

**Přírodovědecká fakulta  
Univerzita Karlova v Praze  
Katedra parazitologie**



## **Hyaluronidáza ve slinách ovádů a klíšťat**

Bc. Viktorie Tothová

Diplomová práce

Praha, 2010

Školitel: Prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury.

Viktorie Tothová

## Poděkování

Na tomto místě bych především chtěla poděkovat svému školiteli Prof. RNDr. Petru Volfovi CSc. za jeho bezmeznou trpělivost, pomoc a odborné rady.

Mé velké díky pak dále patří RNDr. Věře Volfové za pečlivé provedení všemi laboratorními postupy a za její asistenci při dílčích pokusech. RNDr. Janu Votýpkovi Ph.D. děkuji za rady a názorné ukázky práce v terénu, Mgr. Liboru Mikešovi Ph.D. za poskytnutí jedné z laboratorních metod, kterou jsem mohla použít ve svých pokusech a RNDr. Janu Ježkovi CSc. z Entomologického oddělení Národního muzea za neúnavnou pomoc a cenné rady při určování ovádů.

V neposlední řadě děkuji také také celému osazenstvu naší labortoře, ve které se mi dobře pracovalo, a celé katedře parazitologie za příjemné prostředí.

# Obsah

1. Abstrakt.....	6
2. Úvod a základní cíle.....	7
3. Literární přehled.....	8
3.1 Glykosaminoglykany .....	8
3.2 Hyaluronan.....	9
3.3 Hyaluronidázy, jejich typy a metody studia .....	12
3.3.1 Hyaluronidázy.....	12
3.3.2 Metody detekce a kvantifikace hyaluronidázové aktivity .....	15
3.4 Hyaluronidázy bezobratlých živočichů.....	17
3.4.1 Hyaluronidázy hlístic (Nematoda), pijavek a koryšů .....	17
3.4.2 Hyaluronidázy v jedech hmyzu a pavoukoců .....	18
3.5 Sliny krevsajících členovců .....	19
3.5.1 Slinné žlázy klíšťat (Ixodida) a jejich složení.....	20
3.5.2 Složení slin ovádů (Diptera: Tabanidae).....	21
3.5.3 Hyaluronidáza ve slinách krevsajících členovců .....	23
4. Metodika .....	26
4.1 Odchyt ovádů, pitva slinných žlaz a příprava vzorků.....	26
4.2 Detekce hyaluronidázové aktivity na mikrotitračních destičkách,      změření pH optima .....	28
4.3 Průkaz hyaluronidázy na substrátových gelech .....	30
4.4 SDS PAGE a barvení stříbřením.....	31
4.5 Průkaz hyaluronidázové aktivity pomocí zymografické analýzy na substrátovém gelu .....	32
4.6 Sledování citlivosti vzorků ovádů k SDS .....	34
5. Výsledky .....	35
5.1 Testování hyaluronidázové aktivity ve slinách klíštěte obecného .....	35
5.2 Přehled chycených ovádů, proteinové koncentrace jejich slinných žlaz .....	35
5.3 Měření pH optima a kvantifikace hyaluronidázové aktivity.....	37
5.4 Substrátové gely.....	42
5.5 Proteinové profily slinných žlaz .....	45
5.6 Zymografická analýza.....	47



5.7 Citlivost hyaluronidázy na SDS.....	49
6. Diskuze .....	50
7. Shrnutí.....	55
8. Přehled citované literatury .....	56

## 1. Abstrakt

Hyaluronidázy jsou významnou skupinou enzymů odpovědných za štěpení kyseliny hyaluronové, která je jednou z hlavních složek pojivové tkáně obratlovců. U většiny krevsajících členovců je tento enzym přítomen ve slinách a usnadňuje sání tím, že se podílí na průniku kůží a zvětšení potravní léze v místě bodnutí. Vzniklé fragmenty extracelulární matrix mohou navíc modulovat lokální imunitní odpověď hostitele a zvyšovat pravděpodobnost přenosu patogenů.

V naší práci jsme se zaměřili na průkaz hyaluronidázové aktivity u klíštěte *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) a zástupců čtyř rodů ovádů (Diptera: Tabanidae). V slinných žlázách klíšťat se hyaluronidázovou aktivitu detekovat nepodařilo. Naopak, ve slinných žlázách ovádů jsme prokázali velmi silnou aktivitu u všech studovaných druhů a dále ji charakterizovali biochemickými a elektroforetickými metodami. Hyaluronidázy ovádů štěpí hyaluronan i chondroitin sulfát; enzymy jednotlivých druhů se mírně liší molekulovou hmotností, pH optimumm a citlivostí k redukujícím podmínkám.

### Abstract (in English)

Hyaluronidases are an important group of enzymes responsible for cleaving hyaluronic acid, which is a major component of the extracellular matrix of vertebrates. In bloodsucking arthropods these enzymes are frequently present in saliva. Salivary hyaluronidases cleave the skin of the host, enlarge the feeding lesion and help to acquire the blood meal. In addition, resulting fragments of extracellular matrix may modulate local immune response of the host and positively affect transmission of vector-borne diseases.

Here, we study hyaluronidase activity in hard tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) and four genera of tabanid flies (Diptera: Tabanidae). No activity was found in tick salivary glands, on the other hand, high activity was found in salivary glands of all tabanid species tested. Hyaluronidases of tabanid flies cleave hyaluronan as well as chondroitin sulphate; enzymes of different species vary somehow in their molecular weight, pH optimum and sensitivity to reducing conditions.

## 2. Úvod a základní cíle

Hyaluronidázy jsou významnou skupinou enzymů odpovědných za štěpení kyseliny hyaluronové a dalších glykosaminoglykanů, které se vyskytují v extracelulární matrix obratlovců. Poprvé byly tyto enzymy identifikovány z testikulární tkáně již v první polovině 20. století, ale teprve počátkem devadesátých let se podařilo vyvinout kvalitnější metody detekující hyaluronidázovou aktivitu a rozpoznat účinek hyaluronidáz v mnoha biologických procesech. V současné době proto v lékařských i přírodovědných oborech probíhá intenzivní výzkum těchto enzymů.

Hyaluronidázy hrají důležitou roli ve tkáních obratlovců, zejména ve spermiích, játrech, sklivci a v pojivech. Často se uplatňují se i při nádorovém bujení. U rozmanitých organismů včetně blanokřídlých (Hymenoptera), pavouků, štírů, ryb, hadů či ještěřů jsou významnou složkou jedů, například u řádu Hymenoptera jsou významnými alergeny zodpovědnými za hypersenzitivní reakce na bodnutí včel, vos a sršní. Neméně důležitý význam mají tyto enzymy i u krevsajících členovců: hyaluronidáza byla zjištěna ve slinných žlázách klíšťat (Neitz et al., 1978) a u dvoukřídlého hmyzu (Diptera) – u flebotomů, muchniček, ovádů, tiplíků a komára rodu *Culex* (Ribeiro et al., 2000, Charlab, 1999, Ribeiro et al., 2000, Černá et al., 2002, Xu et al., 2008, Volfová et al., 2008). Těmto členovcům napomáhají enzymy při sání krve tím, že usnadňují ostatním složkám slinných žláz (např. antihemostatika, vazodilatátory aj.) průnik skrz pojivovou tkáň hostitele, tj. hyaluronidázy fungují jako „spreading factor“. Navíc hyaluronidáza může mít i význam v mechanismu šíření patogenů – fragmenty kyseliny hyaluronové mají imunomodulační účinky a hyaluronidáza tak může působit i jako „enhancing factor“ zvyšující účinnost přenosu patogenů těmito členovci (Volfová et al., 2008).

Jelikož o hyaluronidázách jednotlivých skupin krevsajících členovců je zatím známo jen málo informací, zaměřila jsem se ve své diplomové práci na následující dva cíle:

- ♦ Ověřit přítomnost hyaluronidázy na vzorku slinných žláz českého druhu klíštěte (*Ixodes ricinus*)
- ♦ Charakterizovat a porovnat hyaluronidázovou aktivitu u různých druhů ovádů (Tabanidae).

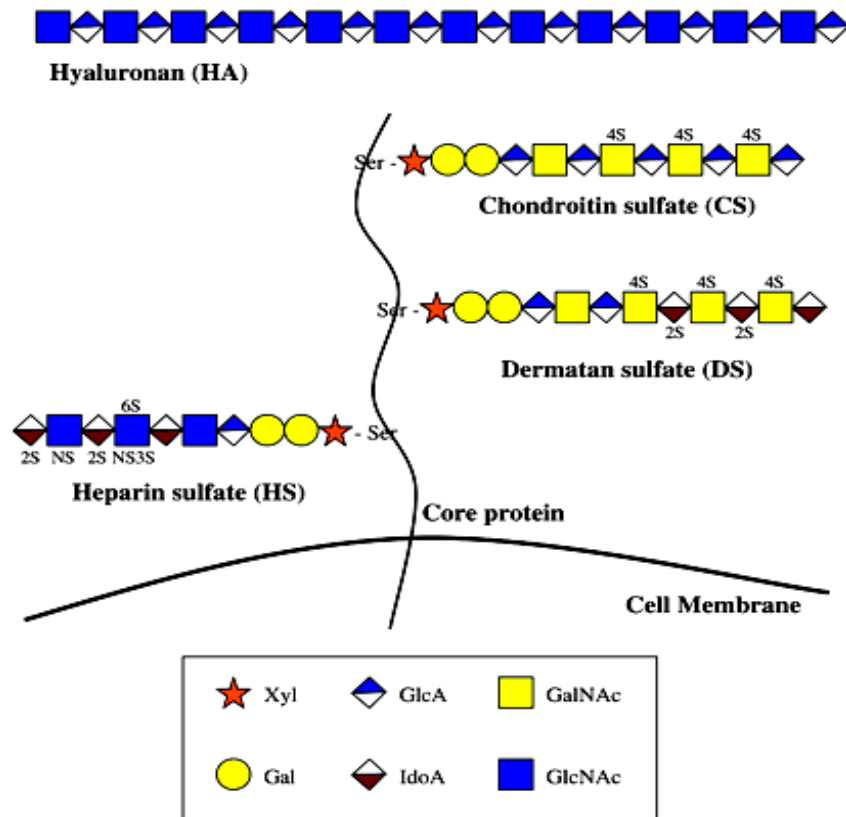
### 3. Literární přehled

#### 3.1 Glykosaminoglykany

Glykosaminoglykany (GAG) jsou skupinou polysacharidů extracelulární matrix (ECM) zajišťující její gelovou strukturu. Společně s GAG se v matrix nachází další důležité strukturální makromolekuly jako kolagen, tvořící pevná vlákna, fibronectin, zajišťující buněčné spojení a chemotaxi, či laminin, který je hlavní složkou bazálních membrán (shrnutí viz Raghov, 1994). Glykosaminoglykany jsou lineární polysacharidy přítomné v mezibuněčném prostoru různých živočišných tkání, přičemž každá tkáň obsahuje specifický soubor různě zastoupených GAG. Jsou tvořeny opakujícími se disacharidovými podjednotkami, prvním monosacharidem je glukosamin nebo galaktosamin, druhým monosacharidem v páru je kyselina glukuronová nebo iduronová. Díky sulfatovaným záporně nabitým částem řetězců jsou to velmi stabilní molekuly. Vazbou se silně osmoticky aktivními kationty  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  zajišťují hydrataci a viskozitu extracelulárního prostoru.

Glykosaminoglykany, s výjimkou hyaluronové kyseliny, jsou spojeny kovalentní vazbou s membránovým centrálním proteinem a vytvářejí tak proteoglykany (viz **obr. 1**). Lze je rozdělit do čtyř strukturálně odlišných skupin: heparan sulfát, chondroitin sulfát, dermatan sulfát a hyaluronan (shrnutí viz Prydz et al., 2000). Proteoglykany patří mezi nejhojnější a velmi rozmanité komponenty ECM, řetězce glykosaminoglykanů jsou velmi rozdílné a často modifikované, zejména jsou různě sulfatované, deacetylované a epimerované. Kromě udržení struktury ECM hrají proteoglykany roli také při diferenciaci buněk, a to interakcí s růstovými faktory; dále interagují s chemokiny, významně ovlivňují zánětlivou reakci ve tkáni a regulují její koagulaci (Imberty et al. 2007, Taylor and Gallo, 2006).

**Obr. 1. Struktura proteoglykanu. Kyselina hyaluronová není na proteoglykan kovalentně navázána, ale syntetizována přímo do extracelulárního prostoru. Podle Taylor and Gallo (2006).**



### 3.2 Hyaluronan

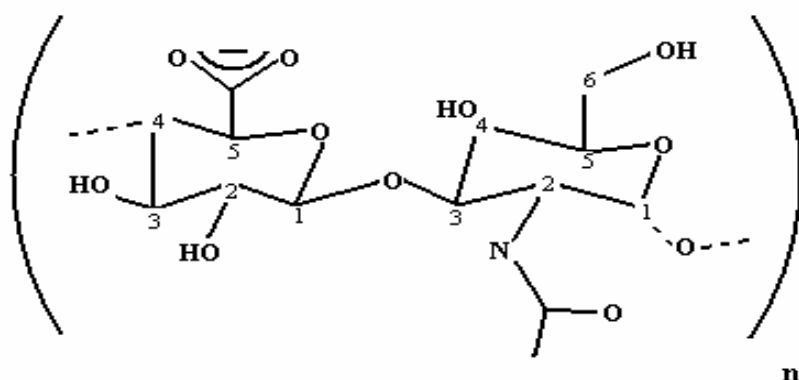
Kyselina hyaluronová (také hyaluronan či HA = hyaluronic acid) je glykosaminoglykan (GAG) přítomný převážně v extracelulární matrix různých tkání obratlovců, přičemž asi polovina jeho celkového množství se nachází v kůži. Tato kyselina byla poprvé nalezena a charakterizována z očního sklivce, odtud také její název „hyaluronic acid“ ze slov hyaloid (sklivec) + uronic acid (Meyer and Palmer, 1934). Dále je hojně přítomna například v pupečníku, synoviální tekutině, lymfě či séru. Lidské tělo o hmotnosti 70kg obsahuje přibližně 15g tohoto GAG, který je neustále obnovován (Stern, 2004).

Struktura kyseliny hyaluronové je znázorněna na **obr. 2**. Je to disacharid tvořený kyselinou glukuronovou (vlevo) a N-acetylglukosaminem (vpravo). Je

degradován v místě mezi těmito dvěma podjednotkami, konkrétně je štěpena buď  $\beta$ -1,4 glykosidická vazba nebo, v některých případech, i  $\beta$ -1,3 vazba (Stern, 2004).

Kyselina hyaluronová je jediným GAG, který není kovalentně vázán na centrální proteoglykan a je syntetizován přímo do extracelulárního prostoru (**obr. 1**). Taktéž nemá na svůj řetězec navázané záporně nabitě sulfátové skupiny. Je tvořen opakujícími se jednotkami N-acetylglukosaminu a kyseliny glukuronové (viz **obr. 2**). Molekulová hmotnost je velmi variabilní, počet disacharidů v jedné molekule může dosáhnout až 30 000, což odpovídá molekulové hmotnosti 100 MDa (Noble, 2002).

**Obr. 2. Struktura hyaluronanu podle Stern (2004)**



Molekuly kyseliny hyaluronové jsou syntetizovány pomocí transmembránových polymeráz (hyaluronan syntáz, HAS). U savců se vyskytují tři tyto isoenzymy označované jako HAS 1, HAS 2 a HAS 3 (DeAngelis, 1999, Itano et al., 1999 in Noble 2002, Weigel et al., 1997 in Taylor and Gallo, 1996, Weigel and DeAngelis, 2007). Isoenzymy jsou kódovány třemi různými ale příbuznými geny a liší se v expresi během ontogenetického vývoje (Spicer et al., 1997). Na typu syntetázy závisí velikost molekuly – zatímco HAS 1 a 3 syntetizují řetězce o molekulové hmotnosti od  $2 \times 10^5$  do  $2 \times 10^6$  D Stern a, HAS 2 syntetizuje řetězce delší než  $2 \times 10^6$  Da (Itano et al., 1999).

Rozdílná molekulová hmotnost řetězců kyseliny hyaluronové má zásadní vliv na jejich biologickou funkci (viz dále). V přirozené formě se HA vyskytuje

převážně jako vysokomolekulární polymer, který pomáhá v extracelulární matrix zachovávat její strukturální integritu, viskozitu a distribuci proteinů. Při porušení tkáně HA depolymerizuje na fragmenty o nízké molekulové hmotnosti. Příčinou depolymerizace může být působení enzymů (hyaluronidáza, hexosaminidáza či chondroitináza), či mechanické poškození (Fraser and Laurent, 1997, Stern and Csoka, 2000, Stern et al., 2006, Stern et al., 2007).

Nízkomolekulární fragmenty vyvolávají zánětlivou reakci (Termeer et al., 2003), buněčnou proliferaci, diferenciaci a masivní migraci buněk (Fraser and Laurent, 1997, Raghov, 1994). Nízkomolekulární štěpy kyseliny hyaluronové jsou v místě zánětu také vázány na povrchovou molekulu leukocytů CD44. Výsledkem této vazby je aktivování leukocytů a jejich adheze na epitheliální buňky (Mummert et al., 2005). Interakcí s CD44 vyvolávají fragmenty HA také angiogenezi. Ta je ovlivněna zvýšením migrace a proliferace endoteliálních buněk. Vazbou s receptorem TLR4 podporují zrání dendritických buněk a aktivují zánětlivé cytokiny (Taylor and Gallo, 2006). Navíc pouze za přítomnosti HA navázaného na CD44 fibroblastů má na tyto buňky mitogenní účinek PDGF (Platelet Derived Growth Factor). Proliferací fibroblastů a novotvorbou kolagenu dochází k tvorbě granulační tkáně a rychlejšímu vyplnění chybějící tkáně v místě poranění.

Dlouhé řetězce HA mají v mechanismu obrany tkáně odlišnou funkci. Tyto vysokomolekulární řetězce spojené do sítě (cross-linking) jsou mechanickou ochranou, neboť svým uspořádáním stabilizují porušenou strukturu tkáně a podporují adhezi leukocytů (Day and de la Motte, 2005).

Specifické vlastnosti mají i středně dlouhé fragmenty HA (60 – 300 kDa) – akumulují se ve tkáních s nádorovým bujením, kde stimulují produkci oxidu dusnatého toxického pro dendritické buňky. Tento proces je opět závislý na interakci s CD44 receptorem lymfocytů (Yang et al., 2002, McKee et al. 1996).

Pro molekulu kyseliny hyaluronové byly na povrchu různých typů buněk identifikovány, kromě receptorů CD44 a TLR4, také receptory RHAMM (Receptor for Hyaluronan Mediated Motility), LYVE-1 (Lymphatic Vessel Endothelial HA receptor-1), HARE (Hyaluronan Receptor for Endocytosis) a layilin (Banerji et al., 1999, Bono et al., 2001). Některé z těchto typů receptorů podobně jako CD44 zasahují do procesu migrace a proliferace zánětlivých a nádorových buněk (Termeer et al., 2003), lze však zobecnit, že nejsou zatím dostatečně popsány a charakterizované.

Kromě účinků kyseliny hyaluronové zprostředkovaných těmito receptory, zejména pak CD44, byl popsán i imunomodulační účinek samotné HA bez účasti CD44. Jedná se o velmi důležitý mechanismus již při samotném zahájení imunitní reakce. V minulosti se totiž soudilo, že CD44 na T-lymfocytech se váže s exogenní HA a tím aktivuje proliferaci lymfocytů. Nicméně podle novějších dat je HA syntetizován endogenně samotnými T-lymfocyty a hraje klíčovou roli při stimulaci proliferace T-lymfocytů zprostředkované IL-2. Indukce proliferace bez účasti CD44 dále podtrhuje význam imunomodulačních vlastností samotné molekuly HA v imunitních mechanismech (Mahaffey et al., 2007).

Lze tedy shrnout, že HA je důležitou složkou v procesu zánětlivé reakce a hojení ran a zároveň i signální molekulou, jejíž výskyt indukuje porušení homeostázy tkáně (Noble, 2002). Tyto jeho imunomodulační vlastnosti se již nyní využívají při urychlení hojení a epitelizace poranění a zánětů na kůži, v ústní dutině a na vaginální sliznici a epitelu děložního čípku.

Kyselina hyaluronová bývá často zmiňována v kontextu své schopnosti vázat vodu a přispívat tak k optimální hydrataci tkáně. Pro své vynikající viskoelastické vlastnosti je hojně využívána v oční chirurgii, při artroskopických operacích, jako výplň vrásek v plastické chirurgii, při terapii močové inkontinence, intraartikulárně při osteoartróze, při endoskopických operacích k prevenci jizvení a v očních či nosních kapkách.

### **3.3 Hyaluronidázy, jejich typy a metody studia**

#### **3.3.1 Hyaluronidázy**

Hyaluronidázy jsou širokou a značně komplexní skupinou enzymů (endoglukosaminidáz), jejichž substrátem je především kyselina hyaluronová. Hyaluronidázová aktivita byla prvně identifikována jako „spreading faktor“ testikulárního extraktu savců, který usnadňoval difúzi antivirových vakcín či jedů aplikovaných podkožně (Duran and Reynals, 1928 in Stern, 2004). Později bylo zjištěno, že oním faktorem je enzym, a jeho substrátem kyselina hyaluronová (Chain and Duthie, 1937 in Kreil, 1995). Tyto enzymy byly postupně prokázány v mnoha dalších savčích tkáních (v kůži, sklivci či synoviální tekutině), dále byla jejich



přítomnost zjištěna v jedech některých živočichů a také u bakterií, helmintů a členovců (viz dále).

