocnění lymeské boreliózy, proti kterému není zatím dostupná vakcinace. Myši, kterým bylo podáno Salp15 antisérum byly výrazně ochráněny před infekcí *B. burgdorferi*. Antisérum dále značně zvýšilo ochrannou funkci protilátek proti antigenům *B. burgdorferi* jako je OspA nebo OspC. Cílení na klíčecí protein, jenž patogenům usnadňuje přenos do hostitele, přináší nový pohled na vývoji vakcín, které se v tradičním pojetí zaměřují přímo na samotný patogen nebo bakteriální toxin (Dai et al., 2009).

6.5 SIALOSTATIN L

Sialostatin L je členem proteinové rodiny cystatinů nalezený ve slinách klíštěte *Ixodes scapularis* (Kotsyfakis et al., 2006). Tato rodina zahrnuje pevně se vázající reverzibilní

inhibitory cysteinových proteáz. Existují 4 skupiny cystatinů – cystatiny prvního typu (stefiny), druhého typu, třetího typu (kininogeny) a čtvrtého typu (fetuiny). Sialostatin L patří mezi cystatiny druhého typu, který své pojmenování dostal podle své vysoké afinity ke katepsinu L, nicméně byl prokázán i jeho inhibiční efekt na katepsin V, C, X, S a papain. Sialostatin L inhibuje proliferaci buněčné linie CTLL-2 a vykazuje protizánětlivou aktivitu (Chmelař et al., 2017; Kotsyfakis et al., 2006).

Lysozomální proteázy katepsiny se účastní dvou procesů potřebných k prezentaci antigenů s MHC II komplexem. První proces zahrnuje štěpení endocytovaných antigenů na antigenní peptidy. Během druhého nezbytného procesu dochází k degradaci invariantního řetězce, který na MHC II blokuje vazebné místo pro antigen. Až po odblokování tohoto místa je komplexu MHC II umožněno vázat peptid (Villadangos et al., 1999). Sialostatin L inhibuje proliferaci CD4⁺ T-lymfocytů, neboť v důsledku inhibice cystatinu S, který je zodpovědný za degradaci invariantního řetězce komplexu MHC II, je porušena funkce dendritických buněk prezentovat antigeny. Sialostatin L dále inhibuje maturaci dendritických buněk, produkci jejich cytokinů IL-12 a TNF- α a redukuje expresi molekul CD80 a CD86. (Sá-Nunes et al., 2009).

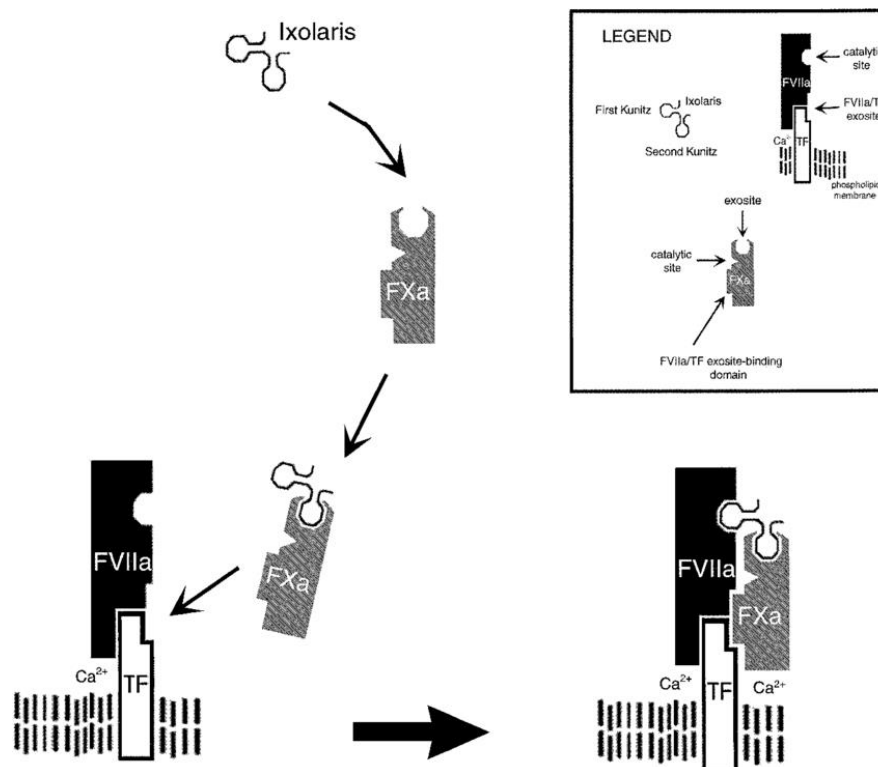
Schopnost Sialostatinu L modulovat funkci dendritických buněk, a tím i proliferaci CD4⁺ T-lymfocytů, byla využita ve zvířecím modelu se zkratkou EAE (experimentální autoimunitní encefalomyelitida), který se používá jako ekvivalent lidské roztroušené sklerózy (Sá-Nunes et al., 2009). Tato choroba postihuje zejména mladé dospělé jedince se souborem genetických predispozic a pravděpodobně vyžaduje spouštěč v podobě vnějšího zásahu, kterým může být například virová infekce. Mezi zásadní události počátku onemocnění patří aktivace CD4⁺ autoreaktivních T-lymfocytů a jejich diferenciaci v Th1 fenotyp (Sospedra and Martin, 2005). Autoreaktivní T-lymfocyty útočí proti myelinovým obalům centrální nervové soustavy. V myelinové vrstvě se nacházejí terče této autoreaktivity – myelinový bazický protein MBP a myelinový oligodendrocytární glykoprotein MOG. Podání Sialostatinu L oddálilo rozvoj EAE, zmírnilo symptomy nemoci a potlačilo produkci cytokinů IFN- γ a IL-17, které se na patogenezi nemoci podílejí. Buňky lymfatických uzlin byly navíc méně citlivé na restimulaci glykoproteinem MOG (Sá-Nunes et al., 2009).

Sialostatin L silně inhibuje produkci cytokinu IL-9, čehož se dá využít k léčbě alergického astmatu. Původně se předpokládalo, že IL-9 je spolu s cytokiny IL-4, IL-5 a IL-13 produkován lymfocyty Th2. Nakonec se však ukázalo, že tento interleukin může být také produkován žírnými buňkami, eosinofily a lymfocyty Th9. IL-9 je cytokin s pleiotropním efektem, jenž

podporuje rozvoj alergického astmatu například tím, že řídí expresi Th2 cytokinů, a tím i produkci protilátek třídy IgE. Sialostatin L v experimentálním modelu astmatu díky své schopnosti inhibovat produkci IL-9 Th9 lymfocyty téměř úplně zabránil bronchiální hyperreaktivitě, celulární infiltraci a produkci hlenu (Horká et al., 2012). Jak už bylo zmíněno, IL-9 může být produkován například i žírnými buňkami. I takto produkováný IL-9 samozřejmě přispívá k rozvoji astmatických symptomů. Produkce IL-9 může být zvýšena pomocí IL-1, IL-10 nebo TLR4 ligandu LPS. Sialostatin L inhibuje produkci cytokinů IL-9 a IL-1 β žírnými buňkami, zatímco degranulace buňky a produkce IL-6 zůstává neovlivněna. Přidání exogenního IL-1 β významně narušilo supresorovou aktivitu Sialostatinu L. Ukázalo se, že Sialostatin L v tomto případě cílí na transkripční faktor IRF4 (interferon regulační faktor 4), který se váže na promotory genů pro IL-1 β a IL-9 a který za normální situace zvyšuje expresi těchto cytokinů. Inhibice IRF4 Sialostatinem L redukovala projevy astmatu jako je například eozinofilie nebo bronchiální hyperreaktivita. Regulace promotoru genu pro IL-9 je v žírných buňkách a T-lymfocytech v některých věcech podobná, v jiných zase odlišná. To, že Sialostatin L inhibuje produkci IL-9 oběma těmito buněčnými typy, naznačuje, že působí na molekuly, které se na produkci tohoto cytokinu podílejí v obou typech těchto buněk. Takovou molekulou je právě i zmíněný IRF4 (Klein et al., 2015).