Přestože mají všechny hyaluronidázy společný substrát, liší se mechanismem působení. Karl Meyer je v roce 1971 rozdělil do tří skupin právě podle rozdílných mechanismů štěpení hyluronové kyseliny a výsledných produktů reakce. Toto rozdělení lze stále použít i s ohledem na nová data - Meyer identifikoval dvě skupiny eukaryotických endoglykosidáz a jednu skupinu glykosidáz u prokaryot (Meyer, 1971 in Kreil, 1995).

Prvním typem jsou endo- $\beta$ -N-acetylhexosaminidázy eukaryot, které degradují vysokomolekulární substrát především na tetra-, případně hexasacharidy, přičemž štěpí glykosidickou vazbu  $\beta$ -1,4. Kromě HA jsou schopné štěpit i chondroitin sulfát. Mechanismem štěpení substrátu je hydrolýza, proto jsou někdy nazývané hydrolázami. Tato skupina zahrnuje savčí testikulární a lyzozomální hyaluronidázy a jim příbuzné hyaluronidázy v živočišných jedech blanokřídlých (*Hymenoptera*), štírů a hadů (shrnutí viz Kreil, 1995).

Druhý typ představují endo- $\beta$ -glukuronidázy. Jsou schopné pouze štěpení HA, jehož konečným produktem jsou, podobně jako u hyaluronidáz savčího typu, především tetrasacharidy. Přednostně štěpí  $\beta$ -1,3 glykosidickou vazbu namísto  $\beta$ -1,4 vazby, ale důvod tohoto jevu zatím není znám (Stern et al., 2007). Tato skupina enzymů byla izolována ze slinných žláz pijavek a hlístic (Linker, 1960, Hotéz, 1994). O těchto enzymech je zatím známo jen velmi málo, přestože je to potenciálně velmi zajímavá skupina.

Obdobně jako tyto dvě skupiny endoglykosidáz existují u eukarotních organismů také exoglykosidázy, lyzozomální enzymy, které odstraňují jednotlivé monosacharidy na neredukujícím konci řetězce HA a jsou podporovány endolytickým štěpením (viz výše), při kterém narůstá počet volných konců řetězce. Objevují se ve výrazně větším množství než endoglykosidázy, převážně při patologických jevech v játrech a jiných orgánech člověka a také ve tkáni octomilky (*Drosophila melanogaster*), háďátka (*Caenorhabditis elegans*) či v rostlinách (Stern et al., 2007).

Třetí typ představují glykosidázy prokaryot, což jsou bakteriální hyaluronidázy nazývané také lyázami či eliminázami. Jsou to jednak  $\beta$ -endoglykosidázy podobné prvnímu typu eukaryotních glykosidáz, od kterých se ale liší mechanismem působení. Při poměrně složitém štěpení substrátu, zahrnujícím

několik kroků, eliminují glykosidickou vazbu spolu s počáteční nenasycenou vazbou (Jedrzejaz et al., 2000, Stern and Jedrzejaz, 2006). Dále patří do této skupiny také bakteriální  $\beta$ -exoglykosidázy odstraňující monosacharidové podjednotky. Dlouho se v literatuře uvádělo, že také pro tento typ enzymů je jediným specifickým substrátem HA, kterou štěpí na disacharidové fragmenty. Podle novějších výsledků je ale bakteriálními lyázami štěpen i chondroitin a chondroitin sulfát (Rigden and Jedrzejaz, 2003, Stern and Jedrzejaz, 2006 and 2007). Existuje ale jedna skupina prokaryotních hyaluronidáz, která štěpí jen HA. Jsou to enzymy z bakterie *Streptomyces hyalurolyticus* (Shimada and Matsumura, 1980, Stern and Jedrzejaz, 2007) a právě svou substrátovou specifitou se liší od ostatních bakteriálních hyaluronidáz.

Podobnou výjimkou je také unikátní enzym izolovaný z jedu mořské ryby, odrance *Synanceja horrida*. Je to jediný enzym získaný z mořského organismu a liší se od ostatních hyaluronidáz eukaryot. Mechanismus štěpení má srovnatelný s testikulárními hyaluronidázami, ale jeho substrátem je jen HA (Ng et al., 2005).

Hyaluronidázy nejsou absolutně substrátově specifické, proto je poněkud zavádějící jejich název (Stern and Jedrzejaz, 2006). Jak již bylo řečeno, hyaluronidázy obratlovců i bakterií rozkládají i chondroitin a chondroitin sulfát, přestože degradace probíhá pomaleji (Rigden and Jedrzejaz, 2003). Chondroitin je glykosaminoglykan lišící se od kyseliny hyaluronové jen v obsazení čtvrtého uhlíku hexózy – místo acetyl-glukosaminu obsahuje acetyl-galaktosamin.

Ze substrátové specifity hyaluronidáz lze usuzovat na jejich vznik a vývoj. Ve zkoumaných bezobratlých (*Caenorhabditis elegans* či *Drosophila melanogaster*), kde byla nalezena sekvence kódující hyaluronidázu, se jednalo spíše o chondroitinázu, jelikož tyto organismy neobsahují ve svých tkáních HA, ale pouze chondroitin/chondroitin sulfát. V evolučních studiích se ukazují jako první glykosaminoglykany metazoi polymery podobné heparinu (shrnutí viz DeAngelis, 2002). Následovně se vyvinuly polymery chondroitinů a kyselina hyaluronová se objevuje podstatně později. Je spojována teprve se vznikem notochordu a je pravděpodobné, že prvním organismem, kde se HA a potažmo sekvence kódující hyaluronidázu objevila, je kopínatec (*Amphioxus*) (Stern and Jedrzejaz, 2006). To, že se HA objevuje v evoluci organismů později než chondroitin nasvědčuje tedy i tomu, že se hyaluronidáza vyvinula z předchůdce chondroitinázy (Toyoda et al.,

2000). Časem získaly chondroitinázy (bakteriální i eukaryotické) schopnost rozkládat specificky HA a některé z nich dokonce přestaly štěpit chondroitin. Schopnost stále štěpit i chondroitin je tedy dokladem o jejich původu (Stern and Jedrzejewski, 2006).

U bakterií splnily hyaluronidázy dvě samostatné funkce v životní strategii: ulehčily bakteriím rozšíření v hostiteli, neboť degradovaly hlavní složku ECM hostitelské tkáně, a dále pak poskytnuly bakteriím zdroj uhlíku a energie z rozložených disacharidových molekul (Stern and Jedrzejewski, 2006).

Výskyt prvních hyaluronidáz mnohobuněčných organismů pravděpodobně úzce souvisí s jejich ontogenezí. Pluripotentní buňky se „potřebují“ během vývoje embrya přemísťovat ve tkáni organismu, k čemuž v ECM plně hyaluronanu napomáhají právě enzymy. Později se vyskytlo hned několik důležitých funkcí spojených se zánětem a imunostimulací (viz též předchozí kapitola 3.2) (Stern and Jedrzejewski, 2006).

### **3.3.2 Metody detekce a kvantifikace hyaluronidázové aktivity**

K detekci a kvantifikaci hyaluronidázové aktivity bylo vytvořeno mnoho různých metod, některé z nich se ale používají již jen vzácně. Původní metody, založené na redukci turbidity nebo viskozity, byly málo citlivé a často reagovaly nejen s hyaluronidázami, ale i dalšími enzymy, které mohou být ve nečištěných vzorcích tkání přítomny (Frost et al., 1996). V této kapitole zmíním některé z nejdůležitějších metod pro detekci hyaluronidázové aktivity.

Turbidimetrické metody měří změnu viskozity roztoku HA inkubovaného s enzymem. Turbidita odpovídá rozdílu energie světelného paprsku, který vstupuje do roztoku a energie paprsku, který se při průchodu roztokem rozptýlí. Zeslabení intenzity paprsku značí menší viskozitu roztoku, potažmo přítomnost hyaluronidázy. Enzym totiž hydrolyzuje HA a tím zvyšuje tekutost a snižuje viskozitu roztoku (Hynes and Ferretti, 1994).

Spektrofotometrické metody jsou založeny na změně absorbance, která nastává poté, co interagují anionické mukopolysacharidy s karbocyaninovým barvivem Stains-all. Pokud je přítomna hyaluronidáza, rozštěpením HA se výrazně sníží absorbance vzorku. Metoda je vhodná ke kvantifikaci purifikovaných

hyaluronidáz, ale není spolehlivá pro samotný průkaz aktivity ze směsí proteinů (Hynes and Ferretti, 1994).

Při radiochemické metodě se vysráží radioaktivně značená HA, která není rozložená hyaluronidázou. Radioaktivita vysrážených vzorků se porovná s radioaktivitou pozadí, čímž se určí hyázová aktivita. Výhodou je poměrně vysoká citlivost, neboť se vysráží pouze HA a nikoliv jiné polysacharidy, které jsou hyaluronidázou také degradovány (Hynes and Ferretti, 1994).

Fluorometrická analýza je rychlá a citlivá metoda, která využívá jako substrát HA značenou fluorogenním činidlem, 2-aminopyridinem (Nakamura et al., 1990). Po inkubaci s enzymem se stanovuje fluorescence supernatantu. Zvýšení pyridylaminových produktů v supernatantu je přímo úměrná koncentraci hyaluronidázy (Hynes and Ferretti, 1994).

U metody využívajících pevná média se naváže HA obvykle na agarózu v mikrotitrační destičce nebo v petriho misce. Po inkubaci s roztokem obsahujícím hyaluronidázu je výsledkem buď nerozložená vysrážená HA nebo naopak čiré zóny degradované HA na zakaleném pozadí. Metody se používají například na prokázání bakteriálních hyáz nebo kvantifikaci velmi malého množství hyaluronidázy (Hynes and Ferretti, 1994).

Zymografická analýza je elektroforézou v substrátovém gelu s navázanou HA. Používá se celuloso-acetátová membrána, agarózový nebo polyakrylamidový gel. Po inkubaci s enzymem je substrát, kde nebyla degradována HA, obarven modře, jelikož barvivo (Stains-all) se váže na HA, čímž se zastaví proces její degradace. Neobarvené proužky pak značí přítomnost hyaluronidázy. Protože je Stains-all citlivé na světlo, byly vyvinuty modifikace této metody, které využívají dvojího barvení Alcian blue a Coomassie blue nebo stříbření (Frost et al., 1996).

Novější metody jsou založené na principu modifikované ELISA. ELISA-like test s biotinylovanou HA (bHA) využívá tento značený hyaluronan, který je navázán na mikrotitrační destičku a inkubován se vzorky potenciálně obsahujícími enzym. Metoda využívá silnou a vysoce specifickou vazbu avidin-biotin, v dalším kroku je aplikován konjugát avidin-peroxidáza (podrobněji viz kapitola 4.2). Důkazem hyázové aktivity je snížení absorbance oproti kontrole (Frost and Stern, 1997).

### 3.4 Hyaluronidázy bezobratlých živočichů

Dosud byly prostudovány hyaluronidázy u helmintů, pijavek, korýšů, blanokřídlého hmyzu a u některých parazitických členovců.

#### 3.4.1 Hyaluronidázy hlístic (Nematoda), pijavek a korýšů

Hyaluronidázy hlístic jsou popsány u zástupců rodů *Ascaris* (Rhoads, 2001), *Haemonchus* (Rhoads, 2000), *Ancylostoma* a *Anisakis* (Hotéz, 1994). Enzymy jednotlivých zástupců se od sebe mírně liší, především funkcí. Ta záleží na konkrétní životní strategii parazita.

Hyaluronidázy prokázané u larev měchovců rodu *Ancylostoma* jsou řazeny mezi endoglukuronidázy, neboť jsou substrátově specifické, schopné štěpit pouze HA. Jejich molekulová hmotnost se pohybuje kolem 49 nebo 87 kDa s pH optimem 6-8. Tyto vlastnosti enzymů jsou obdobné hyaluronidázám, které se vyskytují u pijavek (viz dále). Larvy různých druhů hlístic mají rozdílnou enzymatickou aktivitu, která koreluje se schopností larvy penetrovat povrchem hostitele. Larvy s nejvyšší aktivitou dokáží proniknout z vnějšího prostředí do hostitele jeho kožní pojivovou tkání, zatímco u jiných je obvyklá cesta nákazy střevním epitelem (Hotéz et al., 1990).

Mírně odlišný typ hyaluronidázy má dospělec těchto měchovců, nebo larvální stádia rodu *Anisakis*. Jejich enzymy mají molekulovou hmotnost 65 kDa (*Ancylostoma*) a 40 kDa (*Anisakis*) a různá pH optima (6 a 4), ale oba typy jsou schopny degradovat kromě HA i chondroitin-sulfát. Enzymy pomáhají zástupcům rodu *Anisakis* při invazi do hostitele střevní sliznicí. Navíc slouží jako „spreading factor“ pro další složky sekretované parazitem, například pro imunosupresiva, vasodilatátory či antikoagulanty (Hotéz et al., 1994).

Jinou funkci mají hyaluronidázy zástupců *Haemonchus contortus* a *Ascaris suum*. Zde se enzymy uplatňují v ontogenetickém vývoji parazitů. Degradací pojivové tkáně samotných parazitů dochází k morfologické přestavbě jejich těla během přechodu mezi larválními stádii. Je ale možné, že se enzymy podílí i na průniku tkání hostitele, stejně jako u předchozích parazitů. Tyto enzymy neštěpí

chondroitin-sulfát, mají podobnou molekulární hmotnost (kolem 56 kDa) i pH optimum kolem 5 (Rhoads et al., 2000 and 2001).

Hyaluronidázy pijavek reagují pouze se substrátem HA. U pijavky lékařské (*Hirudo medicinalis*) je molekulová hmotnost enzymu 28,5 kDa s pH optimumem kolem 5,3. Předpokládá se, že pijavkám enzym slouží jako „spreading faktor“ pro antikoagulanty podílející se na sání krve (Hovingh and Linker, 1999).

U koryšů byly hyaluronidázy purifikovány z mořského krilu, *Euphausia superba*, kde se podílejí na rychlé degradaci těla koryšů po jejich smrti. Jsou podobné hyaluronidázám pijavic, jejich molekulární hmotnost je 80 kDa a pH optimum 5,3. Biologická role těchto enzymů nebyla popsána. Zajímavé je však jejich teplotní optimum, které je 37°C, přestože se tyto koryši vyskytují převážně v antarktických mořích (Karlstam and Ljunglow, 1991).

### **3.4.2 Hyaluronidázy v jedech hmyzu a pavoukvců**

Hyaluronidázy byly izolovány z jedů pavouků (Barbaro et al., 2005), štírů (Ramanaiah et al., 1990, Pessini et al., 2001, Morey et al., 2006), včel (Kemeny et al., 1984), vos (Hoffman and Wood, 1984, Pantera et al., 2003, Kolarich et al., 2005, Skov et al., 2006, Lu et al., 1995), sršňů (Hoffman, 1987) a čmeláků (Hoffman et al., 2001). Hydrolýzou HA napomáhají průniku ostatních složek jedu skrz extracelulární matrix, čímž zvyšuje účinnost jedu. Také samotná hyaluronidáza výrazně působí na pojivovou tkáň, což potvrzují studie o vyvolání nekrózy tkáně v místě kousnutí u tří druhů australských pavouků (Young and Pincus, 2001), která se objevila i při aplikaci antiséra namířeného proti toxickým molekulám pavoučího jedu.

Enzymy živočišných jedů jsou příbuzné testikulárním hyaluronidázám a také jsou schopné jako substrát využívat HA i chondroitin a chondroitin sulfát. Například u vosy *Dolichovespula maculata* byla určena 27% podobnost enzymů s PH-20, lidským testikulárním proteinem (Lu et al., 1995).

Velice důležitá je skutečnost, že jedy blanokřídlého hmyzu (*Hymenoptera*) často vyvolávají u lidí alergické reakce, které mohou končit u hypersenzitivních osob fatálně. Imunopatologickou reakci způsobuje přítomnost alergenů, proti kterým

se tvoří protilátky izotypu IgE. Jsou to polypeptidy a enzymy, především fosfolipáza A, B, antigen 5, fosfatáza, mellitin, antigen 1 a 16 a hyaluronidáza. Díky těmto složkám existuje mezi jedy jednotlivých skupin tzv. zkřížená reakce (cross-reaktivita) Mezi fosfolipázou A včely a vosy existuje pouze minimální zkřížená reakce, naopak mezi včelí a vosí hyaluronidázou bývá reakce výrazná (Hoffman et al., 2006). Právě hyaluronidáza je zodpovědná za zkříženou reakci mezi včelími a vosími jedy (Lu et al., 1995).

Zkřížená alergická reakce se u lidí občas vyskytuje i mezi jedem vosy a slinami komárů a ovádů (shrnutí viz Moffitt, 2003). Ve všech třech těchto typech vzorků je možné prokázat hyaluronidázovou aktivitu (Volfová et al., 2008). Je proto možné, že i za tuto zkříženou reakci alergických osob by mohla být zodpovědná hyaluronidáza.

### **3.5 Sliny krevsajících členovců**

Hematofágie se vyvinula nezávisle u více než 14 000 druhů 400 rodů členovců konvergentní evolucí (Ribeiro et al., 1995, Wikel et al., 1996, Arocha-Pinango et al., 1999). Potřeba sání krve z hostitelského organismu vedla k tomu, že si členovci vyvinuli řadu adaptací. Díky různým složkám ve slinných žlázách překonávají hemostatické mechanismy imunitní reakce hostitele. Látky obsažené v jejich slinách zahrnují inhibitory koagulace a shlukování destiček, vasodilatátory a imunosupresivní molekuly (Ribeiro et al., 1989, Charlab et al., 1999).

Antihemostatické faktory lze pro přehlednost rozřadit do několika skupin – jsou to inhibitory koagulačních faktorů, hlavně antithrombin a inhibitor faktoru Xa, nebo inhibují agregaci destiček (apyráza, disintegriny), nebo fungují jako vasodilatátory (nitroforiny, maxadilan aj.) (Wikel et al., 1996, Beaty et al., 1996). U některých studovaných skupin členovců byla nalezena i hyaluronidáza. Tento enzym jim usnadňuje sání krve tím, že zvyšuje permeabilitu extracelulární matrix v kůži obratlovců právě pro ostatní antihemostatické složky slin (detailněji viz kapitola 3.5.3). Většina hematofágních členovců produkuje více různých antihemostatik, každé inhibuje jiné faktory koagulační kaskády. Většina

antikoagulantů členovců jsou proteiny o molekulové velikosti 5 – 65 kDa a často jsou nazývány podle druhu členovce, ze kterého byly izolovány.

Sliny klíšťat inhibují krevní koagulant faktor Xa (Waxman et al., 1993) a shlukování destiček pomocí apyrázy (Ribeiro et al., 1991). Krevsající ploštice (Triatominae) sekretují NO a nitroforiny (Ribeiro et al., 1990, 1993, 1994). U dvoukřídlých jsou nejběžnější antikoagulanty tvořeny inhibitory thrombinu a faktoru Xa (Arocha-Pinango et al., 1999 a Beaty et al., 1996). Komáří sliny obsahují prostacykliny k inhibici shlukování destiček (Ribeiro et al., 1984) a dále vasodilatátory tachykinin u rodu *Aedes* či catechol oxidázu u rodu *Anopheles* (Ribeiro et al., 1992, 1993, Champagne et al., 1994). U flebotomů rodu *Lutzomyia* je známým vasodilatátorem maxadilan (Ribeiro et al., 1989, Lerner et al., 1991). U ovádů (Tabanidae) jsou přítomny antithrombiny (Markwardt et al., 1959, Kazimírová et al., 2002), inhibitory agregace destiček (Grevelink et al., 1993, Reddy et al., 2000) i vasodilatátory (podrobněji viz kapitola 3.5.2).

V následujících dvou kapitolách se podrobně věnuji slinám dvou skupin, klíšťat a ovádů, které byly předmětem mého studia, ve třetí kapitole pak hyaluronidázám ve slinách krevsajících členovců.

### **3.5.1 Slinné žlázy klíšťat (Ixodida) a jejich složení**

Hlavní funkcí slinných žlaz klíšťat je sekrece farmakologicky aktivních molekul do hostitele, které umožňují sání krve. Sliny též slouží k vylučování přebytečné vody. Až 50% přijaté vody je vyloučeno do hostitele skrze slinné žlázy (Bowman et al., 1996). Během sání jsou přenášeni i patogeni, inokulativní cesta přenosu je u klíšťat nejběžnější (Stich et al., 1993). Během sání zvětší slinné žlázy objem, navíc se mění spektrum proteinů, které jsou sekretovány do potravní léze (Sanders et al., 1996). Jsou-li klíšťata mimo hostitele, slinné žlázy produkují hygroskopický roztok, který absorbuje vodu ze vzduchu. Klíště se tak chrání před dehydratací (Sauer et al., 1995).

Sliny umožňují sání díky svým antihemostatickým vlastnostem – obsahují apyrázu inhibující agregaci destiček hydrolyzou ATP na ADP a AMP a monofosfát (Ribeiro et al., 1985, Mans et al., 2000). Klíštěcí PGI<sub>2</sub> zase zvyšuje koncentraci cAMP v destičkách, inhibuje produkci ADP a tím brání shlukování destiček



(Bowman et al., 1996). Dále sliny inhibují thrombin, čímž brání agregaci destiček i vzniku koagulační kaskády. Klíštěcí antikoagulanty TAP (Gaspar et al., 1996, Waxman et al., 1996) a ixolaris (Francischetti et al., 2002) inhibují koagulační faktor Xa a dále serinové proteázy, které katalyzují thrombin – ornithodorin (van de Locht et al., 1996), americanin (Zhu et al., 1997), ixin (Hoffmann et al., 1991) a nepojmenovanou 60 kDa frakci (Horn et al., 2000).