6.6 IXOLARIS

Ze slin klíštěte *Ixodes scapularis* byl izolován protein Ixolaris, který ovlivňuje koagulační kaskádu hostitele inhibicí komplexu FVIIa/TF, čímž zabraňuje aktivaci faktoru X. Uvolnění tkáňového faktoru (TF) v důsledku poškození cévy je zásadním krokem aktivace vnější cesty hemokoagulační kaskády. TF se váže na faktor VIIa a vzniklý komplex FVIIa/TF dále přeměňuje FX na jeho aktivovanou podobu FXa. Tento sled událostí vede k tvorbě trombinu a fibrinu. Protein Ixolaris se váže na lešení, které představuje zymogen FX nebo jeho aktivovaná forma FXa, a zapříčiňuje zformování pevného komplexu FVIIa/TF/Ixolaris/FX(a), přičemž aktivní místo faktoru VIIa je proteinem Ixolaris inaktivované (Obr. 6) (Francischetti et al., 2002). Co se týče faktoru Xa, Ixolaris nevyužívá k vazbě jeho aktivní místo, ale vazebné místo pro heparin. V případě FX se jedná o prekurzor vazebného místa pro heparin. (Monteiro et al., 2005). Takový mechanismus inhibice, kdy se Ixolaris může vázat jak k FXa, tak k jeho neaktivované formě FX, se zdá být velice efektivní, neboť umožňuje komplexu Ixolaris/FX inhibovat FVIIa/TF *in vivo* nezávisle na produkci FXa (Francischetti et al., 2002).



Obr. 6: Mechanismus účinku proteinu Ixolaris (Francischetti et al., 2002).

Abnormální exprese TF byla zdokumentovaná u mnoha typů nádorů a zdá se, že přímo koreluje s agresivním chováním tumoru. TF podněcuje progresi nádoru nejen aktivací koagulace, ale i přímou signalizací. TF a další enzymy koagulační kaskády jsou totiž rozeznávány proteázami aktivovanými receptory (PARs). V případě rakovinných buněk vede aktivace PARs k migraci, invazi, proliferaci, inhibici apoptózy, vzniku metastáz a k produkci faktorů podporující agresivní chování nádoru. Mezi tyto faktory patří vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), IL-8, metaloproteázy a další. Glioblastom (GBM) je velice agresivní tumor vykazující vysokou úmrtnost a rezistenci k léčbě. Kvůli vysoké přítomnosti VEGF se jedná o jeden z nejvíce vaskularizovaných maligních nádorů. Protein Ixolaris je slibným kandidátem pro protinádorovou terapii, neboť inhiboval progresi glioblastomu, snížil expresi VEGF a redukoval tím vaskularizaci nádoru (Carneiro-Lobo et al., 2009). Podobný efekt mělo podání proteinu Ixolaris i v případě melanomu (de Oliveira et al., 2012). Přestože poločas rozpadu tohoto proteinu je poměrně dlouhý (> 24 h), jeho opakované podání nemělo ani v jednom případě za následek krvácení, které hrozí jako vedlejší účinek léčby antikoagulanty (Carneiro-Lobo et al., 2009; de Oliveira et al., 2012). Na modelu rakoviny prsu bylo prokázáno, že vyšší koncentrace proteinu Ixolaris inhibují aktivaci PAR2, která je zprostředkována komplexem TF-FVIIa, nezávisle na přítomnosti FX(a), který zvyšuje afinitu

proteinu Ixolaris ke komplexu TF-FVIIa. Místo, kde se Ixolaris váže k FVIIa, se totiž překrývá s místem, kde FVIIa váže PAR2 (Carneiro-Lobo et al., 2012).

Ixolaris by dále mohl nalézt své využití v nukleární medicíně, neboť po navázání na izotop technecia (^{99m}Tc) rozpoznává TF, který astrocyty v případě glioblastomu zvýšeně produkují (Barboza et al., 2015). V roce 2010 byly popsány čtyři klinicky relevantní subtypy glioblastomu – proneurální, neurální, klasický a mezenchymální (Verhaak et al., 2010). Klasický subtyp vykazuje vyšší expresi TF a PAR1 než ostatní subtypy. Použití ^{99m}Tc -Ixolaris by proto mohlo sloužit k zobrazení hladiny TF a identifikaci specifické skupiny pacientů, které by mohla prospívat léčba zaměřená proti TF (Barboza et al., 2015).

Abnormální produkce TF je pozorovaná i v případě HIV. Určitá skupina monocytů v rámci patogeneze tohoto virového onemocnění zvýšeně produkuje TF jako odpověď na stimulaci TLR. Tím dochází k aktivaci vnější koagulační kaskády a k tvorbě FXa, trombinu a fibrinu. Když jsou tyto faktory degradovány, vznikají koagulační markery D-dimery. Stejná podskupina monocytů navíc produkuje zánětlivé cytokiny IL-1 β , IL-6 a TNF- α . Právě proto hrozí pacientům s HIV zvýšené riziko neinfekčních chronických komplikací jako jsou kardiovaskulární a tromboembolická onemocnění, a s tím spojená zvýšená úmrtnost. Podání proteinu Ixolaris snížilo hladinu D-dimerů, aktivitu TF a aktivaci monocytů i T-lymfocytů. Současně však nebyla pozorována změna v monocytární expresi TF ani v produkci cytokinů, což naznačuje, že Ixolaris přímo neovlivňuje odpověď těchto buněk na stimulaci TLR (Schechter et al., 2017).

6.7 AMBLYOMIN-X

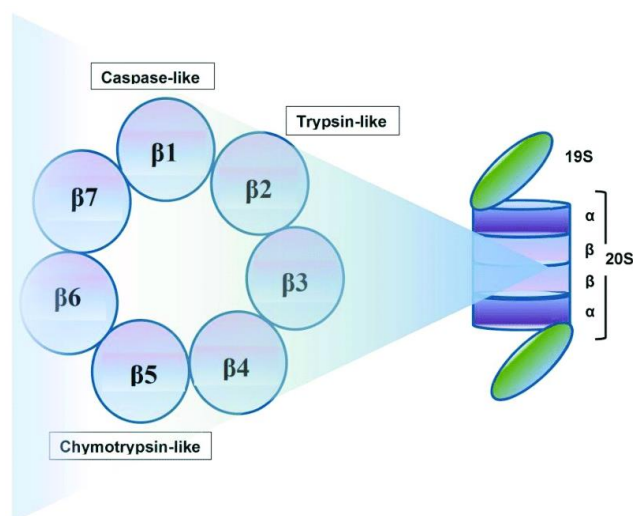
Vliv na nádorové buňky má vedle proteinu Ixolaris také inhibitor serinových proteáz Kunitzova typu Amblyomin-X, který byl izolován ze slin klíštěte *Amblyomma cajennense*. Tento protein má schopnost inhibovat enzym FXa a indukovat apoptotickou buněčnou smrt (Batista et al., 2010; Chudzinski-Tavassi et al., 2010).

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt je v rámci přirozeného vývoje hlavním mechanismem kontroly počtu buněk a proliferace. Je důležitá v žádoucích procesech jako je například eliminace autoreaktivních lymfocytů, ale v případě jejího defektu může dojít ke vzniku nesmrtelných buněčných klonů – rakovině (Ghobrial et al., 2005).

Renální karcinom je nejčastěji se vyskytující a kvůli rezistenci k chemoterapii i radioterapii také nejnáročněji léčitelný nádor ledvin. Po podání Amblyominu-X vykazovaly nádorové buňky morfologické změny svědčící o probíhající apoptóze. Byly pozorovány

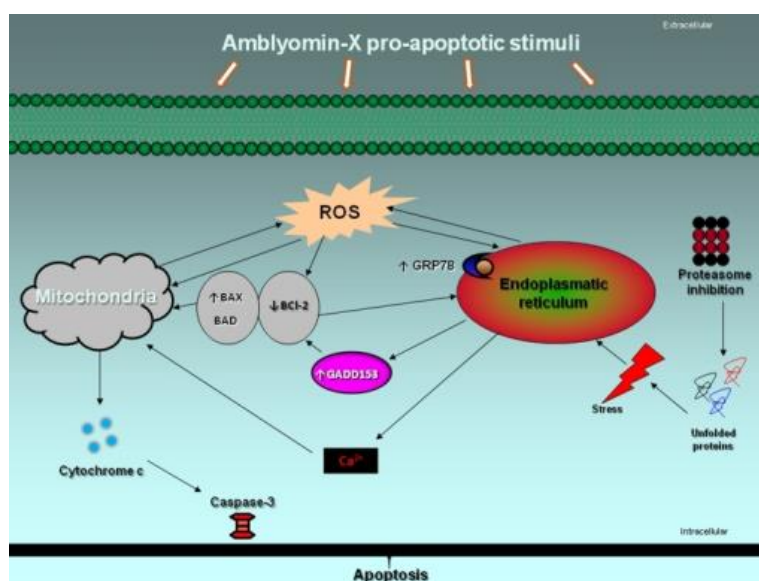
váčekovitě vyrůstky z membrány, sraštění buněk, fragmentace DNA i přítomnost fosfatidylserinu na povrchu buněk. Vysunutí fosfatidylserinu na vnější stranu membrány je signálem pro makrofágy, aby byla takto označená buňka eliminována fagocytózou (Akagi et al., 2012).

Účinky Amblyominu-X byly také studovány na myším modelu melanomu a adenokarcinomu slinivky. Oba tyto nádory jsou často rezistentní k chemoterapii a radioterapii, přičemž míra přežití u osob postižených pankreatickým adenokarcinomem je dokonce nižší než 5 %. Amblyomin-X indukoval regresi objemu melanomu a snížil životaschopnost rakovinných buněk prostřednictvím apoptózy, přičemž normální buňky zůstaly neovlivněny. Ačkoliv v obou typech buněčných linií byly pozorovány změny v genové expresi, jen některé změny byly společné oběma. Jednalo se například o zvýšenou expresi genu kódující $\beta 2$ podjednotku proteazomu. 20S proteazom obsahuje aktivní místa s aktivitou podobnou chymotrypsinu, trypsinu a kaspázám (Obr. 7). Podání Amblyominu-X způsobilo ztrátu trypsin-like aktivity, čímž se jeho účinky liší od běžných proapoptotických inhibitorů proteazomu, které inhibují chymotrypsin-like aktivitu proteazomu. Jelikož inhibice proteazomu může vést k zpětnovazebné aktivaci genů pro proteazom, pozorovaná zvýšená exprese genu kódující $\beta 2$ podjednotku není s inhibicí proteazomu v rozporu (Chudzinski-Tavassi et al., 2010). V jiném experimentu se stejnými nádorovými liniemi, jehož výsledky byly v souladu s experimentem předchozím, bylo navíc prokázáno, že i buňky rezistentní k léčivu bortezomib jsou citlivé k účinkům Amblyominu-X. Bortezomib je inhibitor proteazomu schválený Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv, jenž cílí na $\beta 5$ podjednotku s chymotrypsin-like aktivitou. (Morais et al., 2016).



Obr. 7: Struktura proteazomu ⁵.

Podrobněji byly apoptotické mechanismy Amblyominu-X zkoumány na myším modelu renálního adenokarcinomu (Obr. 8). Amblyomin-X způsobuje nerovnováhu mezi proapoptotickými a protiapoptotickými proteiny rodiny Bcl-2, které se nacházejí na vnější mitochondriální membráně. Zatímco protiapoptotické proteiny tuto membránu stabilizují, ty proapoptotické indukují uvolnění cytochromu c, což vede k přerušení elektronového transportního řetězce, produkci ROS a aktivaci kaspázové kaskády vyúsťující v apoptózu. Jelikož je Amblyomin-X inhibitorem proteazomu, způsobuje apoptózu také prostřednictvím stresu endoplazmatického retikula (ER). Když je inhibovaná funkce proteazomu, který tím pádem není schopný degradovat špatně složené proteiny, takové proteiny se začnou hromadit v endoplazmatickém retikulu, kde způsobují stres a s tím spojené důsledky ve formě zvýšení koncentrace volných intracelulárních vápenatých iontů. Uvolnění Ca^{2+} aktivuje signální protektivní dráhu UPR (unfolded protein response), která redukcí syntézy nových proteinů zabraňuje hromadění proteinů s konformačním defektem. Toho je dosaženo aktivací chaperonu GRP78 (glucose-regulated protein) a transkripčního faktoru GADD153, který potlačuje promotor Bcl-2 a způsobí vyšší citlivost mitochondrie na podněty proapoptotických členů proteinové rodiny Bcl-2 - Bax a Bad. Mezi mitochondriální dysfunkcí, produkcí ROS a stresem endoplazmatického retikula existuje vzájemný vztah. Jak mitochondriální dysfunkce, tak stres ER je schopen produkovat ROS. Stres ER i produkce ROS má naopak vliv na proteinovou rodinu Bcl-2 a na poškození mitochondrie (Maria et al., 2013). Podobný mechanismus byl popsán i v experimentu s nádorovými buněčnými liniemi melanomu a adenokarcinomu pankreatu (Morais et al., 2016).



Obr. 8: Proapoptotické mechanismy vlivu Amblyominu-X na buňky myšího renálního adenokarcinomu (Maria et al., 2013).

K protinádorovým účinkům Amblyominu-X přispívá jeho schopnost zpomalovat buněčný cyklus a inhibovat VEGF-A indukovanou angiogenezi. Na angiogenezi se podílejí adhezivní molekuly, mezi které patří i PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule), jež v případě rakovinných buněk zprostředkovává jejich proliferaci a vazbu na mikrovaskulární síť. Amblyomin-X inhibuje adhezi a proliferaci endoteliálních buněk tím, že inhibuje expresi molekuly PECAM-1 (Drewes et al., 2012).

Možným důvodem, proč jsou účinkem Amblyominu-X postiženy pouze nádorové buňky, může být fakt, že dělicí se buňky jsou více citlivé na inhibici proteazomu než buňky klidové. To je způsobeno tím, že mnoho důležitých kontrolních bodů v buněčném cyklu je regulováno aktivitou proteazomu (Maria et al., 2013).

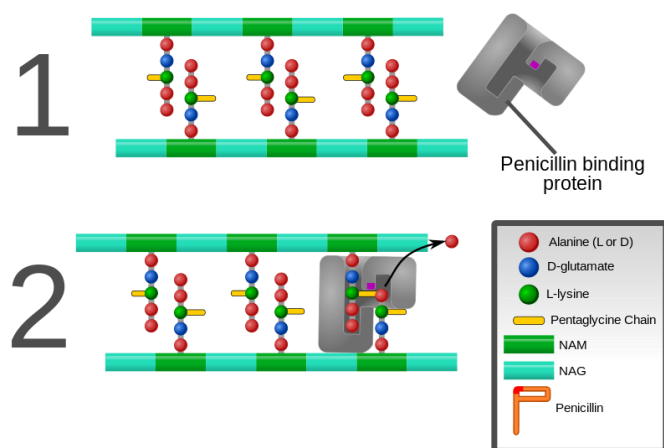
6.8 IAFGP

Řada organismů si vyvinula mechanismus, který jim umožňuje zvládat nízké teploty. Jedním z takových mechanismů je syntéza nemrznoucích bílkovin AFPs (antifreeze proteins), které vážou ledové krystaly, inhibují růst a rekrytalizaci ledu, snižují bod tuhnutí a za nízkých teplot stabilizují buněčnou membránu. Jelikož je klíště *Ixodes scapularis* sezónně vystaveno nízkým teplotám, vyvinulo si podobnou ochranu v podobě glykoproteinu IAFGP. Expresi tohoto proteinu navíc ještě zvyšuje přítomnost bakterie *Anaplasma phagocytophilum*, která tím, že umožňuje klíštěti přežít v nízkých teplotách, nepřímo zvyšuje vlastní šance na to být přenesena do hostitele (Neelakanta et al., 2010).