Složky slin aktivně modulují imunitní odpověď hostitele – inhibují většinu buněk, které se reakce účastní, tj. NK buňky, neutrofilů, makrofágy a hlavně T-buňky (Ribeiro et al., 1990, Kopecký and Kuthejlová, 1998, Kovář et al., 2001, 2002). Různými látkami ve slinách jsou blokovány imunitní mechanismy hostitele, vznik buněčného infiltrátu v místě poranění, klasická kaskáda komplementu a ovlivňují i další imunitní reakce hostitele (Ribeiro et al., 1990).

Sliny klíšťat obsahují mnoho látek s antihemostatickou funkcí, které jsou společné pro sliny dalších členovců. Například apyráza je, jako složka slin inhibující agregaci destiček, přítomna u mnoha krevsajících živočichů, zejména u muchničků (Cupp et al., 1994), flebotomů (Valenzuela et al., 2001), komárů (Champagne et al., 1994) a krevsajících ploštic (Sarkis et al., 1986). Podobně jako klíšťata, i jiní krevsající členovci, například komáři či flebotomové, modulují imunitu hostitele směrem k Th2 odpovědi (Zeidner et al., 1999, Mbow et al., 1998). V neposlední řadě je složkou, která je společná i pro sliny některých dalších krevsajících členovců, hyaluronidáza, viz dále kapitola 3.5.3.

Složky slin představují výhodu pro případné přenášené patogeny viru Thogoto (Jones et al., 1992), viru encefalitidy (Hajnická et al., 2000), *Theileria parva* (Shaw et al., 1993), *Francisella tularensis* (Kročová et al., 2003) a *Borrelia afzelii* (Pechová et al., 2002). Na druhou stranu, je-li hostitel vystaven předchozímu sání klíštěte, může být na přenos těchto infekcí rezistentní (Wikel et al., 1996). Sliny klíšťat také ulehčují přenos patogenů mezi klíšťaty, které sají na jednom hostiteli. Tento jev je nazýván co-feeding (Labuda et al., 1997).

### **3.5.2 Složení slin ovádů (Diptera: Tabanidae)**

Ovádi jsou dobří letci a jsou adaptováni na rychlé sání krve. Samice rodů *Chrysops*, *Haematopota* a *Tabanus* běžně napadají i člověka a sají na něm krev.

Jsou to telmofágové (pool feeders) a tak sají krev z hemorrhagie v kůži, kterou nabodli a porušili (Chvála et al., 1972, Strother et al., 1999). Ovádi sají krev často a krátce, k plnému nasycení se musí samice nasát v průměru desetkrát (Hollander et al., 1980), většinou na různých jedincích hostitele. Tento zvyk přerušovaného sání podporuje mechanický přenos nemocí, např. anaplasmózy, anthraxu, tularémie a trypanosomiázy (Chvála et al., 1972).

Skupina zahrnuje i největší známé druhy krevsajícího hmyzu. Samice velkých druhů ovádů jsou schopny nasát až 200 mg krve během jedné až tří minut (Chvála et al., 1980). To naznačuje, že samice ovádů musí mít velmi účinné protisrážlivé mechanismy ve slinách.

Na rozdíl od antihemostatických strategií muchniček (Abebe et al., 1994) a komárů, které jsou často přizpůsobeny konkrétnímu hostiteli (Ribeiro, 2000), u ovádů je tomu jinak. Výsledky Kazimírové et al. (2002) ukázaly, že není žádná spojitost mezi antikoagulanty ovádů a jejich hostitelským spektrem. Podle Chvály et al. (1980) neexistuje žádný vyloženě antropofilní druh ováda, většina druhů útočí na velké savce obecně (dobytek, koně, člověka), přičemž rod *Tabanus* saje převážně na skotu a zpravidla neútočí na lidi. Největší ovádi s nejširším hostitelským spektrem mají nejsilnější antikoagulační aktivitu slin (*Heptatoma*, *Hybomitra*, *Tabanus*).

Jedním z prvních objevených antihemostatik v ovádích žlázách byl tabanin - inhibitor thrombinu u *Tabanus bovinus*, jednoho z největších druhů ovádů. Mechanismus aktivity tohoto antithrombinu připomíná mechanismus hirudinu pijavek (Markwardt et al., 1960). Kromě toho byly ve slinách ovádů objeveny různé antikoagulanty. Kazimírová et al. (2001, 2002) popisují minimálně dvě základní složky slin založené na:

1. antithrombinech u rodů *Tabanus*, *Hybomitra*, *Haematopota*, *Heptatoma* (Markwardt et al., 1960, Kazimírová et al., 2001) a
2. inhibitorech shlukování destiček u rodu *Chrysops* (Grevelink et al., 1993, Reddy et al., 2000). Ovádí antikoagulanty obecně jsou vysoce účinné i při velmi nízkých koncentracích. Popsán byl i antikoagulant u druhu *Tabanus bivittatus* s účinnou inhibicí trombinu, molekulová hmotnost tohoto peptidu je asi 65 kDa (Ahn et al., 2000, 2006).

Další objevenou složkou je vasodilatátor u druhu *Hybomitra bimaculata*. Takáč et al. (2006) naklonovali a exprimovali jeden z aktivních peptidů označený jako vasotab. Inhibitory srážlivého faktoru Xa nebyly u ovádů nalezeny

(Kazimírová et al., 2002). V poslední době byl izolován jeden z neúčinnějších inhibitorů shlukování destiček, antagonist receptoru pro fibrinogen (glykoprotein IIb/IIIa) z rodu *Chrysops*. Tento inhibitor o molekulové hmotnosti 65 kDa byl nazván chrysoptin (Grevelink et al., 1993, Reddy et al., 2000). V neposlední řadě byla ve slinných žlázách ovádů potvrzena hyaluronidáza, a to u druhů *Chrysops viduatus* (Volfová et al., 2008) a *Tabanus yao* (Xu et al., 2008).

### 3.5.3 Hyaluronidáza ve slinách krevsajících členovců

Hyaluronidáza byla dosud prokázána u klíšťat *Amblyomma hebraeum* a *Ornithodoros savignyi* (Neitz et al., 1978 and 1987), muchniček *Simulium vittatum*, *Odagmia ornata* a *Eusimulium latipes* (Ribeiro et al., 2000, Volfová et al., 2008), u flebotomů (Diptera: Psychodidae), konkrétně u *Lutzomyia longipalpis*, *Phlebotomus papatasi*, *P. duboscqi*, *P. halepensis*, *P. sergenti*, *P. perniciosus* a *P. arabicus* (Charlab, 1999, Ribeiro et al., 2000, Černá et al., 2002, Hostomská et al., 2009), dále pak u ováda *Chrysops viduatus*, komára *Culex quinquefasciatus* a tiplíka *Culicoides kibunensis* (Volfová et al., 2008). Nižší aktivita byla zjištěna u blechy *Ctenocephalides felis* (Volfová et al., 2008).

Hyaluronidázy se zřejmě uplatňují zejména u telmofágního hmyzu (pool feeders), kde usnadňují zvětšení hemorhagické léze, ze které hmyz saje, na rozdíl od hmyzu solenofágního (vessel feeders), který saje přímo z cévy (Volfová et al., 2008). Tomu odpovídají i výsledky provedených studií: hyaluronidázová aktivita byla nalezena především u muchniček (Simuliidae), flebotomů (Phlebotomidae), tiplíků (Ceratopogonidae) a ovádů (Tabanidae), přičemž všechny tyto jmenované čeledi patří mezi telmofágní hmyz. U většiny zástupců solenofágního hmyzu hyaluronidázová aktivita zjištěna nebyla, konkrétně u vší (*Pediculus humanus*), krevsajících ploštic z podčeledi Triatominae (*Rhodnius prolixus*), komárů *Anopheles stephensi* (Volfová et al., 2008), mouchy tsetse (*Glossina palpalis*) a bodalky (*Stomoxys calcitrans*) (Volfová et al., 2008). U dalších solenofágů byly zkoumány sialomy a ani zde nebyla nalezena sekvence odpovídající hyaluronidáze. Jednalo se o komáry *Anopheles darlingi* (Calvo et al., 2004), *A. funestus* (Calvo et al., 2007), *A. gambiae* (Arca et al., 2005), *Aedes aegypti* (Ribeiro et al., 2007) a *Aedes albopictus* (Arca et al., 2007). Výjimkou jsou blecha (*Ctenocephalides felis*) a

komár (*Culex quinquefasciatus*), kteří jsou solenofágní a přesto u nich byla potvrzena aktivita. V případě blechy šlo ale o extrakt z celých těl, což mohlo výsledek ovlivnit (Volfová et al., 2008).

Hyaluronidázy členovců jsou svými vlastnostmi podobné savčím hyaluronidázám a hyaluronidázám v jedech blanokřídlého hmyzu (*Hymenoptera*). Spolu s těmito enzymy se řadí do skupiny endo- $\beta$ -acetylhexosaminidáz. Základním substrátem pro hyaluronidázy členovců je hyaluronan, který hydrolyzují na tetrasacharidy. U některých flebotomů byla prokázána schopnost štěpit i chondroitin sulfát A a C, podobně jako je tomu u testikulárních hyaluronidáz (Černá et al., 2002).

Je zajímavé, že i v rámci jedné skupiny hmyzu se hyaluronidázy mohou lišit svoji strukturou a fyzikálně-chemickými vlastnostmi. U flebotomů *P. papatasi*, *P. duboscqi* a *P. halepensis* je aktivní formou enzymu monomer, který má stejnou molekulovou hmotnost za redukujících i neredukujících podmínek. Oproti tomu enzym *P. sergenti* je homodimer, ale zůstává aktivní i za redukujících podmínek jako podjednotka o 60 kDa. Aktivita u *L. longipalpis* a *P. perniciosus* byla prokázána jen za neredukujících podmínek. Nejvyšší hyaluronidázovou aktivitu obecně měly vzorky *P. papatasi* a *P. halepensis*. Zkoumané vzorky enzymů prokazovaly vysokou termostabilitu, ta byla detekována i po povaření ve 100°C. Pozoruhodné je, že určitá, i když nízká hyaluronidázová aktivita byla prokázána i u samců *P. duboscqi*, kteří se na rozdíl od krevsajících samic živí jen rostlinnými šťávami. Molekulární hmotnosti hyaluronidáz flebotomů se pohybují v rozmezí od 60 kDa (*P. sergenti*) do 110 kDa (*P. halepensis*, *P. arabicus*). Jejich aktivita je nejvyšší v rozmezí pH 4-6, ale aktivní zůstávají i ve slabě zásaditých podmínkách (Černá et al., 2002, Hostomská et al., 2009). Poněkud odlišné je pH optimum enzymů muchničky (*Simulium vittatum*), které se pohybuje okolo 6 a při nižších hodnotách již enzymy aktivní nejsou. (Ribeiro et al., 2000). Vzorky ze slin muchniček *Eusimulium latipes*, *Odagmia ornata* a také ováda *Chrysops viduatus* zůstaly aktivní i za redukujících podmínek (Volfová et al., 2008).

Hyaluronidáza byla nalezena i ve slinných žlázách dvou druhů ovádů. Byly změřeny molekulové velikosti, konkrétně 50 kDa u druhu *Chrysops viduatus* (Volfová et al., 2008) a 35 kDa u druhu *Tabanus yao* (Xu et al., 2008), aktivita enzymu byla vždy poměrně silná i za různých podmínek pokusů (za neredukujících i redukujících podmínek ELFO nebo přidáním SDS do vzorku).

Hyaluronidáza je přítomná nejen ve slinách hmyzu, ale i zástupců klíšťat (Ixodidae). Tento enzym byl zatím popsán pouze u druhů *Amblyomma hebraeum* a *Onithodoros savignyi*. Tato hyaluronidáza ukazovala jistou podobnost testikulární hyaluronidáze (podobně jako u ostatních krevsajících členovců), molekulová velikost prý byla 9,6 kDa a její aktivita byla určena jako slabá (Neitz et al., 1978 and 1987).

U ostatních druhů klíšťat zatím hyaluronidázová aktivita zkoumána nebyla, u některých jsou ale známy cDNA knihovny. Publikovány byly cDNA knihovny slinných žláz u druhů *Dermacentor andersoni* (Alarcon-Chaidez et al., 2007), *Ixodes pacificus* (Francischetti, 2005), *I. scapularis* (Valenzuela et al., 2002) a *I. ricinus* (Chmelař et al., 2008). Sekvence odpovídající hyaluronidáze ani v jedné z těchto knihoven ale nebyly nalezeny.

Všichni výše jmenovaní zástupci krevsajících členovců ovlivňují svým sáním imunitu hostitele a je to právě hyaluronidáza, která společně s ostatními složkami jejich slin způsobuje alergické reakce podobně jako je tomu u hmyzích jedů (viz kapitola 3.4.2), včetně možnosti cross-reaktivity. Prokázaná je například zkřížená reakce mezi jedem vosy a slinami ováda (Quercia et al., 2008) či dokonce reakce zvaná mosquito-wasp-horsefly syndrome mezi jedem vosy a slinami komára a ováda (Freye et al., 1996, Sabbah et al., 1999).

Kromě toho se ale mohou složky slin krevsajících vektorů, včetně hyaluronidázy, podílet na přenosu infekčních onemocnění. Flebotomové (Diptera: Psychodidae) jsou známými přenašeči leishmaniózy, ovádi jsou většinou nesespecifičtí vektoři, kteří přenášejí patogeny mechanicky prostřednictvím kontaminovaného sosáku. V různých zeměpisných šířkách včetně mírného pásu přenášejí ovádi původce tularemie (*Francisella tularensis*), antraxu (*Bacillus anthracis*) a mnoha dalších, hypoteticky je možný i přenos bakterií *Borrelia*. Důležitým přenášeným patogenem je také *Trypanosoma evansi*, původce onemocnění napadající zejména v Africe psi a velké savce a v Jižní Americe i největší hlodavce – kapybary. Běžně je tato *Trypanosoma* přenášena mouchami tse-tse (*Glossina palpalis*), ale mechanický přenos ovády je zde také významný. Podobně je tomu tak i u dalších druhů *Trypanosoma equiperdum*, *T. vivax* či *T. congolense* (Krinsky et al., 1976, Desquesnes and Dia, 2003a, Desquesnes and Dia, 2003b). Ovádi ale nejsou jen mechanickými přenašeči – v rovníkové Africe je rod *Chrysops* specifickým přenašečem filárie *Loa loa* (Pinder, 1988, Foil, 1989).

## 4. Metodika

### 4.1 Odchyt ovádů, pitva slinných žlaz a příprava vzorků

Vzorek ze slinných žlaz klíšťat *Ixodes ricinus* (žlázy z 8 samic vypitvaných tři dny po sání) jsme získali z laboratorních chovů z JČU v Českých Budějovicích. Použili jsme ho pouze na průkaz na substrátovém gelu.

Ovády (*Tabanidae*) nelze pěstovat v laboratorních chovech, proto byli odchytáváni v přírodě a živí převezeni do laboratoře. Odchyt byl prováděn v letech 2006, 2007 a 2008 vždy v červnu a červenci, kdy létá nejvíce druhů a největší množství ovádů. V některých případech byli ovádi chytáni i ke konci sezóny, to jest v srpnu a září. Seznam druhů a lokalit odchytu viz **Tabulka 1**.

**Tabulka 1. – přehled odchycených druhů ovádů a lokalit**

Druh	Lokalita	Měsíce odchytu
<i>Haematopota pluvialis</i>	ČM vrchovina, Praha, Kladruby	VII., VIII., IX.
<i>Haematopota italica</i>	Kladruby	VIII.
<i>Chrysops viduatus</i>	Ruda, Praha	VI., VII.
<i>Chrysops caecutiens</i>	Ruda	VI., VII.
<i>Chrysops relictus</i>	Ruda, Praha	VI., VII.
<i>Hybomitra ciureai</i>	Ruda	VI., VII.
<i>Hybomitra muehlfeldi</i>	Ruda, Kladruby	VI., VII.
<i>Tabanus autumnalis</i>	Ruda	VI.
<i>Tabanus bovinus</i>	Ruda	VI.
<i>Tabanus maculicornis</i>	Ruda	VI.

Ruda – Jižní Čechy - 49°09'01 N; 14°41'35 E

Českomoravská vrchovina - Golčův Jeníkov 49°48'59 N; 15°28'37 E

Praha - 50°00'18 N; 14°30'36 E

Kladruby n. L. - 50°03'20 N; 15°29'16 E

Ovádi byli odchyťaváni jednak do Malayseho pasti – viz **obr. 3.**, nebo přímo na lidech. Velice dobře se chytali také v oknech chatky na Rudě (u Veselí nad Lužnicí), kam vždy vletěli a soustředili se u zavřených oken.

Ovádi byli určováni podle klíče Chvály et al. (1980), správnost determinace byla ověřena pomocí srovnávacího materiálu ze sbírek entomologického oddělení Národního muzea v Praze – Kunraticích.

Na pitvy byli použity pouze živé samice, jen krátce znehybněné na ledu v chladničce. Z mrtvých kusů nelze žlázy získat. K samotné pitvě byly použity ostré pinzety, pomocí kterých se exemplář přenesl pod binokulární lupu do kapky pufru (20 mM TRIS, 150 mM NaCl) a poté se oddělila hlava od zbytku těla. Pár slinných žláz, které zůstaly přichyceny k hlavě a byly díky tomu vytaženy ven do pufru (viz **Obr. 2**, kapitola 5.2), byl pinzetou přemístěn do roztoku 20 mM TRIS pufru (s NaCl). Většinou bylo napitváno 10 žláz stejného druhu ováda do 20  $\mu$ l pufru, u některých vzorků byla ale koncentrace jiná – záleželo na množství chycených exemplářů od daného druhu. Vzorky byly skladovány v  $-70$  °C.

Před použitím byl každý vzorek zhomogenizován (obsah zmražen v tekutém dusíku, mechanicky rozdrcen při rozmražení a opětovně zmrazen, to celé 3x a sebou) a poté centrifugován po dobu 3 minut, při 12 031 g (13 400 rpm na centrifuze MiniSpin, Eppendorf). U supernatantů byla změřena proteinová koncentrace pomocí fluorometru (Qubit fluorometr). Přístroj je vždy nejprve nakalibrován pomocí tří standardů a poté je možno ihned měřit vzorky v pracovním roztoku (1:200 QT reagentu : QT pufru). Naměřenou hodnotu na fluorometru stačí dosadit do vzorce  $c = n \cdot (200/x)$  a zjistíme skutečnou koncentraci vzorku ( $c$  – skutečná koncentrace vzorku v  $\mu$ g/ml;  $n$  – naměřená hodnota na fluorometru; 200 – objem prac. roztoku se vzorkem v  $\mu$ l;  $x$  – počet  $\mu$ l vzorku v prac. roztoku).

**Obrázek 3. – Malayseho past na terénní stanici Ruda**



#### **4.2 Detekce hyaluronidázové aktivity na mikrotitračních destičkách, změření pH optima**

Tato metoda (dle Frost and Stern, 1997, v modifikaci podle Černá et al., 2002) využívá silnou a vysoce specifickou vazbu mezi avidinem a biotinem. Biotinylovaný hyaluronan je navázán na mikrotitrační destičku a inkubován se vzorkem, který obsahuje hyaluronidázu. Poté je navázána avidin-peroxidáza a její reakcí se substrátovým roztokem vzniká barevná reakce. Absorbanci lze změřit a přesně kvantifikovat na fluorometru (Tecan – Infinite M 200).

Biotinylovaný hyaluronan (bHA), připravený Dr. L. Mikešem v koncentraci 1,89 mg/ml, byl kovalentně navázán na mikrotitrační destičku. Do každé jamky byl dán 1  $\mu\text{g}$  bHA + 9  $\mu\text{g}$  NHS v 50  $\mu\text{l}$  roztoku a 6,15  $\mu\text{g}$  EDAC v 50  $\mu\text{l}$  roztoku. Inkubace probíhala přes noc ve 4°C. Druhý den byly jamky promyty pufrům CovaBuffer bez Tw v množství 1x 400 ml a 2x 200 ml na jamku. Po tomto promytí lze destičky uchovávat ve 4°C až 1 týden.



Dále byly jamky inkubovány 45 minut za pokojové teploty v 200  $\mu$ l 1% BSA a poté promyty reakčním pufrům (1 x 200  $\mu$ l). Při vlastní inkubaci byl reakční pufr použit v objemu 100  $\mu$ l, vždy dle příslušného pH, ve kterém jsme chtěli zjistit aktivitu vzorku. Pro dané pH byly použity různé pufrы, viz použité chemikálie. Do první řady jamek byl přidán vzorek tak, aby konečný objem v jamce byl 200  $\mu$ l. Vzorek byl pak rozlitován dvojkovou řadou, paralelně provedeno ve čtyřech řadách jamek. Dvojkového ředění jsme užívali i u standardu pro stanovení kalibrační křivky (standard nanesen opět ve čtyřech paralelních řadách).

Inkubace se vzorky probíhala 60 minut ve 37°C, poté byly vzorky slity a jamky naplněny 6M guanidin chloridem (Sigma) v množství 200  $\mu$ l na jamku (1 minuta na třepačce), čímž se ukončila reakce enzymu se substrátem. Poté byly jamky několikrát propláchnuty pufrům CovaBuffer s 0,05% Tw (1x 400  $\mu$ l a 2x 200  $\mu$ l na jamku) a jedenkrát 0,01M PBS s 1% Tw (200  $\mu$ l na jamku).