Ukázalo se, že glykoprotein IAFGP by mohl být využit v boji proti antibiotické rezistenci, která kvůli širokému užívání antibiotik vzniká (Abraham et al., 2017). Významný podíl na rezistenci má bakteriální biofilm. Biofilm je společenstvo nahromaděných jednobuněčných organismů, které přisedá k pevnému povrchu a je zapouzdřené v exopolysacharidové matrix. Když se bakterie vyskytují ve formě biofilmu, stávají se 10x – 1 000x odolnější proti antimikrobiálním vlivům jako jsou například antibiotika. Jelikož se biofilmy tvoří na mnoha medicínských nástrojích jako jsou katetry nebo umělé kyčelní klouby, jejich dopad na medicínu je značný. Uvádí se, že tvorba biofilmu je spojena s 65 % infekcí, které jsou v příčinné souvislosti s hospitalizací pacientů v medicínských zařízeních. Náročná léčba takových infekcí v důsledku jejich rezistence k baktericidním prostředkům stojí více než miliardu dolarů ročně (Mah and O'Toole, 2001). Za 20 % infekcí asociovaných s použitím katetru může gram pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*. Glykoprotein IAFGP inhibuje biofilm této bakterie a její meticilin rezistentní formy (MRSA). Vliv IAFGP na tvorbu biofilmu ve spojitosti s biomateriály byl zkoumán v pokusu, ve kterém byly intravenózní

katetry inkubovány s IAFGP. Katetry pokryté vrstvou IAFGP vykazovaly ve srovnání s kontrolou redukcí tvorby biofilmu a 40x méně přisedlých bakterií *S. aureus* (Heisig et al., 2014).

IAFGP se váže na terminální aminokyselinový zbytek (D-alanin) peptidoglykanu, prostřednictvím čehož dochází k porušení syntézy peptidoglykanu a k inhibici bakteriálního biofilmu. Při syntéze peptidoglykanu dochází k přemostění mezi třetím aminokyselinovým zbytkem donorového peptidového řetězce a mezi čtvrtým zbytkem akceptorového vlákna. Přemostění je katalyzované transpeptidázovými enzymy patřícími do rodiny proteinů vázající penicilin (PBP). Během tohoto procesu se terminální pátý zbytek (D-alanin), který je vazebným místem IAFGP, odštěpuje (Obr. 9). Podání IAFGP zvyšuje propustnost peptidoglykanu a usnadňuje tak antibiotikům proniknout do buňky (Abraham et al., 2017).



Obr. 9: Napojení zbytku polypeptidového řetězce na řetězec sousedního peptidoglykanu transpeptidázovým enzymem ⁶.

IAFGP pracuje v synergii s antibiotiky patřícími do několika skupin. Konkrétně se jedná o gentamicin (skupina aminoglykosidů), ciprofloxacin (fluorochinolonové antibiotikum) a daptomycin (skupina lipopeptidů). Spolupráce s antibiotiky jako je vankomycin nebo skupina β -laktamů však pozorována nebyla. Vankomycin totiž s glykoproteinem IAFGP sdílí stejné vazebné místo na peptidoglykanu – terminální D-alanin. Betalaktamová antibiotika jsou zase analogem terminálních zbytků peptidoglykanu, v důsledku čehož dochází k navázání IAFGP přímo na tato antibiotika a k inhibici jejich účinku (Abraham et al., 2017).

7 DISKUZE

Aby klíště zabránilo imunitnímu systému hostitele vypudit ho z místa sání a přerušit tak sání krve, vyvinulo si látky, které proti obranným reakcím hostitele bojují. Ve slinách klíšťat tak můžeme nalézt molekuly působící proti zánětu, srážení krve, složkám komplementu i aktivaci lymfocytů (Kazimírová and Štibrániová, 2013). Jelikož právě takové procesy jsou podkladem mnoha různých onemocnění, začaly se molekuly izolované z klíštěcích slin testovat pro jejich možné využití v humánní medicíně (Tab. I.).

Ačkoliv se využití běžně nebezpečných živočichů ve prospěch člověka může zdát nezvyklé, již texty ze starověkého Řecka a Říma obsahují popis léčebné kúry pomocí pijavic, které se dodnes v některých částech světa používají k lepšímu hojení ran po plastických operacích. Některé látky, jako například antikoagulant hirudin z pijavic nebo analgetikum ziconotide z hadího jedu, byly dokonce schváleny pro lidské použití Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) (Cherniack, 2011).

Proces schvalování léků pro lidské použití se sestává z několika kroků. Klinickému testování musí vždy předcházet fáze preklinická, kdy je daná látka testovaná na zvířatech. Při tomto kroku je zjišťováno, zda použití látky nezpůsobuje chromozomální poškození nebo není v dávkách, které jsou považovány za efektivní, toxická. Následné klinické testování se skládá ze tří fází. První fáze se provádí na zdravých dobrovolnících a je zaměřená na to, jak se látka v organismu chová (její vstřebávání, distribuce, metabolizování a vylučování) a jaká je její bezpečná dávka. Během druhé fáze klinické studie je látka podávána osobám s onemocněním, proti kterému je potenciální lék zaměřen. Hodnotí se, v jakých dávkách je látka účinná, způsoby podání (např. zda je vhodnější podání orální nebo intravenózní) a interval mezi podáními. Látky, které vyhovují požadavkům, vstupují do třetí fáze, kde je snaha potvrdit předchozí výsledky na širší populaci a prozkoumat následky dlouhodobého užívání. Pokud lék projde všemi fázemi klinického testování, je možné jej předložit k zaregistrování. Některá schválení léků obsahují podmínku doplňkové klinické studie, během níž dochází po uvedení na trh například k ověřování vlivu léku na specifitější skupiny lidí, jako jsou třeba staří lidé. Dohromady trvá celý proces schválení nového léku přibližně 8 až 12 let (Lipsky and Sharp, 2001).

Tab. I: Shrnutí molekul klíčících slin s potenciálem využití v humánní medicíně.

Molekula	Klíště	Mechanismus účinku	Možné medicínské využití	Literatura
Evasin-1	<i>R. sanguineus</i>	Vazba chemokinů	Léčba plicní fibrózy	Russo et al., 2011
			Léčba GVHD	Castor et al., 2010
Evasin-3	<i>R. sanguineus</i>	Vazba chemokinů	Léčba reperfučního poškození myokardu	Montecucco et al., 2010
			Léčba akutní pankreatitidy	Montecucco et al., 2014
			Léčba artritidy	Déruaz et al., 2008
Evasin-4	<i>R. sanguineus</i>	Vazba chemokinů	Léčba ulcerózní kolitidy	Vieira et al., 2009
OmCI	<i>O. moubata</i>	Inhibice C5 složky komplementu	Léčba myasthenia gravis	Soltys et al., 2009
			Léčba reperfučního poškození myokardu	Pischke et al., 2017
			Léčba antifosfolipidového syndromu	Romay-Penabad et al., 2014
			Léčba paroxysmální noční hemoglobinurie	Kuhn et al., 2016
			Léčba trombotické mikroangiopatie	Goodship et al., 2017
Proteiny vázající histamin	<i>R. appendiculatus</i>	Vazba histaminu	Léčba alergického astmatu	Couillin et al., 2004
			Léčba syndromu akutní dechové tísně	Ryffel et al., 2005
Salp15	<i>I. scapularis</i>	Inhibice aktivace CD4 ⁺ T-lymfocytů	Léčba alergického astmatu	Paveggio et al., 2007
		Vazba CD4 molekuly	Vývoj vakcíny proti HIV	Juncadella et al., 2008
		Vazba na OspC <i>B. burgdorferi</i>	Vývoj vakcíny proti lymfské borelióze	Dai et al., 2009
Sialostatin L	<i>I. scapularis</i>	Inhibice cysteinových proteáz	Léčba roztroušené sklerózy	Sá-Nunes et al., 2009
		Inhibice IL-9	Léčba alergického astmatu	Horká et al., 2012; Klein et al., 2015
Ixolaris	<i>I. scapularis</i>	Inhibice TF	Léčba nádorových onemocnění	Carneiro-Lobo et al., 2009; de Oliveira et al., 2012; Barboza et al., 2015
			Léčba neinfekčních komplikací u HIV	Schechter et al., 2017
Amblyomin-X	<i>A. cajennense</i>	Indukce apoptózy, inhibice angiogeneze	Léčba nádorových onemocnění	Chudzinski-Tavassi et al., 2010; Akagi et al., 2012; Drewes et al., 2012; Maria et al., 2013; Morais et al., 2016
IAFGP	<i>I. scapularis</i>	Porušení syntézy peptidoglykanu	Léčba onemocnění s rezistencí k antibiotikům	Heisig et al., 2014; Abraham et al., 2017

Co se týče molekul klíštěcích slin, některé do určité fáze klinického testování vstoupily. Britská firma Akari therapeutics, která se zaměřuje na inhibitor komplementu OmCI (coversin), v prosinci roku 2017 zakončila druhou fázi testování léčby paroxysmální noční hemoglobinurie (PNH). U testovaných osob došlo ke snížení hodnot LDH (laktát dehydrogenázy) v daném čase na požadovanou hodnotu, čímž experiment splnil primární stanovený koncový bod ⁷. Firma současně nabírá osoby pro další klinické testy – konkrétně se jedná o osoby s PNH a atypickým hemolyticko-uremickým syndromem (aHUS) pro třetí fázi klinického testování ^{8,9} a o osoby postižené PNH s rezistencí na lék Eculizumab v důsledku polymorfismu C5 složky komplementu pro fázi druhou ¹⁰. Akari therapeutics také podle jejich stránek momentálně nabírá osoby pro druhou fázi klinických testů v souvislosti s puchýřnatým onemocněním bulózní pemfigoid (BP) a očním zánětlivým onemocněním s názvem atopická keratokonjunktivitida (AKC) ⁴.

Další látkou z klíštěcích slin, jež se dostala až do fáze klinických testů, je protinádorový Amblyomin-X. Tato první fáze testování, kterou prováděla brazilská farmaceutická firma União Química Farmacêutica Nacional S/A, byla však pozastavena ¹¹.

Dnes již neexistující firma Evolutec začala v roce 2005 testovat látku RaHBP2 (rEV131) v souvislosti s alergickou rýmou a v roce 2006 stejnou látku ve spojitosti s očním zánětem po operaci šedého zákalu. Oba tyto výzkumy dospěly do druhé fáze klinických testů, ale následně firma v lednu 2007 oznámila, že látka nebyla ani v jednom z případů účinná ^{12, 13, 14}.

Neúspěch firmy Evolutec není tak překvapivý, jak se může zdát, jelikož pouze 33 % látek, které vstoupí do klinického testování, úspěšně projde druhou fází (Lipsky and Sharp, 2001). Problémů, které u nových potenciálních léků mohou nastat, je hned několik.

U léků pocházejících z látek, které nejsou pro člověka přirozené, hrozí zvláště při opakovaném podání vznik imunitní reakce spojené s tvorbou protilátek. Ačkoli přesná předpověď míry imunogenicity zůstává předmětem debat, obecně platí, že čím méně „lidský“ protein je, tím je pravděpodobnost vzniku imunitní odpovědi vyšší (Déruaz et al., 2013). Existuje však několik možností, jak potenciální imunogenicitu snížit. Dvěma nejznámějšími posttranslačními modifikacemi jsou PEGylace, neboli navázání netoxického polyethylenglykolu na molekulu proteinu, a glykosylace, kdy je navázán cukr. Snížení imunogenicity se dá docílit také modifikací proteinové sekvence, jejímž výsledkem je vyjmutí potenciálních T buněčných epitopů. Co se týče protilátek, veliké úsilí je vkládáno do metody humanizace, při které jsou hypervariabilní oblasti myší protilátky přeneseny na strukturní základ protilátky lidské. Další metodou je fúze proteinu s Fc částí lidské IgG protilátky (De

Groot and Scott, 2007). Těto metody se dá využít i v situaci, kdy je kvůli nízké molekulové hmotnosti proteinu nutno prodloužit jeho životnost v organismu. Při příliš krátké životnosti látky totiž není možné podávat lék orální cestou, což by v případě chronických obtíží znamenalo vpichování injekcí v krátkých intervalech, a to pro pacienty není zrovna vyhovující. Fúze byla z důvodu nízké molekulové hmotnosti provedena i s klíčtčím Evasinem-4, avšak s neuspokojivým výsledkem. Zfúzovaný ekvivalent zcela ztratil účinnost *in vivo*, ačkoliv jeho neutralizační aktivita *in vitro* zůstala zachována. Z toho důvodu by zřejmě bylo možno použít Evasin-4 pouze k léčbě potíží akutního charakteru, při kterých krátká životnost molekuly nepředstavuje překážku (Bonvin et al., 2016). Příkladem úspěšné fúze je lék používaný k léčbě mnoha typů zánětů s názvem Enbrel, který se skládá z nosiče IgG1 a rozpustného TNF receptoru druhého typu (De Groot and Scott, 2007).

Ačkoliv se případná imunogenicita molekul klíčtčích slin může zdát jako závažný problém, podle programu TEPITOPE a Antipred obsahuje interferon β , jeden z nejpoužívanějších prostředků k léčbě roztroušené sklerózy, více CD4⁺ T buněčných epitopů než Evasin-4 (Bonvin et al., 2016). Ani v případě, kdy byla zkoumána účinnost Evasinu-1 v rámci léčby plicní fibrózy, nebyla u myši po dlouhodobém podkožním podávání (2x denně po dobu 25 dní) detekována žádná odpověď protilátek (Russo et al., 2011). Důvodem může být to, že evasiny patří mezi vysoce glykosylované proteiny (Bonvin et al., 2016), což jak bylo zmíněno výše, snižuje případnou imunogenicitu. Imunitní odpověď nebyla pozorována ani po 7 dnech každodenního podávání proteinu OmCI (Hepburn et al., 2007). Podle některých názorů nejsou proteiny z klíčtčích slin imunogenní, jelikož klíšť zůstává na hostitele přisáté až po dobu dvou týdnů bez toho, aby imunitní odpověď byla navozena (Hepburn et al., 2007). Je však třeba mít na paměti, že klíšťčí sliny jsou směsí mnoha různých látek s různými funkcemi, které se na zamezení imunitní odpovědi podílejí. Při podání pouze jednoho klíšťčího proteinu by tak nemuselo být dosaženo stejného výsledku. Nízká imunogenicita evasinů a OmCI by tudíž neměla být vnímána jako pravidlo.

Příčinou relativně nízké úspěšnosti látek v klinických testech může být také fakt, že ač mají experimentální modely lidských onemocnění veliký a nenahraditelný přínos, někdy je obtížné poznatky z nich přenést na skutečné lidské pacienty. Příkladem tohoto jevu může být EAE (experimentální autoimunitní encefalomyelitida) ve vztahu k roztroušené skleróze. Zatímco model EAE je založen na autoimunitních mechanismech CD4⁺ T-lymfocytů, u roztroušené sklerózy převládají lymfocyty CD8⁺. Podobné odlišnosti mohly být příčinou, proč například protilátky ustekinumab nebo anti-CD40L nepřinesly v klinickém testování tohoto

onemocnění očekávané výsledky (’t Hart et al., 2011). Proto by se i nadějně závěry experimentu, kdy byl na zvířecím modelu EAE vyzkoušen klíštěcí Sialostatin L (Sá-Nunes et al., 2009), měly brát s rezervou. Stejnému problému můžou čelit i evasiny, neboť jak už bylo zmíněno, existuje znatelný rozdíl v rekrutaci myších a lidských leukocytů (Bonvin et al., 2016), a proto i reálná účinnost evasinů v léčbě lidských onemocnění může být odlišná od myších modelů. Faktorů, které přispívají k odlišenému chování látek v myším a lidském organismu, je více – v důsledku velkého evolučního rozestupu mezi hlodavci a lidmi existují i ve funkci přirozené a adaptivní imunity rozdíly, které jsou navíc podpořeny faktem, že experimentální myši jsou ve většině případů geneticky homogenní a spadají do SPF (specific pathogen free) kategorie, tudíž není jejich imunitní systém vystaven okolním vlivům tak, jako je tomu u člověka (’t Hart et al., 2011).

Ačkoliv je cesta od preklinických testů až po schválení látky jako nového léku zdlouhavá, náročná a bohužel i kvůli vysoké ceně pro farmaceutické firmy často neatraktivní, není pochyb o tom, že každý jeden nový lék schopný někomu ulevit od obtíží je v medicínské sféře významný. Případné schválení některé látky izolované z klíštěcích slin by navíc mohlo pozměnit pohled obecné populace na dnes nenáviděná klíšťata jako taková.

8 ZÁVĚR

- Klíštěcí sliny obsahují molekuly s imunomodulačními a antihemostatickými účinky.
- Některé z molekul klíštěcích slin byly podrobeny experimentům na zvířecích modelech kvůli jejich potenciálnímu využití v humánní medicíně.
- Mezi takové molekuly patří evasiny, OmCI, Salp15, proteiny vázající histamin, Sialostatin L, Ixolaris, Amblyomin-X a IAFGP.
- Možnou překážkou ve vývoji takových léčiv je imunogenicita a nesnadná přenositelnost poznatků ze zvířecích modelů na člověka.