Dále byly jamky inkubovány s avidin-peroxidázou (Sigma) v ředění 1:500 v 0,01M PBS s 0,1% Tw (100  $\mu$ l na jamku, 30 minut v pokojové teplotě) a promyty důkladně pufrům CovaBuffer s Tw (2x 400  $\mu$ l a 5x 200  $\mu$ l). Barevná reakce byla vyvolána v substrátovém roztoku (100  $\mu$ l na jamku). Probíhající reakce byla měřena po 10 minutách na fluorometru Tecan – Infinite M 200 při použití filtru 492 nm.

### **Použité chemikálie:**

Pracovní roztok NHS + bHA: 0,186 mg/ml NHS (Fluka); 1,89 mg/ml bHA

Roztok EDAC: 0,64 mM EDAC (Sigma)

CovaBuffer bez Tw: 0,01 M PBS pH 7,2; 2 M NaCl; 50 mM MgSO<sub>4</sub>

CovaBuffer s 0,05% Tw: do CovaBuffer přidán 0,05% Tween 20 (Serva)

PBS: 150 mM NaCl; 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>3</sub>; 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2

Roztok BSA: 1% BSA (Albumine from bovine serum, Sigma) v 0,01 M PBS pH 7,2

Pracovní roztok avidin-peroxidázy (ředění 1:500): v 100  $\mu$ l 0,01M PBS s 0,1% Tw

Pracovní roztok hyaluronidázy (0,01 TRU/ $\mu$ l): 1  $\mu$ l zásobního roztoku (851 units/1 ml), 84  $\mu$ l pufru pH 4,5

Reakční pufrы pro příslušné pH:

**pH 3,5:** 0,1 M citrátový pufr (Penta), 0,1 M NaCl, 0,1% TRITON X-100 (Sigma)

**pH 4 - 5,5:** 0,1 M acetátový pufr (Lach-Ner, s r.o.), 0,1M NaCl, 0,1% TRITON X-100

**pH 6 – 7:** 0,1 M BIS TRIS (Sigma) pufr, 0,1 M NaCl, 0,1% TRITON X-100

**pH 7,5 - 8,5:** 0,1 M TRIS (Sigma), 0,1 M NaCl, 0,1% TRITON X-100

### **4.3 Průkaz hyaluronidázy na substrátových gelech**

K průkazu hyaluronidázy ve vzorcích byla použita metoda polyakrylamidových substrátových gelů. Jednou ze složek těchto gelů je kopolymerizovaná kyselina hyaluronová nebo chondroitin sulfát. Na gel jsou nakapány jednotlivé vzorky, poté je gel inkubován a obarven. Barva se specificky váže na hyaluronan, proto obarví celý gel – pouze v místech, kde hyaluronidáza ze vzorku rozštěpila hyaluronan, se gel neobarví. Pokud je tedy v kapce hyaluronidáza přítomna, zůstane po ní na obarveném gelu světlé, neobarvené místo.

Nejdříve jsme připravili substrátový gel (o tloušťce 0,75mm) s 10% polyakrylamidu a 0,002% hyaluronanu nebo chondroitin sulfátu. Na základě předběžných pokusů jsme zvolili pH 5,5. Jednotlivé složky se smíchaly společně s hyaluronanem nebo chondroitin sulfátem a roztok byl nalit mezi skla na stojanu a nechal se 15 minut tuhnout. Poté se skla oddělila a gel byl opatrně přenesen do Petriho misky. Na gel se poté podle schematu nakapaly jednotlivé vzorky (1 nebo 2  $\mu$ l na kapku) . Kolem gelů byla umístěna navlhčená vata, miska ze zavřela a oblepila parafilmem, aby gel nevyschl. Gel v misce byl poté inkubován 24 hodin ve 37 °C.

Po skončení inkubace byl gel propláchnut destilovanou vodou a přenesen do neprůhledné dózy. Po 30 minutové inkubaci v 50 ml 50% formamidu byl barven v 50% roztoku formamidu s 5 mg barvy Stains-all. Je důležité vše provádět v šeru, neboť barva je citlivá na světlo a rychle na něm bledne. Gel uzavřený v neprůhledné dóze byl barven 20-24 hodin na třepačce, která zajistila lepší promíchání barvy. Po skončení barvení je gel opláchnut destilovanou vodou a je nutné ho naskenovat, dříve než na světle vybledne (nejlépe ihned).

#### **Použité chemikálie:**

Rozpis na jeden separační gel o tloušťce 0,75 mm:

1000  $\mu$ l složky A; 1000  $\mu$ l složky B; 1960  $\mu$ l H<sub>2</sub>O; 40  $\mu$ l 0,2% HA/CHIS; 2,5  $\mu$ l TEMED; 25  $\mu$ l složky G

Složka A: 40% akrylamid; bis-akrylamid (Biorad)

Složka B: 0,1 M acetátový pufr, pH 5,5

TEMED: N,N,N',N' – tetramethyl-ethylendiamin (Serva)

složka G: 10% peroxodisíran amonný (Sigma)

#### 4.4 SDS PAGE a barvení stříbřením

SDS-PAGE, využívající vertikální elektroforézu, je běžně používanou metodou k separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti; pomocí ní lze analyzovat proteinový profil slinných žláz ve vzorcích. Elektroforéza probíhala za redukujících podmínek (s redukčním činidlem, merkaptoethanolem ve vzorkovém pufru) na 10% nebo 12% dělicím gelu o tloušťce 0,75mm.

Nejdříve se opět připravil substrátový dělicí gel (viz kapitola 4.3) a na něj se po 15 minutách nalil startovací gel, do kterého se zasunul desetijamkový hřebínek na vzorky. Startovací gel se nechal ztuhnout, poté se opatrně vyjmul hřebínek a destilovanou vodou byly odmyty zbytky neopolymerizovaného gelu. Vzorky byly ředěné ve vzorkovém pufru obsahujícím merkaptoethanol a bylo je nutné zahřát ve vodní lázni 40 min ve 45°C a během inkubace alespoň 2x promíchat. Předběžnými pokusy byla optimalizována koncentrace proteinů u jednotlivých vzorků, obsah nanášených proteinů ve vzorku se pohyboval od 0,6 do 3  $\mu$ g proteinů na jamku.

Byla použita vertikální elektroforéza Mini-Protean III (BioRad) a jako zdroj napětí PS 500 XT (Hofer). Za limitního napětí 150 V trvala elektroforéza kolem 60 minut.

K vizualizaci elektroforeticky rozdělených proteinů na gelu jsme použili stříbření. Gel byl přenesen do Petriho misky a inkubace s roztoky probíhala vždy za pokojové teploty a na třepače (k usnadnění promývání a vyvíjení reakce). Nejprve byl gel po dobu 10 minut fixován formaldehydem a methanolem, poté propláchnut destilovanou vodou (cca 5 minut) a inkubován 1 minutu v 0,02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Po opětovném propláchnutí v destilované vodě byl gel 10 minut inkubován v 0,1% AgNO<sub>3</sub> (připraveném vždy těsně před použitím). Dále byl gel znovu promyt a krátce ponechán ve vyvíjecím roztoku, který se po chvíli vyměnil za čerstvý a gel se v něm

inkuboval, dokud se neobjevily proužky proteinů. Reakce byla zastavena přilitím 2,3 M kyseliny citronové, která se nechala působit asi 10 minut. Pak byl gel propláchnut destilovanou vodou a skenován. Gely obarvené stříbrem lze uchovávat v sušicím roztoku až po dobu jednoho roku.

### Použité chemikálie:

Rozpis na jeden separační a jeden startovací gel o tloušťce 75mm:

	Dělicí gel 10%	Dělicí gel 12%	Startovací gel 4%
A (ml)	1	1,2	0,2
B (ml)	1	1	0
C (ml)	0	0	0,5
H <sub>2</sub> O (ml)	2	1,8	1,3
TEMED (μl)	2,5	2,5	2,5
G (μl)	25	25	20

Složka A: 40% akrylamid; bis-akrylamid (Biorad)

Složka B: 0,1 M acetátový pufr, pH 5,5 / 75 ml 2 M Tris-HCl, pH 8,8; 4 ml 10% SDS; 46 ml dH<sub>2</sub>O

Složka C: 50 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8; 4 ml 10% SDS; 46 ml dH<sub>2</sub>O

TEMED: N,N,N',N' – tetramethyl-ethylendiamin (Serva)

složka G: 10% peroxodisíran amonný (Sigma)

Fixační roztok: 50 μl 37% formaldehydu + 100 ml 40% methanolu

Vyvíjecí roztok: 100 μl 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 200 μl 0,4% (0,4g do 100ml dH<sub>2</sub>O); 50 μl formaldehydu (přidat těsně před použitím)

Sušící roztok: 10% ethanol a 4% glycerol

## 4.5 Průkaz hyaluronidázové aktivity pomocí zymografické analýzy na substrátovém gelu

Touto metodou lze charakterizovat hyaluronidázovou aktivitu pomocí elektroforézy na substrátovém gelu. V našem případě jsme použili dvě modifikace elektroforézy – redukující (s redukčním činidlem, merkptoethanolem ve vzorkovém pufru) a neredukující (bez redukčního činidla). Při obou metodách jsme postupovali shodně s experimenty popsány v práci Černá et al. (2002).

Příprava dělicího gelu a elektroforéza proběhla stejně jako v předchozí kapitole, vzorky byly ředěny v neredukujícím nebo redukujícím pufru a za redukujících podmínek byly ještě zahřáty ve vodní lázni (viz kapitola 4.4). Po skončení elektroforézy byl od gelu odříznut standard, který byl barven zvlášť v Coomassie modři (Coomassie Brilliant Blue R-250) na třepačce. Gel se vzorky byl proplachován dvakrát po dobu 20 minut v roztoku 0,1 M TRISu bez NaCl s 1% TRITONem X-100 a poté 20 minut v 0,1 M acetátovém pufru. Následovala inkubace 2 hodiny v 0,1 M acetátovém pufru (pH 5,5) při pokojové teplotě na třepačce. Po skončení inkubace je nutné gel propláchnout v destilované vodě.

K vizualizaci proužků s enzymatickou aktivitou bylo použito opět barvení Stains-all (viz kapitola 4.3). Po skončení barvení byl gel opláchnut destilovanou vodou, taktéž standard, který se mezitím obarvil v Coomassie a odbarvil v roztoku methanolu a kyseliny octové. Standard se přiložil ke gelu a vše se ihned skenovalo, aby gel na světle neztratil barvu. Hyaluronidázová aktivita se objevila jako světlý proužek na tmavém gelu.

#### **Použité chemikálie:**

Separáčnící gel: 1000  $\mu$ l složky A; 1000  $\mu$ l složky B; 1960  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O;

40  $\mu$ l 0,2% HA/CHIS; 2,5  $\mu$ l TEMED; 25  $\mu$ l složky G

Startovací gel: 200  $\mu$ l složky A; 500  $\mu$ l složky C; 1300  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O; 2,5  $\mu$ l TEMED; 20  $\mu$ l složky G

Vzorkový pufr – neredukující (10ml): 0,6 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8; 5 ml 50% glycerol; 2 ml 10% SDS; 1 ml 1% bromofenol blue; 0,9 ml dH<sub>2</sub>O

Vzorkový pufr – redukující (10ml): 0,6 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8; 5 ml 50% glycerol; 2 ml 10% SDS; 0,5 ml 2-merkapt ethanol; 1 ml 1% bromofenol blue; 0,9 ml dH<sub>2</sub>O

## 4.6 Sledování citlivosti vzorků ovádů k SDS

Ke zjištění citlivosti k SDS jsme vycházeli z metody kapání vzorků na substrátový gel (viz kapitola 4.3). Použili jsem také 10% polyakrylamidový gel (tloušťka 0,75mm) s 0,002% hyaluronanem jako substrátem. Paralelně jsme připravili dva gely. Jeden bez SDS (viz kapitola 4.3), do druhého byly přidány 4 ml 10% SDS. Kromě toho jsme také použili dva různé vzorkové pufrы: vzorkový pufr s SDS a bez SDS (20 mM TRIS NaCl, viz kapitola 4.1), oba ředěny se vzorky 1:1. Na oba dva gely jsme pak podle totožného schématu nakapali vzorky tak, aby od každého druhu ováda byly na gelu dvě kapky ředěné různým pufrem. Objem kapky vždy 2  $\mu$ l.

Gely se vzorky jsme nechali inkubovat 2 hodiny v Petriho miskách (viz kapitola 4.3), poté jsme je propláchli v destilované vodě a přenesli do neprůhledných dóz. Následovalo vymytí SDS, nejprve 2 x 20 minut v 0,1 M TRISu bez NaCl s 1% TRITONem X-100, poté 20 minut v 0,1 M acetátovém pufru a dále pak inkubace 2 hodiny v 0,1 M acetátovém pufru (pH 5,5) při pokojové teplotě na třepačce. Po propláchnutí v destilované vodě jsme gely barvili stejně jako v kapitole 3.3 a po obarvení ihned naskenovali.

## 5. Výsledky

Výsledky předkládané práce zahrnují detekci přítomnosti hyaluronidázové aktivity ve slinných žlázách klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) a charakterizaci a porovnání hyaluronidázové aktivity u různých druhů ovádů (*Tabanidae*).

### 5.1 Testování hyaluronidázové aktivity ve slinách klíštěte obecného

Vzorek ze slinných žláz klíšťat *Ixodes ricinus* jsme použili pouze na průkaz na substrátových gelech s kopolymerizovanou kyselinou hyaluronovou (resp. chondroitin sulfátem).

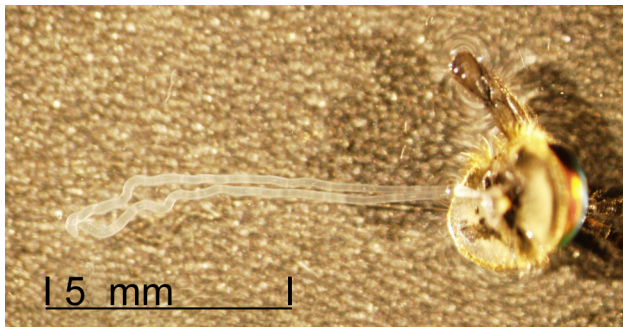
Jak je patrné na **obrázku 5** (viz dále v kapitole 5.4), aktivitu u klíštěte *Ixodes ricinus* se nám potvrdit nepodařilo, přestože jsme použili velmi koncentrovaný vzorek (cca 6  $\mu\text{g}$  na kapku). Slinné žlázy tohoto druhu tedy pravděpodobně hyaluronidázu neobsahují. Aktivita klíštěte se neprokázala ani na gelu obsahujícím chondroitin sulfát (**viz obr. 7**) a vzorek jsme proto vyřadili z dalších pokusů.

### 5.2 Přehled chycených ovádů, proteinové koncentrace jejich slinných žláz

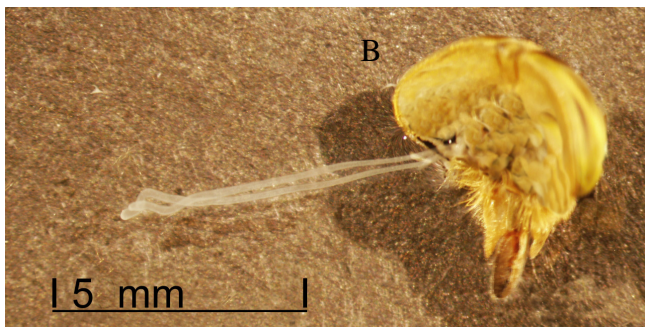
Na **obrázcích 4 a – d** jsou pod binokulární lupou vyfocené vypitvané slinné žlázy chycených ovádů. Žlázy jsou dlouhé, trubicovitého tvaru, lehce mléčně zabarvené. Velikost žláz se u jednotlivých rodů podstatně liší. U malých rodů, s délkou těla do 12 mm, (*Haematopota*, *Chrysops*) jsou žlázy kratší, kolem 8 mm. Žlázy rodu *Haematopota* jsou tenké a krátké, u rodu *Chrysops* jsou také tenké, ale relativně dlouhé. Větší rody ovádů dosahující délky těla až 27 mm (*Hybomitra*, *Tabanus*) mají žlázy s větším objemem. U rodu *Hybomitra* najdeme žlázy relativně tlusté, u rodu *Tabanus* tenčí, ale velmi dlouhé, svoji délkou mohou dokonce převyšovat délku těla ováda. U největšího chyceného druhu *Tabanus bovinus* lze naměřit přes 30 mm dlouhé žlázy.

**Obrázek 4. A - D Fotografie vypitvaných slinných žláz různých rodů ovádů**

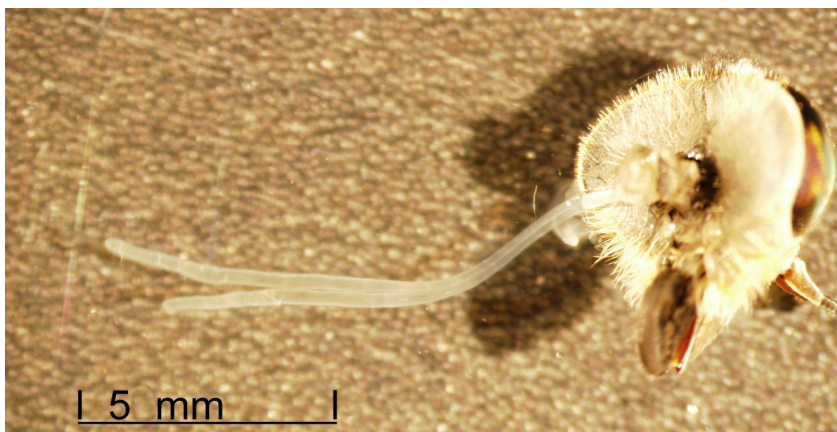
4. Žlázy rodu A. *Chrysops* (*Chrysops viduatus*), B. *Haematopota* (*Haematopota pluvialis*), C. *Hybomitra* (*Hybomitra bimaculata*), D. *Tabanus* (*Tabanus bovinus*)



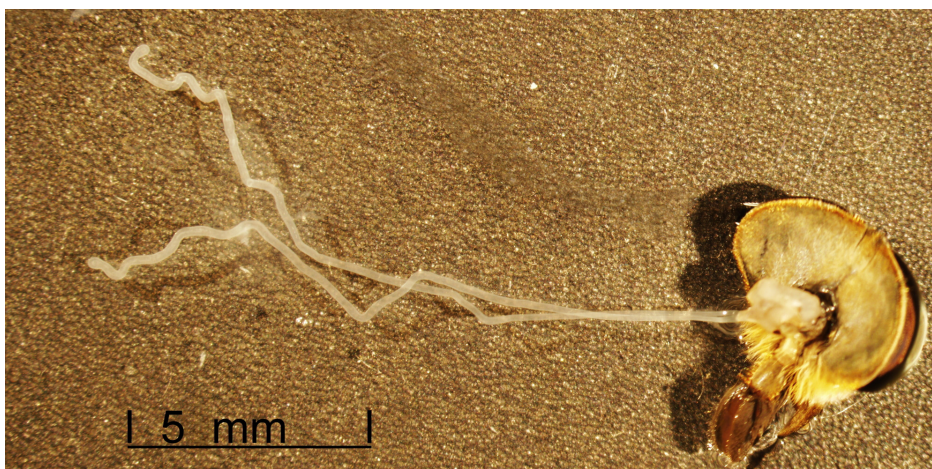
**A**



**B**



**C**



**D**



V následující tabulce (**Tabulka 2**) jsou zapsány všechny druhy ovádů, jejichž slinné žlázy byly vypitvány a následně použity v pokusech. Z některých pokusů jsme dva druhy ovádů vyloučili (konkrétně *Tabanus bovinus*, *Haematopota italica*) z důvodu malého množství vzorku.

Tabulka zároveň zahrnuje i výsledky z měření proteinové koncentrace. Žlázy různých druhů ovádů se lišily obsahem proteinů až desetinásobně. Nejmenší hodnoty se vyskytovaly u rodu *Chrysops* (konkrétně *Chrysops viduatus*). Nutno dodat, že velikost žlaz i jejich proteinová koncentrace se mírně liší i u stejného druhu, který byl odchycen v různých letech.

**Tabulka 2. Přehled druhů a jejich proteinová koncentrace**

Vzorek	Přibližný obsah proteinů na 1 žlázu (µg)
<i>Haematopota pluvialis</i> (HAP)	3,3
<i>Haematopota italica</i> (HAI)	3,5
<i>Chrysops viduatus</i> (CHV)	2,7
<i>Chrysops caecutiens</i> (CHC)	4,3
<i>Chrysops relictus</i> (CHR)	2,3
<i>Hybomitra ciureai</i> (HYC)	22,7
<i>Hybomitra muehlfeldi</i> (HYM)	13,2
<i>Tabanus autumnalis</i> (TAA)	37,0
<i>Tabanus bovinus</i> (TAB)	12,2
<i>Tabanus maculicornis</i> (TAM)	21,2

### 5.3 Měření pH optima a kvantifikace hyaluronidázové aktivity

V první části pokusů jsme vybrali tři druhy ovádů z různých rodů (*Hybomitra muehlfeldi*, *Chrysops viduatus*, *Haematopota pluvialis*), u kterých jsme studovali aktivitu enzymu v širokém rozmezí pH. Podle zkušebních pokusů jsme u každého druhu ováda určili vhodnou proteinovou koncentraci vzorku, aby byla v rozmezí hodnot, které byl fluorometr schopný podle daného standardu změřit. Hyaluronidázovou aktivitu těchto vzorků jsme pak měřili při různém pH, od 3,5 do

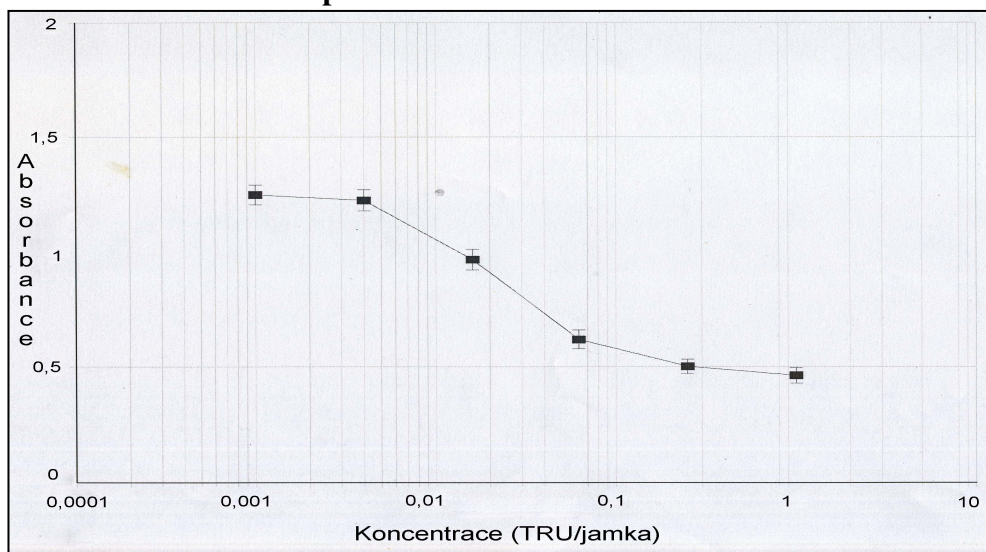
8,5. Při každém pokusu přístroj zároveň měřil dvojkově řaděný standard a z naměřených hodnot vytvořil kalibrační křivku (**Graf 1**), podle které poté odečítal hodnoty vzorků (v jednotkách turbidity TRU).

Křivky pH optima viz **Grafy 2, 3 a 4** jsou uvedeny pro jednotlivé zástupce rodů zvláště. Metoda měření aktivity na mikrotitračních destičkách je sice velmi citlivá, ale spolehlivé srovnání aktivit je možné pouze u vzorků porovnávaných rámci téže destičky. Největší aktivitu mají druhy při pH 4 (*Haematopota*) nebo pH 5 (*Chrysops*, *Hybomitra*). Průběh křivek pH optima u každého ze tří druhů se poněkud liší (viz **graf 5**), u všech ale aktivita prudce klesá při pH nižším než 4 a vyšším než 5,5.

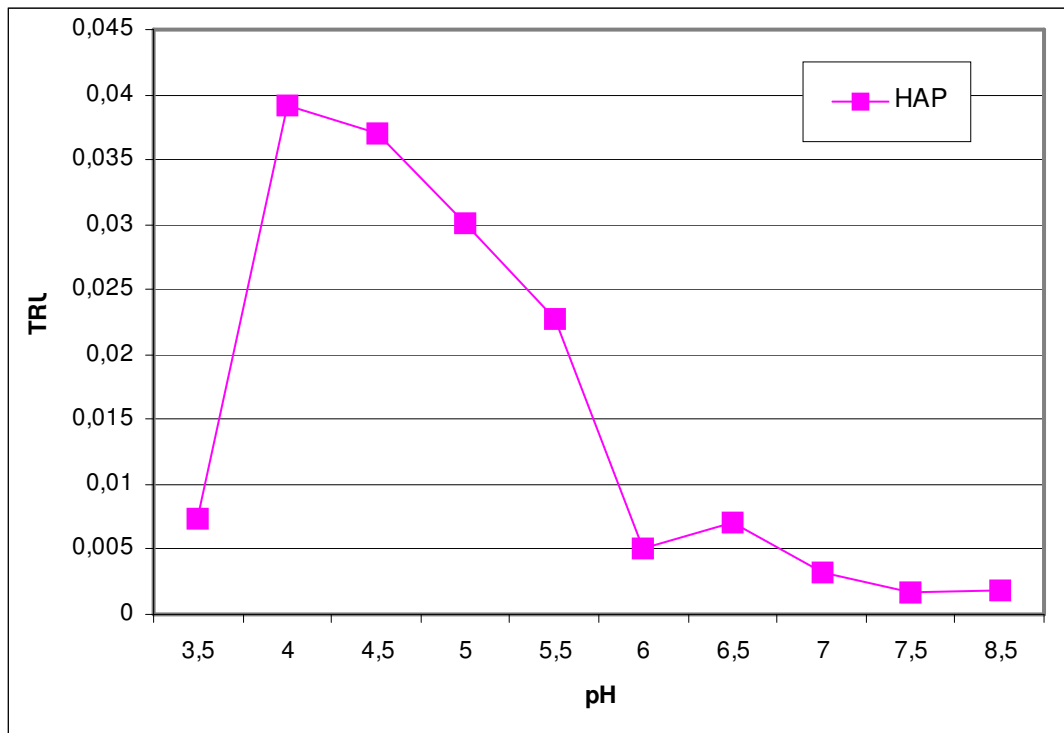
Podle těchto výsledků jsme poté provedli další pokusy, kdy jsme porovnali všechny dostupné vzorky při pH 4 a 5. Velká většina studovaných ovádů měla o něco silnější aktivitu při pH 5 (**graf 6**). Výjimkou je *Haematopota pluvialis*, u které je aktivita mírně vyšší při pH 4. Toto zjištění souhlasí s předchozí křivkou pH optima (viz **graf 2**).

Z grafu 2 je dále patrné, že jednotlivé druhy ovádů se v míře aktivity enzymu liší. Nejvyšší aktivita byla zaznamenána u velkých druhů, konkrétně u rodů *Hybomitra* a *Tabanus*, nízká naopak u malých druhů rodů *Haematopota* a *Chrysops* (zde s výjimkou druhu *Chrysops relictus*, u kterého byla opakovaně naměřena vyšší aktivita než u dalších dvou). Protože se rody navíc podstatně liší velikostí žláz, rozdíly v hyaluronidázové aktivitě se ještě zvýší, přepočteme-li ji na jednu žlázu daného druhu (viz **graf 7**).

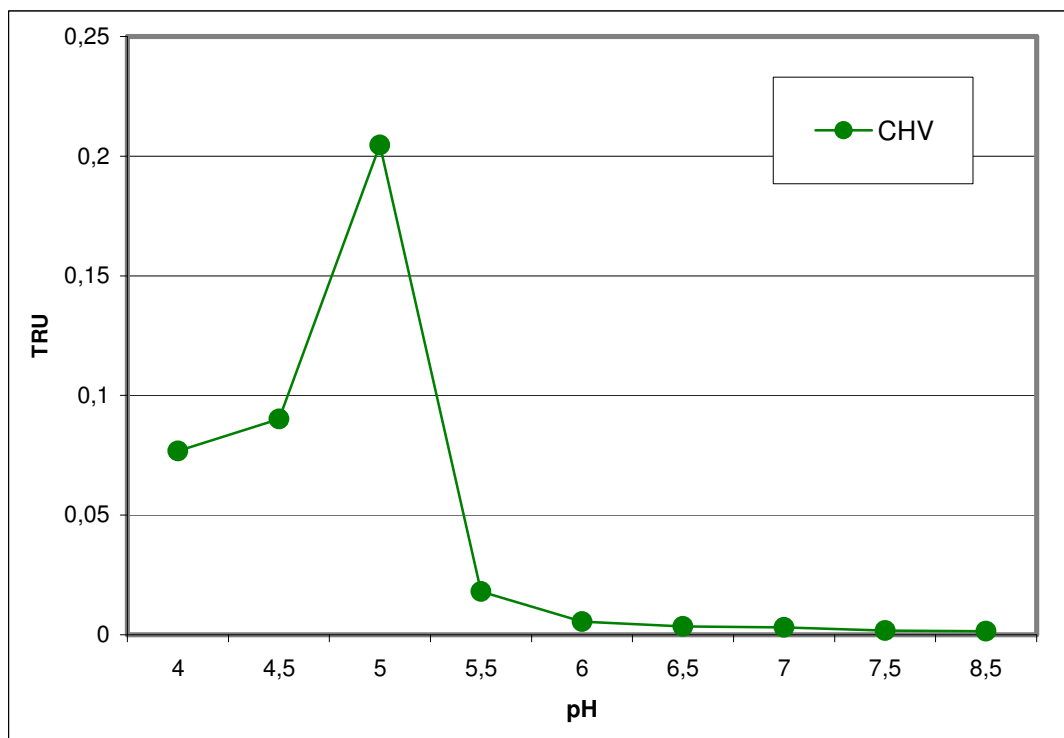
**Graf 1. Kalibrační křivka podle standardu**



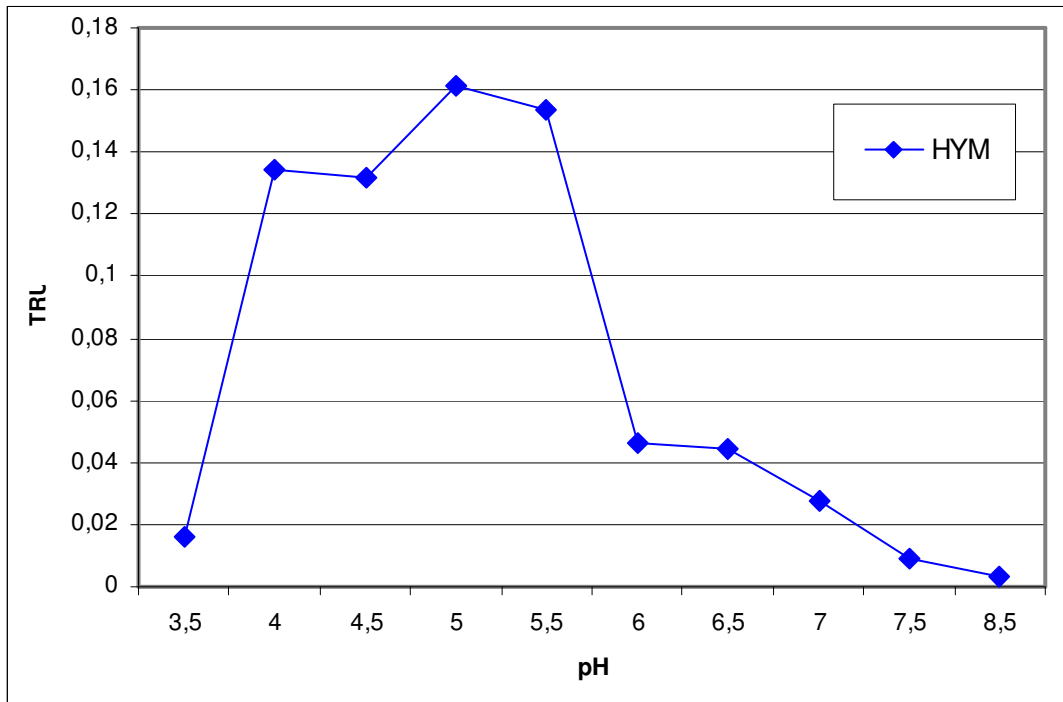
## 2. Graf pH optima u ováda *Haematopota pluvialis* (0,005 µg/jamku)



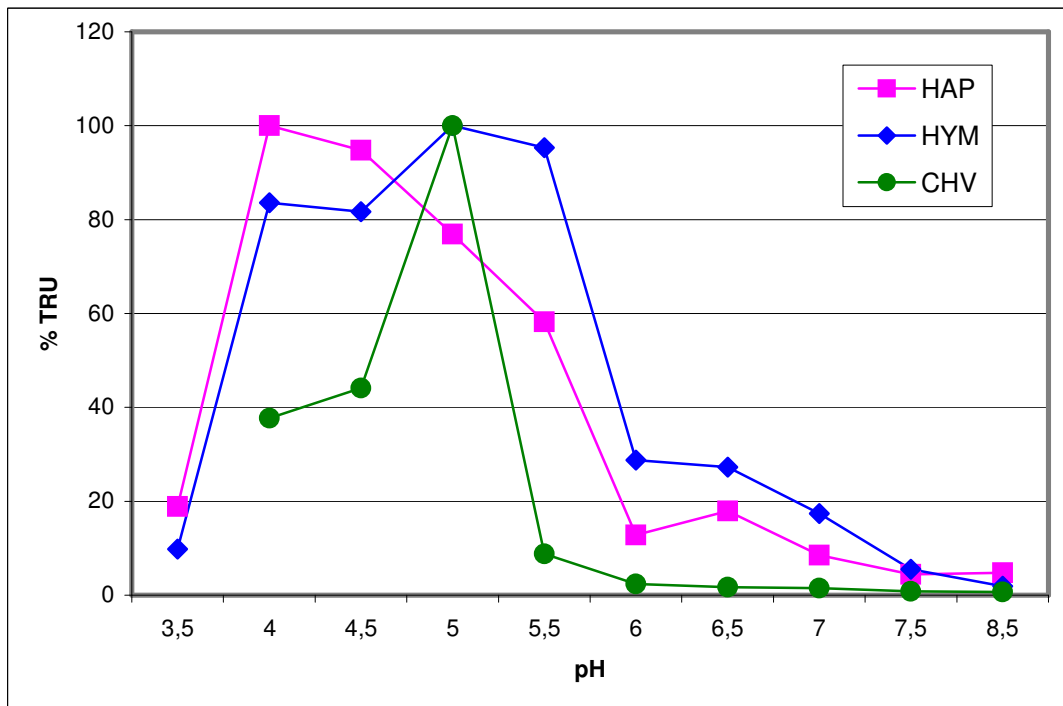
## Graf 3. pH optima u ováda *Chrysops viduatus* (0,01 µg/jamku)



**Graf 4. pH optima u ováda *Hybomitra muehlfeldi* (0,005 µg/jamku)**



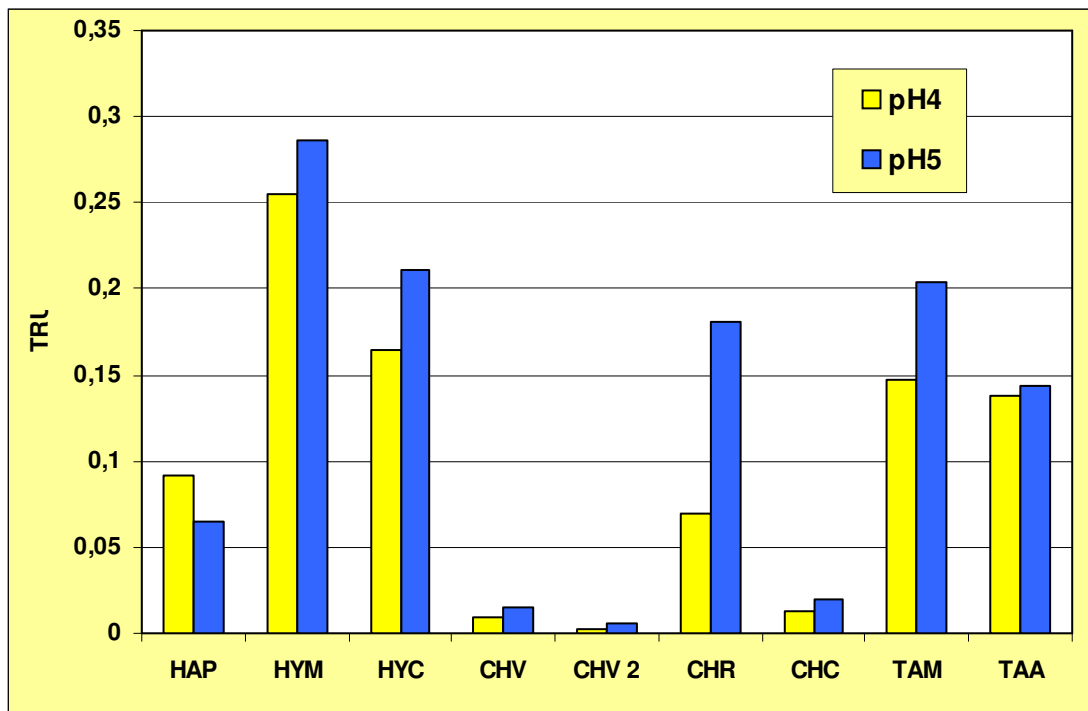
**Graf 5. pH optima všech tří druhů podle % TRU**



**Graf 6. Porovnání hyaluronidázové aktivity všech druhů při pH 4 a pH 5**

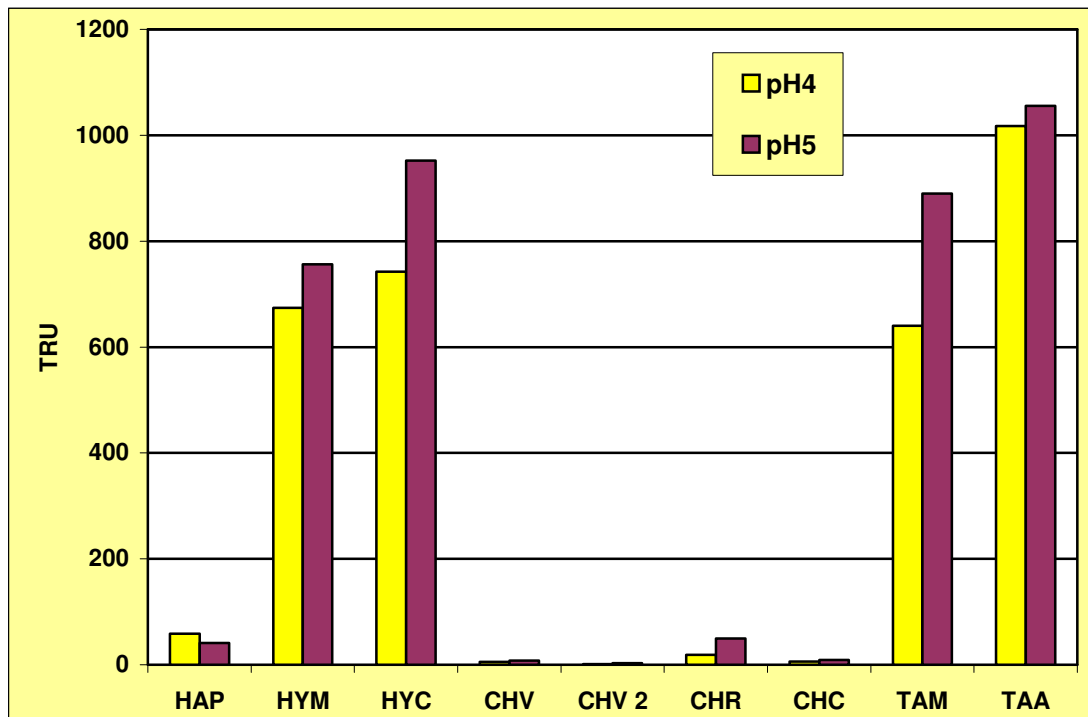
(koncentrace všech vzorků 0,005 µg proteinu/jamku)

(CHV 2 – druhý vzorek totožného druhu, z ovádů odchycených v odlišném roce)



**Graf 7. Porovnání hyaluronidázové aktivity všech druhů při pH 4 a pH 5.**

Přepočteno na jednu žlázu.



## 5.4 Substrátové gely

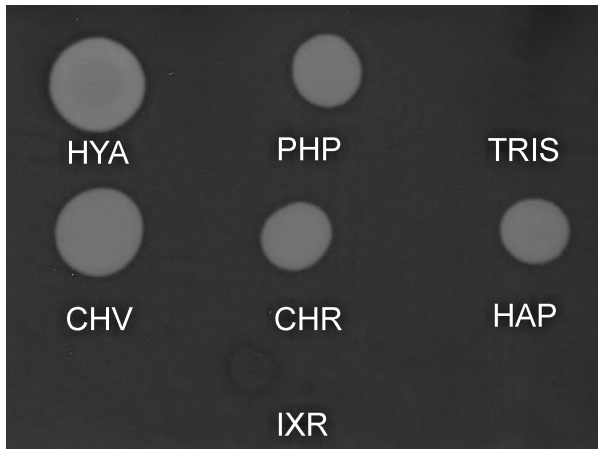
Na substrátových gelech s kopolymerizovanou kyselinou hyaluronovou (resp. chondroitin sulfátem) byla dokázána přítomnost hyaluronidázy ve všech vzorcích ze slinných žláz ovádů. Na první gel s 0,002% kyselinou hyaluronovou (viz **Obr. 5**) jsme vybrali vzorky některých druhů ovádů, které se zde skutečně ukázaly jako pozitivní, se silnou hyaluronidázovou aktivitou. Druhý gel (viz **obr. 6**) obsahuje již vzorky ze všech druhů ovádů, které byly k dispozici. Vzorky mají stejnou proteinovou koncentraci, aby je bylo možné zhruba porovnat. Komerční hyaluronidáza a vzorek ze slin *Phlebotomu papatasi* tvoří pozitivní kontrolu. Téměř u všech vzorků je přítomna silná aktivita. Velmi vysokou aktivitu měly například druhy rodu *Hybomitra* a také druh *Tabanus maculicornis*.

Ke zjištění substrátové specifity jsme udělali obdobné pokusy s gely se substrátem 0,002% chondroitin sulfátu (**Obr. 7 a 8**), neboť hyaluronidázy ovádů spadají do skupiny enzymů, které štěpí i chondroitin sulfát. Vzorky na druhém gelu jsou opět stejně koncentrované kvůli možnosti přibližného srovnání. Podobně jako na gelech s hyaluronanem je patrná nejsilnější aktivita u rodu *Hybomitra* a druhu *Tabanus maculicornis*.