9 SEZNAM INTERNETOVÝCH ZDROJŮ

- ¹ <http://anesthesiology.pubs.asahq.org/data/Journals/JASA/931217/29FF1.png>
- ² <https://en.wikipedia.org/wiki/Chemokine#/media/File:ChtxChemokineStruct.png>
- ³ <https://ghr.nlm.nih.gov/art/large/myasthenia-gravis-neuromuscular-junction.jpeg>
- ⁴ <https://www.akaritx.com/overview/>
- ⁵ https://www.researchgate.net/figure/The-structure-of-the-26S-proteasome-comprises-a-20S-core-that-contains-active-enzymatic_fig1_316054858
- ⁶ https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d0/Penicillin_inhibition.svg/800px-Penicillin_inhibition.svg.png
- ⁷ <https://www.akaritx.com/phn-phase-ii-iii/>
- ⁸ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03829449?term=coversin&draw=1&rank=1>
- ⁹ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03588026?term=coversin&draw=1&rank=4>
- ¹⁰ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03427060?term=coversin&draw=1&rank=2>
- ¹¹ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT03120130?term=amblyomin-x&rank=1>
- ¹² <http://www.nanocotechnologies.com/system/files/uploads/financialdocs/2007-evolutec-group-plc-circ.pdf>
- ¹³ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00247520?term=rev131&rank=1>
- ¹⁴ <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00353964?term=rev131&rank=2>

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

't Hart, B.A., Gran, B., and Weissert, R. (2011). EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends Mol. Med.* *17*, 119–125.

Abraham, N.M., Liu, L., Jutras, B.L., Murfin, K., Acar, A., Yarovinsky, T.O., Sutton, E., Heisig, M., Jacobs-Wagner, C., and Fikrig, E. (2017). A tick antivirulence protein potentiates antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *61*, e00113-17.

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

Allen, S.J., Crown, S.E., and Handel, T.M. (2007). Chemokine:receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* *25*, 787–820.

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

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

Andrade, B.B., Teixeira, C.R., Barral, A., and Barral-Netto, M. (2005). Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An. Acad. Bras. Cienc.* *77*, 665–693.

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

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

Batista, I.F.C., Ramos, O.H.P., Ventura, J.S., Junqueira-de-Azevedo, I.L.M., Ho, P.L., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2010). A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. *Arch. Biochem. Biophys.* *493*, 151–156.

Beaufays, J., Adam, B., Menten-Dedoyart, C., Fievez, L., Grosjean, A., Decrem, Y., Prévôt, P.-P., Santini, S., Brasseur, R., Brossard, M., et al. (2008). Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* tick

- salivary LTB₄-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function. *PLoS One* 3, e3987.
- Binnington, K.C., and Kemp, D.H. (1980). Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission. *Adv. Parasitol.* 18, 315–339.
- Bonvin, P., Power, C.A., and Proudfoot, A.E.I. (2016). Evasins: therapeutic potential of a new family of chemokine-binding proteins from ticks. *Front. Immunol.* 7, 208.
- Bowman, A.S., Sauer, J.R., Zhu, K., and Dillwith, J.W. (1995). Biosynthesis of salivary prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 735–741.
- Carneiro-Lobo, T.C., Konig, S., Machado, D.E., Nasciutti, L.E., Forni, M.F., Francischetti, I.M.B., Sogayar, M.C., and Monteiro, R.Q. (2009). Ixolaris, a tissue factor inhibitor, blocks primary tumor growth and angiogenesis in a glioblastoma model. *J. Thromb. Haemost.* 7, 1855–1864.
- Carneiro-Lobo, T.C., Schaffner, F., Disse, J., Ostergaard, H., Francischetti, I.M.B., Monteiro, R.Q., and Ruf, W. (2012). The tick-derived inhibitor Ixolaris prevents tissue factor signaling on tumor cells. *J. Thromb. Haemost.* 10, 1849–1858.
- Castor, M.G.M., Rezende, B., Resende, C.B., Alessandri, A.L., Fagundes, C.T., Sousa, L.P., Arantes, R.M.E., Souza, D.G., Silva, T.A., Proudfoot, A.E.I., et al. (2010). The CCL3/macrophage inflammatory protein-1 α -binding protein Evasin-1 protects from graft-versus-host disease but does not modify graft-versus-leukemia in mice. *J. Immunol.* 184, 2646–2654.
- Cheng, Y., Wu, H., and Li, D. (1999). An inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the salivary glands of hard tick *Haemaphysalis longicornis* and its mechanism of action. *Sci. China Ser. C Life Sci.* 42, 457–464.
- Cherniack, E.P. (2011). Bugs as drugs, part two: worms, leeches, scorpions, snails, ticks, centipedes, and spiders. *Altern. Med. Rev.* 16, 50–58.
- Chmelař, J., Oliveira, C.J., Řezáčová, P., Francischetti, I.M.B., Kovářová, Z., Pejler, G., Kopacek, P., Ribeiro, J.M.C., Mares, M., Kopecký, J., et al. (2011). A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood* 117, 736–744.
- Chmelař, J., Calvo, E., Pedra, J.H.F., Francischetti, I.M.B., and Kotsyfakis, M. (2012). Tick

salivary secretion as a source of antihemostatics. *J. Proteomics* 75, 3842–3854.

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

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

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

Couillin, I., Maillet, I., Vargaftig, B.B., Jacobs, M., Paesen, G.C., Nuttall, P.A., Lefort, J., Moser, R., Weston-Davies, W., and Ryffel, B. (2004). Arthropod-derived histamine-binding protein prevents murine allergic asthma. *J. Immunol.* 173, 3281–3286.

Crooks, S., and Stockley, R. (1998). Leukotriene B4. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 173–178.

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

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

Decrem, Y., Beaufays, J., Blasioli, V., Lahaye, K., Brossard, M., Vanhamme, L., and Godfroid, E. (2008). A family of putative metalloproteases in the salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*. *FEBS J.* 275, 1485–1499.

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

- 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., et al. (2008). Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *J. Exp. Med.* *205*, 2019–2031.
- Déruaz, M., Bonvin, P., Severin, I.C., Johnson, Z., Krohn, S., Power, C.A., and Proudfoot, A.E.I. (2013). Evasin-4, a tick-derived chemokine-binding protein with broad selectivity can be modified for use in preclinical disease models. *FEBS J.* *280*, 4876–4887.
- Drewes, C.C., Dias, R.Y.S., Hebeda, C.B., Simons, S.M., Barreto, S.A., Ferreira, J.M., Chudzinski-Tavassi, A.M., and Farsky, S.H.P. (2012). Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. *Toxicon* *60*, 333–340.
- Fořtová M, Průša R, and Vajtr D (2013). Struktura, funkce a medicínský význam lipokalinů. *Biochem. Metab* *21*, 112–121.
- Francischetti, I.M.B., Valenzuela, J.G., Andersen, J.F., Mather, T.N., and Ribeiro, J.M.C. (2002). Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* *99*, 3602–3612.
- Francischetti, I.M.B., My Pham, V., Mans, B.J., Andersen, J.F., Mather, T.N., Lane, R.S., and Ribeiro, J.M.C. (2005). The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* *35*, 1142–1161.
- Frauenschuh, A., Power, C.A., Déruaz, M., Ferreira, B.R., Silva, J.S., Teixeira, M.M., Dias, J.M., Martin, T., Wells, T.N.C., and Proudfoot, A.E.I. (2007). Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *J. Biol. Chem.* *282*, 27250–27258.
- Fukumoto, S., Sakaguchi, T., You, M., Xuan, X., and Fujisaki, K. (2006). Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis. *Microvasc. Res.* *71*, 218–221.
- Ghobrial, I.M., Witzig, T.E., and Adjei, A.A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA. Cancer J. Clin.* *55*, 178–194.
- Gillespie, R.D., Dolan, M.C., Piesman, J., and Titus, R.G. (2001). Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *J. Immunol.* *166*, 4319–4326.