Aktivita komerční hyaluronidázy je velmi dobře detekovatelná jak na gelu s hyaluronanem, tak na chondroitin sulfátu. Oproti tomu vzorek *P. papatasi* reagoval mnohem méně na gelu s chondroitin sulfátem ve vzorku. Hyaluronidázy ovádů jsou aktivní na obou typech substrátů. Na gelech s chondroitin sulfátem nejsou sice tak jasné viditelné jako komerční hyaluronidáza, ale rozhodně se jejich aktivita neklesá v takové míře jako u *Phlebotoma papatasi*.

K detailnímu srovnání a k přesnější kvantifikaci aktivit u různých druhů ovádů byla využita metoda substrátových destiček (viz předchozí kapitola).

**Obrázek 5. Hyaluronidázová aktivita ve slinách ovádů a klíštěte na substrátovém gelu s hyaluronanem**



Kontroly ( $\mu\text{g}$  proteinů/ $2\mu\text{l}$  = 1 kapka):

HYA - Ovčí testikulární hyáza ( $2\mu\text{g}$ )

PHP - *Phlebotomus papatasi* ( $0,8\mu\text{g}$ )

TRIS - 20mM Tris-NaCl ( $2\mu\text{l}$ )

Vzorky ( $\mu\text{g}$  proteinů/ $2\mu\text{l}$  = 1 kapka):

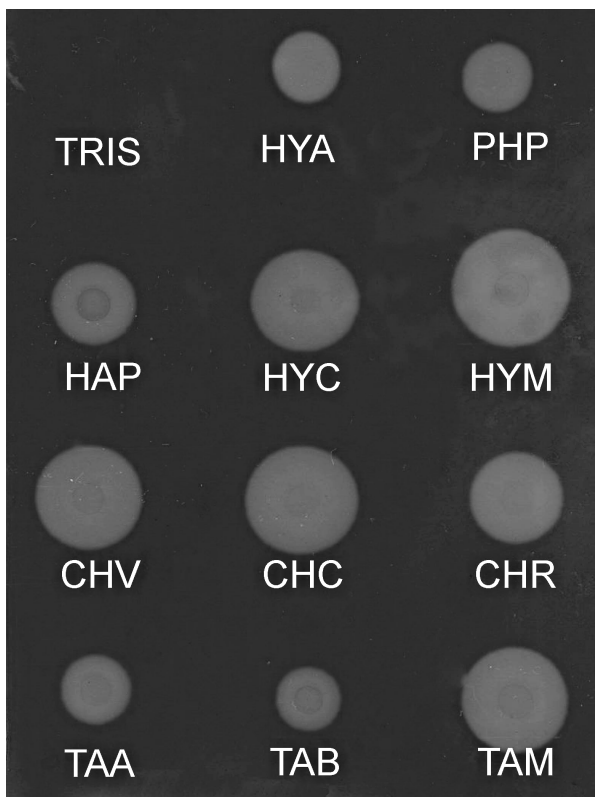
CHV - *Chrysops viduatus* ( $0,49\mu\text{g}$ )

CHR - *Chrysops relictus* ( $0,18\mu\text{g}$ )

HAP - *Haematopota pluvialis* ( $0,26\mu\text{g}$ )

IXR - *Ixodes ricinus* (cca  $6,0\mu\text{g}$ )

**Obrázek 6. Hyaluronidázová aktivita ve slinách různých druhů ovádů na substrátovém gelu s hyaluronanem**



Kontroly ( $\mu\text{g}$  proteinů/ $1\mu\text{l}$  = 1 kapka):

TRIS - 20mM Tris-NaCl ( $1\mu\text{l}$ )

HYA – ovčí testikulární hyáza ( $1\mu\text{g}$ )

PHP – *Phlebotomus papatasi* ( $0,4\mu\text{g}$ )

Vzorky (vždy cca  $1,3\mu\text{g}$  proteinů/ $1\mu\text{l}$  = 1 kapka):

HAP – *Haematopota pluvialis*

HYC – *Hybomitra ciureai*

HYM – *Hybomitra muehlfeldi*

CHV – *Chrysops viduatus*

CHC – *Chrysops caecutiens*

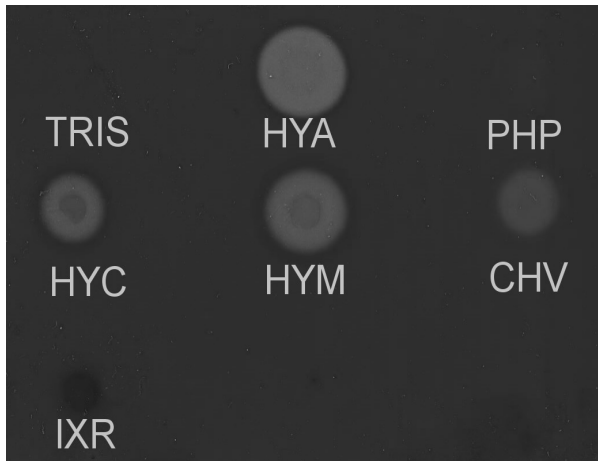
CHR – *Chrysops relictus*

TAA – *Tabanus autumnalis*

TAB – *Tabanus bovinus*

TAM – *Tabanus maculicornis*

**Obrázek 7. Hyaluronidázová aktivita ve slinách ovádů a klíštěte na substrátovém gelu s chondroitin sulfátem**



Kontroly ( $\mu\text{g}/2 \mu\text{l} = 1$  kapka):

TRIS - 20mM Tris-NaCl (4 $\mu\text{l}$ )

HYA - komerční testikulární  
hyáza(4 $\mu\text{g}$ )

PHP - *Phlebotomus papatasi* (4 $\mu\text{g}$ )

Vzorky ( $\mu\text{g}/2 \mu\text{l} = 1$  kapka):

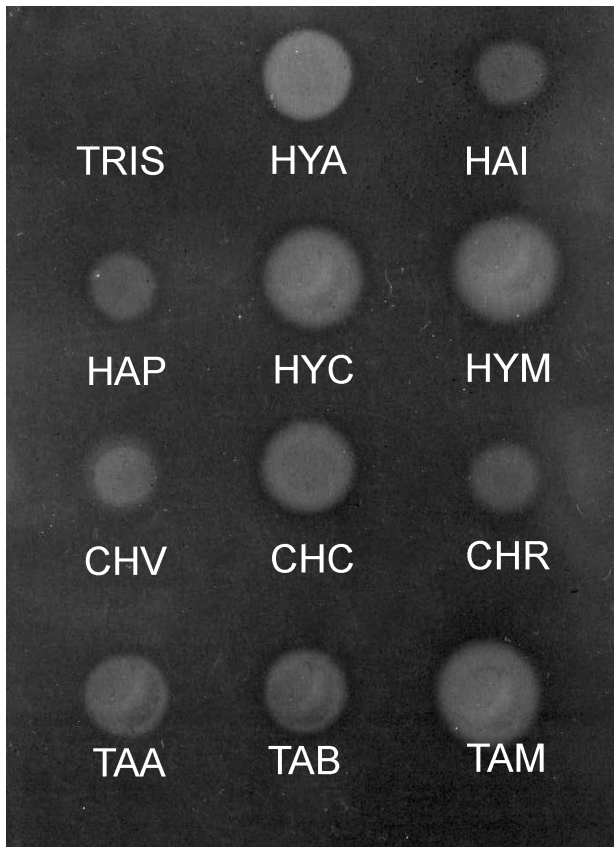
HYC - *Hybomitra ciureai* (6,25 $\mu\text{g}$ )

HYM - *Hybomitra muehlfeldi* (6,01 $\mu\text{g}$ )

CHV - *Chrysops viduatus* (6,24 $\mu\text{g}$ )

IXR - *Ixodes ricinus* (12 $\mu\text{g}$ )

**Obrázek 8. Hyaluronidázová aktivita ve slinách různých druhů ovádů na substrátovém gelu s chondroitin sulfátem**



Kontroly ( $\mu\text{g}$  proteinů/2 $\mu\text{l} = 1$   
kapka):

TRIS – 20mM TRIS-NaCl (1 $\mu\text{l}$ )

HYA – Ovčí testikulární hyáza (2 $\mu\text{g}$ )

Vzorky (vždy cca 0,46  $\mu\text{g}$   
proteinů/2 $\mu\text{l} = 1$  kapka):

HAI – *Haematopota italica*

HAP – *Haematopota pluvialis*

HYC – *Hybomitra ciureai*

HYM – *Hybomitra muehlfeldi*

CHV – *Chrysops viduatus*

CHC – *Chrysops caecutiens*

CHR – *Chrysops relictus*

TAA – *Tabanus autumnalis*

TAB – *Tabanus bovinus*

TAM – *Tabanus maculicornis*



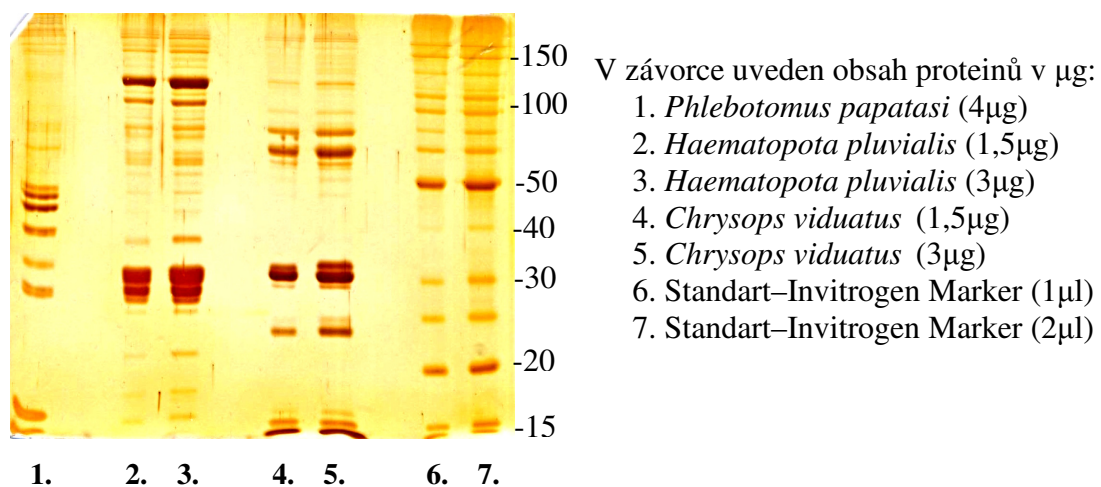
## 5.5 Proteinové profily slinných žláz

Elektroforeticky rozdělené proteiny jsme na gelech nabarvili stříbrem. Většinu druhů ovádů (kromě rodu *Chrysops*) lze porovnat na 10% polyakrylamidovém gelu. Proteinové profily se liší především mezi rody ovádů, mezidruhové rozdíly jsou menší. U zástupců rodu *Haematopota*, *Hybomitra* a *Tabanus* byly nejvýraznější proteinové proužky přítomny ve třech oblastech molekulárních hmotností: kolem 30 kDa, okolo 80 kDa a mezi 100 – 120 kDa (viz **obrázek 10**).

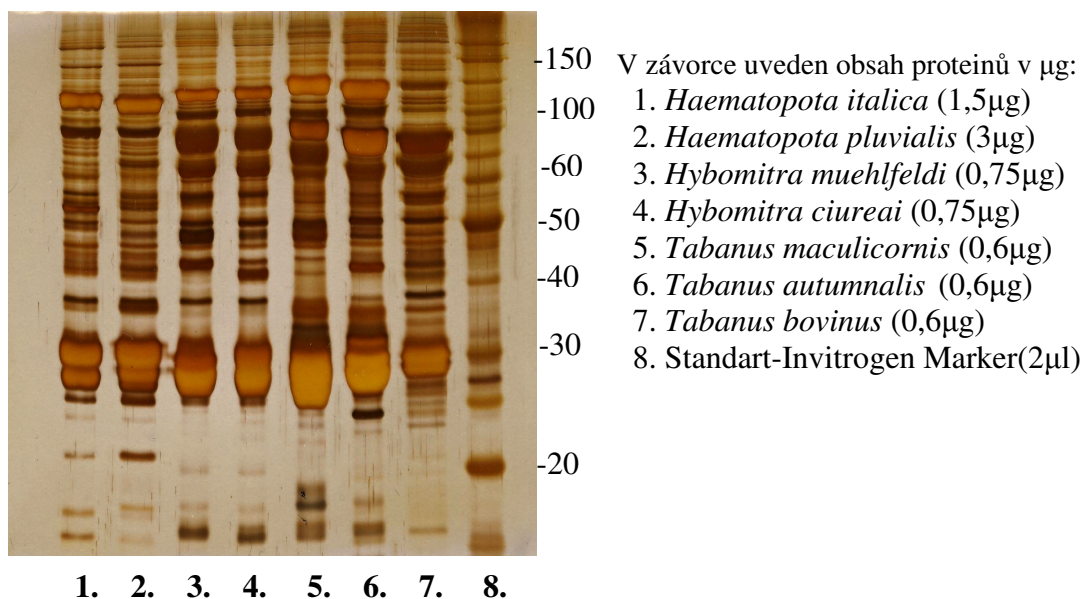
Pro rod *Chrysops* jsme použili 12% polyakrylamidový gel (**Obr. 11**), neboť jsme v předběžných pokusech (viz **obr. 9**) zjistili, že o tohoto rodu je ve slinách řada nízkomolekulárních proužků. Narozdíl od předchozích rodů ovádů zde chybí v profilu hlavní vysokomolekulární pruhy v oblastech okolo 80 a 110 kDa, nejsilnější proteinové pruhy u rodu *Chrysops* jsou naopak v oblasti 8 kDa. Hlavní odlišnost mezi jednotlivými druhy rodu *Chrysops* je rozdílné umístění výrazného proužku o molekulární hmotnosti okolo 20 kDa.

Hyaluronidáza tvoří v profilu všech druhů ovádů pravděpodobně proužek, který je po stříbření těžko detekovatelný. Můžeme ho pouze odhadnout podle molekulové hmotnosti, kterou lze vyčíst ze zymografické analýzy.

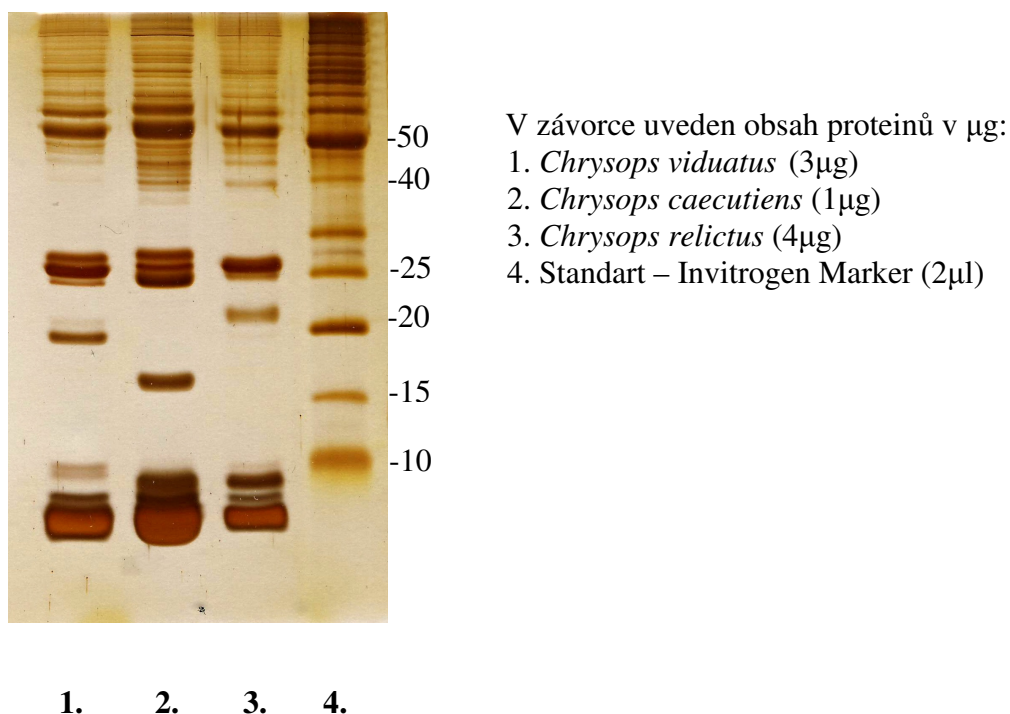
### Oráček 9. Předběžný pokus s porovnáním proteinového profilu slin rodů *Haematopota* a *Chrysops*



**Obrázek 10. Zobrazení proteinového profilu slin rodů *Haematopota*, *Hybomitra* a *Tabanus***



**Obrázek 11. Zobrazení proteinového profilu slin rodu *Chrysops***



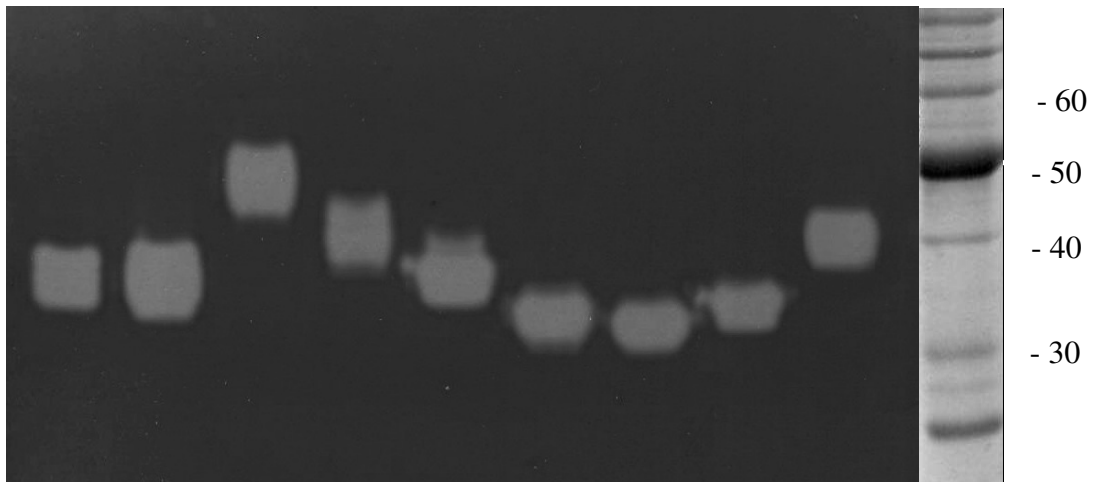
## 5.6 Zymografická analýza

Touto metodou jsme z elektroforeticky rozdělených vzorků vizualizovali pouze hyaluronidázu, nejprve za neredukujících a poté za redukujících podmínek. Vzorky v gelech nejsou stejně koncentrované – koncentrace byla vybrána na základě předběžných pokusů.

Za neredukujících podmínek (viz **obr. 12**) měly vzorky silnou aktivitu. Molekulová hmotnost hyaluronidáz se pohybovala v rozpětí od 32 asi do 50 kDa, největší byla zjištěna u druhu *Chrysops viduatus* a *Chrysops caecutiens*, nejnižší pak u druhů rodu *Hybomitra*, konkrétně u druhu *Hybomitra muehlfeldi*. Molekulární hmotnosti hyaluronidázy jsou v některých případech velmi odlišné i u druhů jednoho rodu, zejména u zástupců rodu *Chrysops*. Největší rozdíl je vidět mezi druhem *Chrysops viduatus* (asi 50 kDa) a druhem *Chrysops relictus* (asi 38 kDa).

Za redukujících podmínek (**Obr. 13**) měly některé vzorky slabší aktivitu, než za podmínek neredukujících. Na základě výsledků z předběžného pokusu jsme proto dávali na gel více koncentrované vzorky. Proužky některých druhů jsou za redukujících podmínek užší a díky tomu se lépe odečítá molekulová hmotnost. Rozsah zjištěných molekulových hmotností je podobný jako za neredukujících podmínek, od 38 do 50 kDa. Ve srovnání s neredukujícími podmínkami měla ale většina vzorků mírně odlišnou molekulovou hmotnost. Nejvíce byl rozdíl patrný u rodů *Tabanus* a *Hybomitra*, zejména pak u druhu *Hybomitra muehlfeldi* (32 kDa za neredukujících a 40 kDa za redukujících podmínek).