Goodship, T.H.J., Pinto, F., Weston-Davies, W.H., Silva, J., Nishimura, J.-I., Nunn, M.A., Mackie, I., Machin, S.J., Palm, L., Pryce, J.W., et al. (2017). Use of the complement inhibitor Coversin to treat HSCT-associated TMA. *Blood Adv.* 1, 1254–1258.

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

Guglielmone, A.A., Robbins, R.G., Apanaskevich, D.A., Petney, T.N., Estrada-Peña, A., Horak, I.G., Shao, R., and Barker, S.C. (2010). Article the Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa* 2528, 1–28.

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

Harnnoi, T., Sakaguchi, T., Nishikawa, Y., Xuan, X., and Fujisaki, K. (2007). Molecular characterization and comparative study of 6 salivary gland metalloproteases from the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 147, 93–101.

Hayward, J., Sanchez, J., Perry, A., Huang, C., Rodriguez Valle, M., Canals, M., Payne, R.J., and Stone, M.J. (2017). Ticks from diverse genera encode chemokine-inhibitory evasin proteins. *J. Biol. Chem.* 292, 15670–15680.

Heisig, M., Abraham, N.M., Liu, L., Neelakanta, G., Mattessich, S., Sultana, H., Shang, Z., Ansari, J.M., Killiam, C., Walker, W., et al. (2014). Antivirulence properties of an antifreeze protein. *Cell Rep.* 9, 417–424.

Hepburn, N.J., Williams, A.S., Nunn, M.A., Chamberlain-Banoub, J.C., Hamer, J., Morgan, P., and Harris, C.L. (2007). *In vivo* characterisation and therapeutic efficacy of a C5-specific inhibitor from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J. Biol. Chem.* 282, 8292–8299.

Hoogstraal, H., and Aeschlimann, A. (1982). Tick-host specificity. *Bull. La Soc. Entomol. Suisse* 5–32.

Horká, H., Staudt, V., Klein, M., Taube, C., Reuter, S., Dehzad, N., Andersen, J.F., Kopecky, J., Schild, H., Kotsyfakis, M., et al. (2012). The tick salivary protein Sialostatin L inhibits the Th9-derived production of the asthma-promoting cytokine IL-9 and is effective in the

prevention of experimental asthma. *J. Immunol.* *188*, 2669–2676.

Hovius, J.W.R., de Jong, M.A.W.P., den Dunnen, J., Litjens, M., Fikrig, E., van der Poll, T., Gringhuis, S.I., and Geijtenbeek, T.B.H. (2008). Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog.* *4*, e31.

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

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

Izabel, M., Mathias, C., and Furquim, K. (2011). Immunomodulatory effects of tick saliva. *Artic. Invertebr. Surviv. J.* *8*, 231–240.

Jaworski, D.C., Jasinskas, A., Metz, C.N., Bucala, R., and Barbour, A.G. (2001). Identification and characterization of a homologue of the pro-inflammatory cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in the tick, *Amblyomma americanum*. *Insect Mol. Biol.* *10*, 323–331.

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

Juncadella, I.J., Garg, R., Ananthnarayanan, S.K., Yengo, C.M., and Anguita, J. (2007). T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *49*, 433–438.

Juncadella, I.J., Garg, R., Bates, T.C., Olivera, E.R., and Anguita, J. (2008). The *Ixodes scapularis* salivary protein, Salp15, prevents the association of HIV-1 gp120 and CD4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *367*, 41–46.

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

Kazimírová, M. (2008). Pharmacologically active compounds in tick salivary glands. *Adv.Arachnol.Dev.Biol.* *12*, 281–296.

- Kazimírová, M., and Štibrániová, I. (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3.
- Keller, P.M., Waxman, L., Arnold, B.A., Schultz, L.D., Condraq, C., and Connollyqn, T.M. (1993). Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* 268, 5450–5456.
- King, T.E., Pardo, A., and Selman, M. (2011). Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* 378, 1949–1961.
- Klein, M., Brühl, T.-J., Staudt, V., Reuter, S., Grebe, N., Gerlitzki, B., Hoffmann, M., Bohn, T., Ulges, A., Stergiou, N., et al. (2015). Tick salivary Sialostatin L represses the initiation of immune responses by targeting IRF4-dependent transcription in murine mast cells. *J. Immunol.* 195, 621–631.
- Koh, C.Y., Kazimírová, M., Trimnell, A., Takac, P., Labuda, M., Nuttall, P.A., and Kini, R.M. (2007). Variegin, a novel fast and tight binding thrombin inhibitor from the tropical bont tick. *J. Biol. Chem.* 282, 29101–29113.
- Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Francischetti, I.M.B., Mather, T.N., Andersen, J.F., and Ribeiro, J.M.C. (2006). Antiinflammatory and immunosuppressive activity of Sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 281, 26298–26307.
- Kotsyfakis, M., Karim, S., Andersen, J.F., Mather, T.N., and Ribeiro, J.M.C. (2007). Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 282, 29256–29263.
- Kuhn, N., Schmidt, C.Q., Schlapschy, M., and Skerra, A. (2016). PASylated coversin, a C5-specific complement inhibitor with extended pharmacokinetics, shows enhanced anti-hemolytic activity *in vitro*. *Bioconjug. Chem.* 27, 2359–2371.
- Kusner, L.L., Kaminski, H.J., and Soltys, J. (2008). Effect of complement and its regulation on myasthenia gravis pathogenesis. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 4, 43–52.
- Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., and Godfroid, E. (2002). Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *J. Biol. Chem.* 277, 10083–10089.
- Lipsky, M.S., and Sharp, L.K. (2001). From idea to market: the drug approval process. *J. Am. Board Fam. Med.* 14, 362–367.

- Liyou, N., Hamilton, S., Elvin, C., Willadsen, P., Elvin, C., and Willadsen, P. (1999). Cloning and expression of ecto 5'-nucleotidase from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Insect Mol. Biol.* *8*, 257–266.
- van de Locht, A., Stubbs, M.T., Bode, W., Friedrich, T., Bollschweiler, C., Höffken, W., and Huber, R. (1996). The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *EMBO J.* *15*, 6011–6017.
- Luh, S., and Chiang, C. (2007). Acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* *8*, 60–69.
- Macedo-Ribeiro, S., Almeida, C., Calisto, B.M., Friedrich, T., Mentele, R., Stürzebecher, J., Fuentes-Prior, P., and Pereira, P.J.B. (2008). Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS One* *3*, e1624.
- Mah, T.F., and O'Toole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* *9*, 34–39.
- Mans, B., Gaspar, A.R.M., Louw, A., and Neitz, A.W. (1998). Purification and characterization of apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* *120*, 617–624.
- Mans, B.J., Louw, A.I., and Neitz, A.W.H. (2002). Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. *J. Biol. Chem.* *277*, 21371–21378.
- Maria, D.A., de Souza, J.G., Morais, K.L.P., Berra, C.M., Zampolli, H. de C., Demasi, M., Simons, S.M., de Freitas Saito, R., Chammas, R., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2013). A novel proteasome inhibitor acting in mitochondrial dysfunction, ER stress and ROS production. *Invest. New Drugs* *31*, 493–505.
- Montecucco, F., Lenglet, S., Braunersreuther, V., Pelli, G., Pellioux, C., Montessuit, C., Lerch, R., Deruaz, M., Proudfoot, A.E., and Mach, F. (2010). Single administration of the CXC chemokine-binding protein Evasin-3 during ischemia prevents myocardial reperfusion injury in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 1371–1377.
- Montecucco, F., Mach, F., Lenglet, S., Vonlaufen, A., Gomes Quinderé, A.L., Pelli, G.,