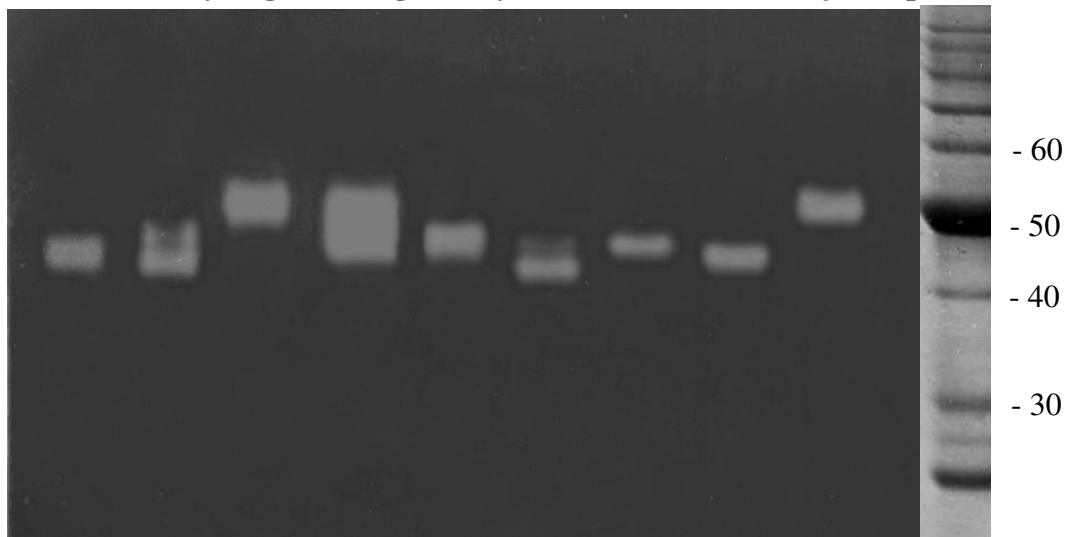
**Obrázek 12. Zymografie na gelu s hyaluronanem za neredukujících podmínek**



HAP HAI CHV CHC CHR HYC HYM TAA TAM

Vzorky (obsah proteinů v µg): HAP - *Haematopota pluvialis* (0,027), HAI - *Haematopota italica* (0,027), CHV - *Chrysops viduatus* (0,030), CHC - *Chrysops caecutiens* (0,020), CHR - *Chrysops relictus* (0,027), HYC - *Hybomitra ciureai* (0,016), HYM - *Hybomitra muehlfeldi* (0,015), TAA - *Tabanus autumnalis* (0,039), TAM - *Tabanus maculicornis* (0,016)

**Obrázek 13. Zymografie na gelu s hyaluronanem za redukujících podmínek**



HAP HAI CHV CHC CHR HYC HYM TAA TAM

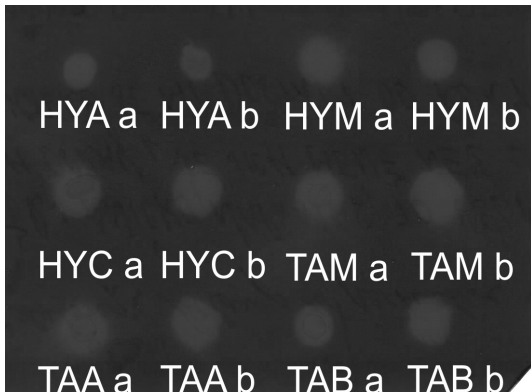
Vzorky (obsah proteinů v µg): HAP - *Haematopota pluvialis* (0,065), HAI - *Haematopota italica* (0,070), CHV - *Chrysops viduatus* (0,060), CHC - *Chrysops caecutiens* (0,040), CHR - *Chrysops relictus* (0,054), HYC - *Hybomitra ciureai* (0,032), HYM - *Hybomitra muehlfeldi* (0,030), TAA - *Tabanus autumnalis* (0,079), TAM - *Tabanus maculicornis* (0,032)

## 5.7 Citlivost hyaluronidázy na SDS

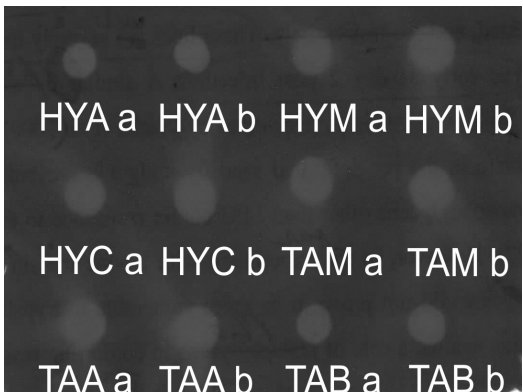
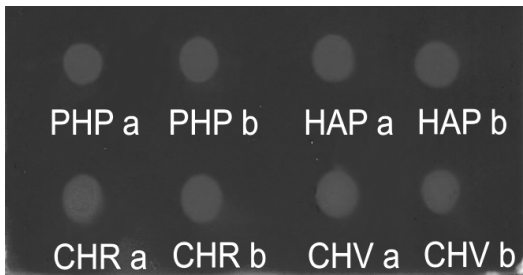
Touto metodou na substrátových gelech, z nichž jeden z nich vždy obsahoval SDS, jsme mohli zjistit, zda na něj vzorky nejsou citlivé. **Obrázek 14** znázorňuje tyto dva gely, na každém z nich je navíc od daného druhu ováda jeden vzorek ředěný běžným pufrém (**a**) a druhý vzorkovým pufrém s SDS (**b**). Pokud by hyaluronidáza reagovala na přítomnost SDS, všechny kapky na gelech B (s SDS) a také všechny kapky **b** na gelech A by byly méně aktivní. Jelikož se tak nestalo, lze říci, že SDS má na hyaluronidázovou aktivitu ovádů malý nebo žádný vliv. Pozitivní kontrolou je testikulární hyaluronidáza.

**Obrázek 14.** Gely A, B - Ověření citlivosti na SDS (prot.koncentrace 0,5/0,25 µg/µl)

**gely A – neobsahují SDS**



**gely B – obsahují SDS**



**PHP** – *Phlebotomus papatasi* (60žl/15 µl)

**HAP** – *Haematopota pluvialis* (0,46 µg/µl)

**CHR** – *Chrysops relictus* (0,46 µg/µl)

**CHV** – *Chrysops viduatus* (0,54 µg/µl)

**HYA** – ovčí testikulární hyáza (1 µl)

**HYM** - *Hybomitra muehlfeldi* (0,22 µg/µl)

**HYC** - *Hybomitra ciureai* (0,23 µg/µl)

**TAM** – *Tabanus maculicornis* (0,24 µg/µl)

**TAA** - *Tabanus autumnalis* (0,236 µg/µl)

**TAB** – *Tabanus bovinus* (0,22 µg/µl)

**a** – vzorky 1:1 s TRISem (20mM TRIS-NaCl)

**b** – vzorky s nered. vzorkovým pufrém s SDS 1:1

## 6. Diskuze

Pro diplomovou práci zaměřenou na charakterizaci hyaluronidázy jsme z krevsajících členovců, u kterých jsme předpokládali hyázovou aktivitu, vybrali klíšťata (Ixodidae) a ovády (Tabanidae). Pomocí vybraných metod se nám podařilo potvrdit (či vyvrátit) přítomnost enzymů. V případě pozitivního nálezu u ovádů jsme kvantifikovali hyaluronidázovou aktivitu a popsali další vlastnosti enzymů.

Na základě starých pokusů Neitz et al., 1978 a 1987, které popisovaly hyaluronidázovou aktivitu ve slinách klíšťat *Amblyomma hebraeum* a *Ornithodoros savignyi*, jsme se rozhodli pro studium hyaluronidázy u evropského druhu klíštěte *Ixodes ricinus*. Přestože byl použit velmi koncentrovaný vzorek žláz a průkaz relativně citlivou metodou substrátových gelů (polyakrylamidové gely s kopolymerizovanou kyselinou hyaluronovou, resp. chondroitin sulfátem), aktivitu se nepodařilo prokázat. Výsledek odpovídá práci Chmelaře (2008), který hyaluronidázovou sekvenci v sialomu téhož klíštěte, *Ixodes ricinus*, nenašel.

U ostatních druhů klíšťat zatím hyázová aktivita zkoumána nebyla, u některých je známo proteinové složení slin pomocí cDNA. Konkrétně byly zveřejněny cDNA knihovny slinných žláz u druhů *Dermacentor andersoni* (Chaidez et al., 2006), *Ixodes pacificus* (Francischetti, 2005) a *Ixodes scapularis* (Ribeiro et al., 2006). Sekvence odpovídající hyaluronidáze ale nebyly nalezeny ani u jednoho ze studovaných druhů.

Domnívám se, že by bylo vhodné ověřit aktivitu u obou druhů z původních pokusů Neitze et al. (1978, 1987), jelikož před více jak čtvrt stoletím byly pro detekci hyaluronidázové aktivity používány málo citlivé metody, v tomto případě založené na redukci turbidity. V současné době je k dipozici řada vhodnějších a citlivějších metod, které se dají s úspěchem použít i u nepurifikovaných hyaluronidáz, přičemž téměř nehrozí zkreslení výsledků jinými komponenty přítomnými v původním materiálu vzorku. Jedná se například o citlivou metodu na základě ELISA nebo zymografii (viz kapitola 4.).

Druhou skupinou, u které jsme studovali hyaluronidázovou aktivitu, byli ovádi (Tabanidae). Aktivita byla již dříve prokázána u druhů *Tabanus yao* (Xu et al., 2008) a *Chrysops viduatus* (Volfová et al., 2008).

Metodou substrátových gelů byla potvrzena silná aktivita u všech námi zkoumaných druhů ovádů. K viditelnému průkazu na gelu stačily vzorky velice zředěné – zatímco vzorek *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae), použitý jako pozitivní kontrola, odpovídal například ekvivalentu jedné žlázy, vzorky ovádů byly ředěny mnohdy na setiny žlázy (viz kapitola 5.).

V dalších pokusech bylo zkoumáno, zda hyaluronidáza slinných žlaz ovádů specificky štěpí hyaluronan, a proto byl testován též jiný substrát savčí extracelulární matrix, chondroitin sulfát. Všechny vzorky slinných žlaz ovádů chondroitin sulfát rozkládaly. Znamená to, že hyaluronidázy ovádů patří do skupiny endo-N-acetyl-hexosaminidáz, které zahrnují savčí hyaluronidázy a hyaluronidázy blanokřídlého hmyzu (shrnutí viz Kreil, 1995). Hyaluronidázy této skupiny štěpí právě i chondroitin sulfát, ovšem různou měrou. Oproti tomu hyaluronidázy pijavek a hlístic patří do skupiny endoglukuronidáz a chondroitin sulfát neštěpí. V předcházejících studiích zabývajících se různými skupinami krevsajících hmyzu, konkrétně flebotomy (Psychodidae) nebo blechami, *Ctenocephalides felis* byla prokázána výrazně nižší aktivita enzymu na substrátu s chondroitin sulfátem, než na substrátu s hyaluronanem, (Černá et al., 2002, Volfová et al., 2008). U ovádů je naopak aktivita silnější, ovšem ne tak silná, jako u ovčí testikulární hyaluronidázy používané jako pozitivní kontrola.

Metoda kapání vzorků na substrátové gely přinesla i prvé předběžné údaje o tom, že hladina hyaluronidázové aktivity je různá u různých druhů ovádů. Vysoká aktivita enzymu na obou typech substrátu byla zjištěna například u druhů *Hybomitra muehlfeldi* a *H. ciureai* a u druhu *Tabanus maculicornis*. Detailnější kvantifikace hyaluronidázové aktivity byla provedena pomocí velmi citlivé metody mikrotitračních destiček s navázaným biotinylovaným hyaluronanem. Zde bylo potvrzeno, že se jednotlivé druhy ovádů v míře aktivity enzymu liší, přičemž nejvyšší aktivitu enzymu mají velké druhy ovádů, konkrétně rody *Hybomitra* a *Tabanus*, nižší naopak malé druhy rodů *Haematopota* a *Chrysops* (s mírnou odchylkou u druhu *Chrysops relictus*). Je možné, že jsou tyto výrazné rozdíly zapříčiněny odlišnými hostiteli velkých a malých druhů ovádů a samotným způsobem sání – velké druhy nasají větší objem krve za stejný čas, jako malé druhy (Chvála et al., 1980, Kazimírová et al., 2002).

Metoda mikrotitračních destiček je vhodná i ke stanovení pH optima. To se pohybovalo u druhu *Haematopota pluvialis* okolo pH 4, u všech ostatních

studovaných druhů kolem pH 5. Aktivita klesá při pH nižším než 4 a vyšším než 5,5, zachována v malé míře je ovšem v širším rozmezí. Podobný trend najdeme například i u flebotomů. Hyaluronidázy druhů *Phlebotomus papatasi* a *Lutzomyia longipalpis* mají optimum při pH 5, ale aktivita je přítomna až do pH 8. U muchničky *Simulium vittatum* je hyaluronidáza nejaktivnější kolem pH 6 (Ribeiro et al., 2000). Toto široké pH optimum není u hyaluronidáz výjimečné: zatímco například lysosomální enzymy mají aktivitu v úzké oblasti pH, jiné, např. hyaluronidázy savců, mají rozpětí široké.

Molekulová hmotnost enzymů byla změřena zymografickou metodou na substrátových gelech. I v této vlastnosti se vzorky jednotlivých druhů liší - hmotnosti se pohybují v rozmezí od 32 do 50 kDa, přičemž největší molekulovou hmotnost má druh *Chrysops viduatus* a *Chrysops caecutiens*, nejmenší druhy rodu *Hybomitra*, konkrétně *Hybomitra muehlfeldi*. Molekulové hmotnosti jsou ale odlišné nejen mezi rody ovádů, ale v některých případech i u druhů jednoho rodu, zejména u zástupců rodu *Chrysops* (u *Chrysops viduatus* 50 kDa zatímco u *Chrysops relictus* 38 kDa). Hodnoty molekulové hmotnosti odpovídají těm, které byly změřeny již v předcházejících studiích. Konkrétně byla zjištěna hyaluronidáza o molekulové hmotnosti 50 kDa u druhu *Chrysops viduatus* (Volfová et al., 2008) a 35 kDa u druhu *Tabanus yao* (Xu et al., 2008).

Zymografie ze redukujících podmínek dokládá stabilitu enzymů – merkaptoethanol hyaluronidázovou aktivitu ovádů neinhiboval, na rozdíl např. od tiplíka *Culicoides sonorensis* nebo blechy *Ctenocephalides felis* (Volfová et al., 2008). Podobný efekt může mít redukční činidlo i na savčí enzymy – a například hyaluronidázy ze spermií makaků PH-20 ztratily za redukujících podmínek aktivitu úplně (Li et al., 2002). Přidání merkaptoethanolu ale způsobilo u některých druhů ovádů rozdíly v molekulových hmotnostech oproti podmínkám neredukujícím. Rozsah molekulových hmotností vzorků všech ovádů je sice podobný (od 38 do 50 kDa), ale jednotlivé vzorky se mírně liší, srovnáme-li je s hodnotou za neredukujících podmínek. Největší rozdíl v hmotnostech mají rody *Tabanus* a *Hybomitra*, zejména pak druh *Hybomitra muehlfeldi* (32 kDa za neredukujících a 40 kDa za redukujících podmínek).

Vzorky jsou též aktivní i po zahřátí 45 minut při 45 °C. Přestože nebyly vyzkoušeny i různé vyšší teploty, jako bylo provedeno v pokusu Černá et al. (2002), lze i z tohoto předpokládat částečnou termostabilitu vzorků.



Dalšími pokusy na substrátových gelech s hyaluronanem bylo testováno, zda jsou enzymy stabilní v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), který může mít na některé hyaluronidázy vliv. Enzymy komára *Culex quinquefasciatus* hydrolyzovaly substrát pouze v případě, kdy do gelu nebyl přidán SDS, což zapříčinilo ztrátu aktivity i při zymografické metodě (Volfová et al., 2008). Prokázali jsme, že hyaluronidázovou aktivitu ovádů má ale SDS malý nebo žádný vliv. Podobně je tomu i u zkoumaného druhu *Chrysops viduatus* v předešlých pokusech (Volfová et al., 2008).

Stříbřením jsme zobrazili proteinový profil všech druhů ovádů, které jsme měli k dispozici. Profily se liší více mezi rody ovádů, než mezi jednotlivými druhy, přičemž nejvíce se od ostatních odlišuje rod *Chrysops*. U zástupců rodu *Haematopota*, *Hybomitra* a *Tabanus* byly nejvýraznější proteinové proužky přítomny ve třech oblastech molekulárních hmotností (kolem 30 kDa, 80 kDa a mezi 100 – 120 kDa). Rod *Chrysops* má ve slinách řadu proteinů o nízké molekulární velikosti. Narozdíl od předchozích rodů ovádů zde chybí v profilu hlavní proteiny o vysoké molekulární velikosti v oblastech okolo 80 a 110 kDa, prominující proteiny jsou naopak cca 8 kDa velké. Vše podobně jako u čtyřech druhů ovádů v Kazimírové et al. (2002). Celkově jsou proteinové profily ovádů výrazně odlišné od jiných skupin krevsajících hmyzu, například flebotomů. Narozdíl od nich obsahují slinné žlázy ovádů například proteiny o molekulové hmotnosti nad 100 kDa, které u flebotomů nenajdeme (Černá et al., 2002).

Prokázali jsme, že hyaluronidáza je běžnou součástí slinných žláz u všech zkoumaných druhů ovádů. Zdá se, že tento enzym je velice důležitý pro telmofágní hmyz (pool feeders), kde usnadňuje zvětšení hemorhagické léze, ze které hmyz saje, na rozdíl od hmyzu solenofágního (vessel feeders), který saje přímo z cévy. Dosavadní výsledky tomuto rozdělení zhruba odpovídají: hyaluronidázová aktivita byla nalezena především u muchniček (*Simuliidae*), flebotomů (*Phlebotomidae*), tiplíků (*Ceratopogonidae*) a ovádů (*Tabanidae*). Všechny tyto jmenované čeledi patří mezi telmofágní hmyz. U většiny zástupců solenofágního hmyzu hyaluronidázová aktivita přítomna nebyla: vši, ploštice (*Triatominae*), komáři (*Anopheles stephensi* a *Aedes aegypti*), moucha tsetse (*Glossina palpalis*) a bodalka (*Stomoxys calcitrans*) (Černá et al., 2002, Volfová et al., 2008). Výjimkou jsou komár (*Culex quinquefasciatus*) a homogenát z celých těl blechy (*Ctenocephalides felis*) u kterých byla potvrzena aktivita přestože oba zástupci jsou solenofágní.

V případě blechy to lze možná vysvětlit tím, že na pokusy byl použit extrakt z celých těl a nikoliv pouze ze slinných žláz (Volfová et al., 2008).

Hyaluronidáza je významná jako „spreading factor“ pro další farmakologicky aktivní složky přítomné ve slinných žlázách. Kromě toho, že usnadňuje sání krve, může mít vliv i na přenoc patogenů. Volfová et al. (2008) dokázali u modelu *Leishmania – Phlebotomus*, že hyaluronidáza zvyšuje infektivitu leishmanií pro myši BALBc. Navrhují, že hyaluronidáza společně s ostatními složkami slin může usnadňovat přenos dalších patogenů přenášených krevsajíci vektory, hlavně těmi, jejichž sliny mají vysokou hyaluronidázovou aktivitu. Domnívám se, že podobný případ může nastat i u ovádů a patogenů, které přenášejí. Ovádi jsou jedni z nejvýznamnějších vektorů přenášejících patogeny mechanicky na silném sosáku. Takto přenášejí například původce tularemie (*Francisella tularensis*), antraxu (*Bacillus anthracis*) či spavé nemoci (*Trypanosoma evansi* a další druhy). Je možné, že s úspěchem mechanického přenosu může souviset i složení slinných žláz, což zatím nebylo zkoumáno.

Velmi málo je známo o možné roli hyaluronidáz během alergických reakcí, které se objeví u některých pacientů po opětovném sání krevsajícím dvoukřídlým hmyzem (Diptera). U blanokřídlých (Hymenoptera) je hyaluronidáza obsažená v jedu zodpovědná za cross-reaktivitu jedu se sérem alergických pacientů (King et al., 1996), především mezi včelími a vosími jedy. To je vysvětlováno 56% sekvenční homologií hyaluronidázy v jedech těchto dvou blanokřídlých (Lu et al., 1995). Se savčí PH-20 je hyaluronidáza těchto jedů homologní ze 20%, pravděpodobně proto lidé reagují i na minimální dávku alergenu. Kromě včel, vos a sršní byla hyaluronidáza nalezena i u vosíka francouzského (*Polistes gallicus*) (Pantera et al., 2003) a čmeláka *Bombus terrestris* (Hoffman et al., 2001). Zkřížená alergická reakce se u lidí občas vyskytuje i mezi jedem vosy a slinami komárů a ovádů (Moffitt, 2003, Freye et al., 1996, Sabbah et al., 1999, Quercía et al., 2008). Jelikož je ve všech těchto typech vzorků možné prokázat hyaluronidázovou aktivitu, je možné, že i za tuto zkříženou reakci alergických osob by mohla být zodpovědná hyaluronidáza.

## 7. Shrnutí

- ♦ V naší studii jsme se zaměřili na hyaluronidázy dvou skupin krevsajících členovců – klíšťat (Ixodidae) a ovádů (Tabanidae). Testované vzorky ze slinných žláz klíšťat druhu *Ixodes ricinus* hyaluronidázovou aktivitu neprokázaly ani na jednom z použitých substrátů.
- ♦ Vzorky slinných žláz z odchycených ovádů (rodů *Tabanus*, *Hybomitra*, *Chrysops* a *Haematopota*) prokázaly na substrátových polyakrylamidových gelech silnou hyaluronidázovou aktivitu, použili jsme je tedy v dalších metodách k detailnější charakterizaci a kvantifikaci těchto enzymů.
- ♦ Hyaluronidázy jsou alespoň mírně aktivní v poměrně širokém rozsahu pH, jejich optimum bylo změřeno na pH 5 s výjimkou druhu *Haematopota pluvialis*, jejíž enzym byl neaktivnější při pH 4. Míra aktivity enzymů je odlišná u různých druhů ovádů – zatímco u většiny menších druhů je nízká, hyaluronidázy velkých druhů jsou aktivní více (zhruba desetkrát, ale i 30krát).
- ♦ Molekulová hmotnost hyaluronidáz jednotlivých druhů se pohybuje v rozpětí od 32 asi do 50 kDa, změnou podmínek pokusu (redukující podmínky) se tento rozsah změnil v průměru jen minimálně (odlišnosti se projevily spíše u konkrétních druhů). V některých případech se také velmi lišily molekulové hmotnosti různých druhů ovádů jednoho rodu.
- ♦ Porovnali jsem také celé proteinové profily slin ovádů, nejvíce se od ostatních liší rod *Chrysops*. V těchto kompletních profilech je hyaluronidáza těžko rozeznatelná od ostatních proteinů, zřejmě proto, že se jedná o minoritní proužek.
- ♦ V testu na citlivost k dodecylsíranu sodnému nebyla znát téměř žádná závislost, tato látka tedy pravděpodobně nemá na hyaluronidázy ovádů téměř žádný vliv. V rámci pokusů byla také nepřímo dokázána částečná termostabilita vzorků (vzorky byly aktivní i po 45 minutách zahřátí na 45 °C).
- ♦ Důkazem přítomnosti hyaluronidázy ve všech zkoumaných druzích ovádů se ukazují možnosti dalšího výzkumu, zejména pak v oblasti přenosu patogenů či jejich roli v alergických reakcích.