- Burger, F., Galan, K., Dallegri, F., Carbone, F., et al. (2014). Treatment with Evasin-3 abrogates neutrophil-mediated inflammation in mouse acute pancreatitis. *Eur. J. Clin. Invest.* *44*, 940–950.
- Monteiro, R.Q., Rezaie, A.R., Ribeiro, J.M.C., and Francischetti, I.M.B. (2005). Ixolaris: a factor Xa heparin-binding exosite inhibitor. *Biochem. J.* *387*, 871–877.
- Morais, K.L.P., Pacheco, M.T.F., Berra, C.M., Bosch, R. V., Sciani, J.M., Chammas, R., de Freitas Saito, R., Iqbal, A., and Chudzinski-Tavassi, A.M. (2016). Amblyomin-X induces ER stress, mitochondrial dysfunction, and caspase activation in human melanoma and pancreatic tumor cell. *Mol. Cell. Biochem.* *415*, 119–131.
- Motoyashiki, T., Tu, A.T., Azimov, D.A., and Ibragim, K. (2003). Isolation of anticoagulant from the venom of tick, *Boophilus calcaratus*, from Uzbekistan. *Thromb. Res.* *110*, 235–241.
- Narasimhan, S., Koski, R.A., Beaulieu, B., Anderson, J.F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., Cappello, M., and Fikrig, E. (2002). A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Mol. Biol.* *11*, 641–650.
- Neelakanta, G., Sultana, H., Fish, D., Anderson, J.F., and Fikrig, E. (2010). *Anaplasma phagocytophilum* induces *Ixodes scapularis* ticks to express an antifreeze glycoprotein gene that enhances their survival in the cold. *J. Clin. Invest.* *120*, 3179–3190.
- Nienaber, J., Gaspar, A.R., and Neitz, A.W. (1999). Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp. Parasitol.* *93*, 82–91.
- Nunn, M.A., Sharma, A., Paesen, G.C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A.C., and Nuttall, P.A. (2005). Complement inhibitor of C5 activation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J. Immunol.* *174*, 2084–2091.
- Oliveira, C.J.F., Sá-Nunes, A., Francischetti, I.M.B., Carregaro, V., Anatriello, E., Silva, J.S., Santos, I.K.F. de M., Ribeiro, J.M.C., and Ferreira, B.R. (2011). Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. *J. Biol. Chem.* *286*, 10960–10969.
- de Oliveira, A.D.S., Lima, L.G., Mariano-Oliveira, A., Machado, D.E., Nasciutti, L.E., Andersen, J.F., Petersen, L.C., Francischetti, I.M.B., and Monteiro, R.Q. (2012). Inhibition of tissue factor by Ixolaris reduces primary tumor growth and experimental metastasis in a

murine model of melanoma. *Thromb. Res.* 130, e163–e170.

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

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

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

Payne, V., and Kam, P.C.A. (2004). Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance. *Anaesthesia* 59, 695–703.

Pischke, S.E., Gustavsen, A., Orrem, H.L., Egge, K.H., Courivaud, F., Fontenelle, H., Despont, A., Bongoni, A.K., Rieben, R., Tønnessen, T.I., et al. (2017). Complement factor 5 blockade reduces porcine myocardial infarction size and improves immediate cardiac function. *Basic Res. Cardiol.* 112, 20.

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

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

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

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

Romay-Penabad, Z., Carrera Marin, A., Willis, R., Weston-Davies, W., Machin, S., Cohen, H., Brasier, A., and Gonzalez, E. (2014). Complement C5-inhibitor rEV576 (coversin) ameliorates in-vivo effects of antiphospholipid antibodies. *Lupus* 23, 1324–1326.

- Ruiz-Irastorza, G., Crowther, M., Branch, W., and Khamashta, M.A. (2010). Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 376, 1498–1509.
- Rumbaut, R.E., and Thiagarajan, P. (2010). Platelet-vessel wall interactions in hemostasis and thrombosis.
- Russo, R.C., Alessandri, A.L., Garcia, C.C., Cordeiro, B.F., Pinho, V., Cassali, G.D., Proudfoot, A.E.I., and Teixeira, M.M. (2011). Therapeutic effects of Evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 72–80.
- Ryffel, B., Couillin, I., Maillet, I., Schnyder, B., Paesen, G.C., Nuttall, P., and Weston-Davies, W. (2005). Histamine scavenging attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1056, 197–205.
- Sá-Nunes, A., Bafica, A., Antonelli, L.R., Choi, E.Y., Francischetti, I.M.B., Andersen, J.F., Shi, G.-P., Chavakis, T., Ribeiro, J.M., and Kotsyfakis, M. (2009). The immunomodulatory action of Sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. *J. Immunol.* 182, 7422–7429.
- Sangamnatdej, S., Paesen, G.C., Slovak, M., and Nuttall, P.A. (2002). A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect Mol. Biol.* 11, 79–86.
- Schechter, M.E., Andrade, B.B., He, T., Richter, G.H., Tosh, K.W., Policicchio, B.B., Singh, A., Raetz, K.D., Sheikh, V., Ma, D., et al. (2017). Inflammatory monocytes expressing tissue factor drive SIV and HIV coagulopathy. *Sci. Transl. Med.* 9, eaam5441.
- Schroeder, H., Daix, V., Gillet, L., Renauld, J.-C., and 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 Infect.* 9, 247–250.
- Schuijt, T.J., Coumou, J., Narasimhan, S., Dai, J., DePonte, K., Wouters, D., Brouwer, M., Oei, A., Roelofs, J.J.T.H., van Dam, A.P., et al. (2011). A tick mannose-binding lectin inhibitor interferes with the vertebrate complement cascade to enhance transmission of the Lyme disease Agent. *Cell Host Microbe* 10, 136–146.
- Schuijt, T.J., Bakhtiari, K., Daffre, S., Deponte, K., Wielders, S.J.H., Marquart, J.A., Hovius, J.W., Van Der Poll, T., Fikrig, E., Bunce, M.W., et al. (2013). Factor Xa activation of factor

- V is of paramount importance in initiating the coagulation system: Lessons from a tick salivary protein. *Circulation* 128, 254–266.
- Shim, W.-S., and Oh, U. (2008). Histamine-induced itch and its relationship with pain. *Mol. Pain* 4, 29.
- Soltys, J., Kusner, L.L., Young, A., Richmonds, C., Hatala, D., Gong, B., Shanmugavel, V., and Kaminski, H.J. (2009). Novel complement inhibitor limits severity of experimentally myasthenia gravis. *Ann. Neurol.* 65, 67–75.
- Sonenshine, D.E. (2014). Biology of ticks. In *Biology of Ticks Volume I*, p. 11–12, 39.
- Sospedra, M., and Martin, R. (2005). Immunology of multiple sclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 683–747.
- Tanaka, A.S., Andreotti, R., Gomes, A., Torquato, R.J., Sampaio, M.U., and Sampaio, C.A. (1999). A double headed serine proteinase inhibitor — human plasma kallikrein and elastase inhibitor — from *Boophilus microplus* larvae. *Immunopharmacology* 45, 171–177.
- Tyson, K., Elkins, C., Patterson, H., Fikrig, E., and de Silva, A. (2007). Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect Mol. Biol.* 16, 469–479.
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Mather, T.N., and Ribeiro, J.M. (2000). Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 275, 18717–18723.
- Valenzuela, J.G., Francischetti, I.M.B., Pham, V.M., Garfield, M.K., Mather, T.N., and Ribeiro, J.M.C. (2002). Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J Exp Biol* 205, 2843–2864.
- Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98–110.
- Vieira, A.T., Fagundes, C.T., Alessandri, A.L., Castor, M.G.M., Guabiraba, R., Borges, V.O., Silveira, K.D., Vieira, E.L.M., Gonçalves, J.L., Silva, T.A., et al. (2009). Treatment with a novel chemokine-binding protein or eosinophil lineage-ablation protects mice from experimental colitis. *Am. J. Pathol.* 175, 2382–2391.

- Villadangos, J.A., Bryant, R.A.R., Deussing, J., Driessen, C., Lennon-Dumenil, A.-M., Riese, R.J., Roth, W., Saftig, P., Shi, G.-P., Chapman, H.A., et al. (1999). Proteases involved in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* 172, 109–120.
- Wang, X., Coons, L.B., Taylor, D.B., Stevens, S.E., and Gartner, T.K. (1996). Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. *J. Biol. Chem.* 271, 17785–17790.
- Waxman, L., Smith, D.E., Arcuri, K.E., and Vlasuk, G.P. (1990). Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science* 248, 593–596.
- Wu, J., Wang, Y., Liu, H., Yang, H., Ma, D., Li, J., Li, D., Lai, R., and Yu, H. (2010). Two immunoregulatory peptides with antioxidant activity from tick salivary glands. *J. Biol. Chem.* 285, 16606–16613.
- Yu, D., Liang, J., Yu, H., Wu, H., Xu, C., Liu, J., and Lai, R. (2006). A tick B-cell inhibitory protein from salivary glands of the hard tick, *Hyalomma asiaticum asiaticum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343, 585–590.