## 8. Přehled citované literatury

- ABEBE M., CUPP M.S., RAMBERG F.B., CUPP E.W., 1994. Anticoagulant activity in salivary gland extracts of black flies (Diptera: Simuliidae). *Journal of Medical Entomology* 31, 908–911.
- AHN M.Y., RYU K.S., LEE Y.W., KIM Y.S., 2000. Cytotoxicity and L-amino acid oxidase activity of crude insect drugs. *Archives of Pharmacal Research* 23, 477–481.
- AHN M.Y., HAHN B.S., LEE P.J., WU S.J., KIM Y.S., 2006. Purification and characterisation of anticoagulant protein from the *Tabanus*, *Tabanus bivittatus*. *Archives of Pharmacal Research* 29, 418–423.
- ALARCON-CHAIDEZ F.J., SUN J.X., WIKEL S.K., 2007. Transcriptome analysis of the salivary glands of *Dermacentor andersoni* stiles (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 48–71.
- ARCA B., LOMBARDO F., VALENZUELA J.G., FRANCISCHETTI I.M.B., MARINOTTI O., COLUZZI M., RIBEIRO J.M.C., 2005. An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Anopheles gambiae*. *The Journal of Experimental Biology* 208, 3971–3986.
- ARCA B., LOMBARDO F., FRANCISCHETTI I.M.B., PHAM V.M., MESTRES-SIMON M., 2007. An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 107–127.
- AROCHA-PINANGO C.L., MARCHI R., CARVAJAL Z., GUERRERO B., 1999. Invertebrate compounds acting on the hemostatic mechanism. *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 10, 43–68.
- BANERJI S.N.J., WANG S.X., CLASPER S., SU J., TAMMI R., JONES M., JACKSON D.G., 1999. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *Journal of Cell Biology* 144, 789–801.
- BARBARO K.C., KNYSAK I., MARTINS R., HOGAN C., WINKEL K., 2005. Enzymatic characterisation, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. *Toxicon* 45, 489–499.
- BEATY B.J., MARQUARDT W.C., 1996. *The biology of disease vectors*. University Press of Colorado, p. 632.
- BONO P., RUBIN K., HIGGINS J.M.G., HYNES R.O., 2001. Layilin, a novel integral membrane protein, is a hyaluronan receptor. *Molecular Biology of the Cell* 12, 891–900.

- BOWMAN A.S., DILLWITH J.W., SAUER J.R., 1996. Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. *Parasitology Today* 12, 388–396.
- CALVO E., ANDERSEN J., FRANCISCHETTI I.M., DEL CAPURRO M., DEBIANCHI A.G., JAMES A.A., RIBEIRO J.M.C., MARINOTTI O., 2004. The transcriptome of adult female *Anopheles darlingi* salivary glands. *Insect Molecular Biology* 13, 73–88.
- CALVO E., DAO A., PHAM V.M., RIBEIRO J.M.C., 2007. An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 164–175.
- ČERNÁ P., MIKEŠ L., VOLF P., 2002. Salivary gland hyaluronidase in various species of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *Insect biochemistry and Molecular Biology* 32, 1691–1697.
- CHAMPAGNE D.E., RIBEIRO J.M.C., 1994. Sialokinin I and II: Vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91, 138–142.
- CHARLAB R., VALENZUELA J.G., ROWTON E.D., RIBEIRO J.M.C., 1999. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96, 15155–15160.
- CHMELAR J., ANDERSON J.M., MU J., JOCHIM R.C., VALENZUELA J.G., KOPECKÝ J., 2008. Insight into the sialome of the castor bean tick, *Ixodes ricinus*. *BMC Genomics* 47, 64–9.
- CHVÁLA M., LYNEBORG L., MOUCHA J., 1972. The Horse Flies of Europe (Diptera, Tabanidae). *Entomological Society*, p. 499.
- CHVÁLA M., HŮRKA K., CHALUPSKÝ J., KNOZ J., MINÁŘ J., ORSZÁGH I., 1980. Fauna ČSSR, Svazek 22. Krevsající mouchy a střečci. *Academia, Prague*, p. 540.
- CUPP M.S., RIBEIRO J.M.C., CUPP, E.W., 1994. Vasodilative activity in black fly salivary glands. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50, 241–246.
- DAY A.J., DE LA MOTTE C.A., 2005. Hyaluronan cross-linking: a protective mechanism in inflammation? *Trends in Immunology* 26, 637–643.
- DEANGELIS P.L., 2002. Evolution of glycosaminoglycans and their glycosyltransferases: implications for the extracellular matrices of animals and the capsules of pathogenic bacteria. *The Anatomical Record* 268, 317–326.
- DESQUESNES M., DIA M.L., 2003a. Mechanical transmission of *Trypanosoma congolense* in cattle by the African tabanid *Atylotus agrestis*. *Experimental Parasitology* 105, 226–231.

- DESQUESNES M., DIA M.L., 2003b. *Trypanosoma vivax*: mechanical transmission in cattle by one of the most common African tabanids, *Atylotus agrestis*. *Experimental Parasitology* 103, 35–43.
- FOIL L.D., 1989. Tabanids as vectors of diseases agents. *Parasitology Today* 5, 88–96.
- FRANCISCHETTI I.M.B., VALENZUELA J.G., ANDERSEN J.F., MATHER T.N., RIBEIRO J.M., 2002. Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 99, 3602–3612.
- FRANCISCHETTI I.M.B., PHAM V.M., MANS B.J., ANDERSEN J.F., MATHER T.N., LANE R.S., RIBEIRO J.M.C., 2005. The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 1142–1161.
- FRASER J.R.E., LAURENT T.C., LAURENT U.B.G., 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine* 242, 27–43.
- FREYE H.B., LITWIN C., 1996. Coexistent anaphylaxis to Diptera and Hymenoptera. *Annals of Allergy Asthma and Immunology* 76, 270–272.
- FROST G.I., CSOKA T., STERN R., 1996. The hyaluronidases: A chemical, biological and clinical overview. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 8, 419–434.
- FROST G.I., STERN R., 1997. A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents. *Analytical Biochemistry* 251, 263–269.
- GASPAR A.R.M.D., JOUBERT A.M., CRAUSE J.C., NEITZ A.W.H., 1996. Isolation and characterisation of an anticoagulant from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Experimental and Applied Acarology* 20, 583–98.
- GREVELINK S.A., YOUSSEF D.E., LOSCALZO J., LERNER E.A., 1993. Salivary gland extracts from the deerfly contain a potent inhibitor of platelet aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 90, 9155–9158.
- HAJNICKÁ V., KOCÁKOVÁ P., SLOVÁK M., LABUDA M., FUCHSBERGER N., NUTTALL P.A., 2000. Inhibition of the antiviral action of interferon by tick salivary gland extract. *Parasite Immunology* 22, 201–206.
- HOFFMAN D.R., WOOD C.L. 1984. Allergens in Hymenoptera venom XI. Isolation of protein allergens from *Vespula maculifrons* (yellow jacket) venom. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 74, 93–103.

- HOFFMAN D.R., JACOBSON R.S., ZERBONI R., 1987. Allergens in hymenoptera venom. XIX. Allergy to *Vespa crabro*, the European hornet. *International Archives of Allergy and Immunology* 84, 25–31.
- HOFFMAN D.R., WALSMANN P., RIESENER G., PAINTZ M., MARKWARDT F., 1991. Isolation and characterization of a thrombin inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*. *Pharmazie* 46, 209–212.
- HOFFMAN D.R., EL-CHOUFANI S.E., SMITH M.M., DE GROOT H., 2001. Occupational allergy to bumblebees: Allergens of *Bombus terrestris*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108, 855–60.
- HOLLANDER A.L., WRIGHT R.E., 1980. Impact of tabanids (Diptera: Tabanidae) on cattle: blood meal size and preferred feeding sites. *Journal of Economic Entomology* 73, 431–433.
- HORN D.M., DOS SANTOS P.C., Termignoni C., 2000. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: An antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 384, 68–73.
- HOSTOMSKÁ J., VOLFOVÁ V., MU J., GARFIELD M., ROHOŠOVÁ I., VOLF P., VALENZUELA J.G., JOCHIM R.C., 2009. Analysis of salivary transcripts and antigens of the sand fly *Phlebotomus arabicus*. *BMC Genomics* 10, 282.
- HOVINGH P., LINKER A., 1999. Hyaluronidase activity in leeches (*Hirudinea*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 124, 319–326.
- HOTEZ P., HAGGERTY J., HAWDON J., MILSTONE L., GAMBLE H.R., SCHAD G.A., RICHARDS F.I., 1990. Metalloproteases of infective *Ancylostoma* hookworm larvae and their possible functions in tissue invasion and ecdysis. *Infection and Immunity* 58, 3883–3892.
- HOTEZ P., CAPELLO M., HAWDON J., BECKERS S., SAKANARI J., 1994. Hyaluronidases of the gastrointestinal invasives nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*. Possible functions in the pathogenesis of human zoonoses. *Journal of Infectious Diseases* 170, 918–926.
- HYNES W.L., FERRETTI J.J., 1994. Assays for hyaluronidase activity. *Methods in Enzymology*, 235, 606–616.
- ITANO N., SAWAI T., YOSHIDA M., LENAS P., YAMADA Y., IMAGAWA M., SHINOMURA T., HAMAGUCHI M., YOSHIDA Y., OHNUKI Y., MIYAUCHI S., SPICER A.P., McDONALD J.A., KIMATA K., 1999. Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *Journal of Biological Chemistry* 274, 25085–92.
- IMBERTY A., LORTAT-JACOB H., PÉREZ S., 2007. Structural view of glycosaminoglycan – protein interaction. *Carbohydrate research* 342, 430–439.

- JEDRZEJAS M.J., 2000. Structural and functional comparison of polysaccharide degrading enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35, 221–251.
- JONES L.D., MATTHEWSON M., NUTTALL P.A., 1992. Saliva-activated transmission (SAT) of Thogoto virus: dynamics of SAT factor activity in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum*, and *Boophilus microplus* ticks. *Experimental and Applied Acarology* 13, 241–248.
- KARLSTAM B., LJUNGLOF A., 1991. Purification and partial characterization of a novel hyaluronic acid-degrading enzyme from Antarctic krill (*Euphausia superba*). *Polar Biology* 11, 501–507.
- KAZIMÍROVÁ M., ŠULANOVÁ M., KOZÁNEK M., TAKÁČ P., LABUDA M., NUTTALL P.A., 2001. Identification of anticoagulant activities in salivary gland extracts of four horsefly species (Diptera, Tabanidae). *Haemostasis* 31, 294–305.
- KAZIMÍROVÁ M., ŠULANOVÁ M., TRIMNELL A.R., KOZÁNEK M., VIDLIČKA L., LABUDA M., NUTTALL P.A., 2002. Anticoagulant activities in salivary glands of tabanid flies. *Medical and Veterinary Entomology* 16, 301–309.
- KEMENY D.M., DALTON N., LAWRENCE A.J., PEARCE F.L., VERNON C.A., 1984. The purification and characterisation of hyaluronidase from the venom of the honey bee, *Apis mellifera*. *European Journal of Biochemistry* 139, 217–223.
- KING T.P., LU G., GONZALEZ M., QIAN N.F., SOLDATOVA L., 1996. Yellow jacket venom allergens, hyaluronidase and phospholipase: Sequence similarity and antigenic cross-reactivity with their hornet and wasp homologs and possible implications for clinical allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 98, 588–600.
- KOLARICH D., LEONARD R., HEMMER W., ALTMANN F., 2005. The N-glycans of yellow jacket venom hyaluronidases and the protein sequence of its major isoform in *Vespula vulgaris*. *Febs Journal* 272, 5182–5190.
- KOPECKÝ J., AND KUTHEJLOVÁ M., 1998. Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro. *Parasite Immunology* 20, 169–174.
- KOVÁŘ L., KOPECKÝ J., ŘÍHOVÁ B., 2001. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick polarizes the cytokine profila toward Th2 and supresses proliferation of T-lymphocytes in human PBMC culture. *Journal of Parasitology* 87, 1342–1348.
- KOVÁŘ L., KOPECKÝ J., ŘÍHOVÁ B., 2002. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick modulates the host immune response towards the Th2 cytokine profile. *Parasitology Research* 88, 1066–1072.



- KROČOVÁ Z., MACELA A., HERNYCHOVÁ L., KROČA M., PECHOVÁ J., KOPECKÝ J., 2003. Tick salivary gland extract accelerates proliferation of *Francisella tularensis* in the host. *Journal of Parasitology* 89, 14–20.
- KREIL G., 1995. Hyaluronidases – a group of neglected enzymes. *Protein Science* 4, 1666–1669.
- KRINSKY W.L., 1976. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *Journal of Medical Entomology* 13, 225–275.
- LABUDA M., KOZUCH O., ZUFFOVÁ E., ELECKOVÁ E., HAILS R.S., NUTTALL P.A., 1997. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology* 235, 138–143.
- LERNER E.A., RIBEIRO J.M.C., NELSON R.J., LERNER M.R., 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Journal of Biological Chemistry* 266, 11234–11236.
- LI W., BASHIROVA A.A., MARTIN T.D., VILLAMIDE L., MEHLHOP E., CHERTOV A.O., UNUTMAZ D., POPE M., CARRINGTON M., KEWALRAMANI V.N., 2002. *Rhesus macaque* dendritic cells efficiently transmit lentiviruses independently of DC-SIGN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99, 1568–73.
- LINKER A., MEYER K., HOFFMAN P., 1960. Production of hyaluronate oligosaccharides by leech hyaluronidase and alkali. *Journal of Biological Chemistry* 235, 924–7.
- LU G., KOCHOUMIAN L., KING T.P., 1995. Sequence identity and antigenic cross-reactivity of white face hornet venom allergen, also a hyaluronidase, with other proteins. *Journal of Biological Chemistry* 270, 4457–4465.
- MAHAFFEY C.L., MUMMERT M.E., 2007. Hyaluronan synthesis is required for IL-2-mediated T cell proliferation. *Journal of Immunology* 179, 8191–8199.
- MANS B.J., COETZEE J., LOUW A.I., GASPAR A.R.M., NEITZ A.W.H., 2000. Disaggregation of aggregated platelets by apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Experimental and Applied Acarology* 24, 271–282.
- MARKWARDT F., LEBERECHT E., 1959. Untersuchungen über den blutgerinnungshemmenden Wirkstoff der Tabaniden. *Naturwissenschaften* 46, 17–18.
- MARKWARDT F., SCHULZ E., 1960. Über den Mechanismus der blutgerinnungshemmenden Wirkung des Tabanids. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 238, 320–328.

- MBOW M.L., BLEYENBERG J.A., HALL L.R., TITUS R.G., 1998. *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with *Leishmania major*. *Journal of Immunology* 161, 5571–5577.
- MCKEE C.M., PENNO M.B., COWMAN M., BURDICK M.D., STRIETER R.M., BAO C., NOBLE P.W., 1996. Hyaluronan (HA) fragments induce chemokine gene expression in alveolar macrophages – The role of HA size and CD44. *Journal of Clinical Investigation* 98, 2403–2413.
- MCKEE C.M., LOWENSTEIN C.J., HORTON M.R., WU J., BAO C., CHIN B.Y., CHOI A.M.K., NOBLE P.W., 1997. Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor  $\kappa$ B-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 272, 8013–8018.
- MEYER K., PALMER J.W., 1934. The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry* 107, 629–634.
- MOFFITT J.E., 2003. Allergic reactions to insect stings and bites. *Southern Medical Journal* 96, 1073–1079.
- MOREY S.S., KIRAN K.M., GADAG J.R., 2006. Purification and properties of hyaluronidase from *Palamneus gravimanus* (Indian black scorpion) venom. *Toxicon* 47, 188–195.
- MUMMERT M.E., 2005. Immunologic roles of hyaluronan. *Immunologic Research* 31, 189–205.
- NAKAMURA T., MAJIMA M., KUBO K., TAKAGAKI K., TAMURA S., ENDO M., 1990. Hyaluronidase assay using fluorogenic hyaluronate as a substrate. *Analytical Biochemistry* 191, 21–24.
- NEITZ A.W., HOWELL C.J., POTGIETER D.J., BEZUIDENHOUT J.D., 1978. Proteins and free amino acids in the salivary secretion and haemolymph of the tick *Amblyomma hebraeum*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 45, 235–240.
- NEITZ A.W., VERMEULEN N.M.J., 1987. Biochemical studies on the salivary glands and haemolymph of *Amblyomma hebraeum*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 54, 443–450.
- NG H.C., RANGANATHAN S., CHUA K.L., KHOO H.E., 2005. Cloning and molecular characterisation of the first aquatic hyaluronidase, SFHYA1, from the venom of the stonefish (*Synanceja horrida*). *Gene* 346, 71–81.
- NOBLE P.W., 2002. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biology* 21, 25–29.
- PANTERA B., HOFFMAN D.R., CARRESI L., CAPPUGI G., TURILLAZZI S., MANAO G., SEVERINO M., SPADOLINI J., ORSOMANDO G., MONETI G., PAZZAGLI L., 2003.

Characterization of the major allergens purified from the venom of the paper wasp *Polistes gallicus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1623, 72–81.

- PECHOVÁ J., ŠTĚPÁNOVÁ G., KOVÁŘ L., KOPECKÝ J., 2002. Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes. *Folia Parasitologica* 49, 153–159.
- PESSINI A.C., TAKAO T.T., CAVALHEIRO E.C., VICHNEWSKI W., SAMPAIO S.V., GIGLIO J.R., ARANTES E.C., 2001. A hyaluronidase from *Tityus serrulatus* scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids. *Toxicon* 39, 1495–1504.
- PINDER M., 1988. *Loa loa* – a neglected filaria. *Parasitology today* 4, 279–284.
- PRYDZ K., DALEN K.T., 2000. Synthesis and sorting of proteoglycans. *Journal of Cell Science* 113, 193–205.
- QUERCIA O., EMILIANI F., FOSCHI F., STEFANINI G., 2008. The wasp-horsefly syndrome. *European Annals of Allergy and Clinical Immunobiology* 40, 61–3.
- RAGHOW R., 1994. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound-healing and fibrosis. *Faseb Journal* 8, 823–831.
- RAMANAIAH M., PARTHASARATHY P.R., VENKAIAH B., 1990. Isolation and characterisation of hyaluronidase from scorpion (*Heterometrus fulvipes*) venom. *Biochemistry international* 20, 301–310.
- REDDY V.B., KOUNGA K., MARIANO F., LERNER E.A., 2000. Chrysoptin is a potent glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen receptor antagonist present in salivary gland extracts of the deerfly. *Journal of Biological Chemistry* 275, 15861–15867.
- RHOADS M.L., FETTERER R.H., ROMANOWSKI R.D., 2000. A developmentally regulated hyaluronidase of *Haemonchus contortus*. *Journal of Parasitology* 86, 916–921.
- RHOADS M.L., FETTERER R.H., URBAN J.F., 2001. Release of hyaluronidase during in vitro development of *Ascaris suum* from the third to fourth larval stage. *Parasitology Research* 87, 693–697.
- RIBEIRO J.M.C., MAKOUL G.T., LEVINE J., ROBINSON D.R., SPIELMAN A., 1985. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *Journal of Experimental Medicine* 161, 332–344.
- RIBEIRO J.M.C., 1989. Role of saliva in tick/host interactions. *Experimental and Applied Acarology* 7, 15–20.
- RIBEIRO J.M.C., WEISS, J.J., TELFORD, S.R., 1990. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Experimental Parasitology* 70, 382–388.

- RIBEIRO J.M.C., MARINOTTI O., GONZALES R., 1990. A salivary vasodilator in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *British Journal of Pharmacology* 101, 932–936.
- RIBEIRO J.M.C., ENDRIS T.M., ENDRIS R., 1991. Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100, 109–112.
- RIBEIRO J.M.C., HAZZARD J.M., NUSSENZVEIG R.H., CHAMPAGNE D.E., WALKER F.A., 1993. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science* 260, 539–541.
- RIBEIRO J.M.C., NUSSENZVEIG R.H., TORTORELLA G., 1994. Salivary vasodilators of *Aedes triseriatus* and *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 31, 747–753.
- RIBEIRO J.M.C., CHARLAB R., ROWTON E.D., CUPP E.W., 2000. *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity. *Journal of Medical Entomology* 37, 743–747.
- RIBEIRO J.M.C., FRANCISCHETTI I.M.B., 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology* 48, 73–88.
- RIBEIRO J.M.C., ARCA B., LOMBARDO F., CALVO E., PHAN V.M., CHANDRA P.K., WIKEL S.K., 2007. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. *BMC Genomic* 47, 2164–86.
- RIDGEN D.J., JEDRZEJAS M.J., 2003. Structures of *Streptococcus pneumoniae* hyaluronate lyase in complex with chondroitin and chondroitin sulfate disaccharides. *The Journal Of Biological Chemistry* 278, 50596–50606.
- SABBAH A., HASSOUN S., DROUET M., LAURET M.G., DOUCET M., 1999. Le syndrome guepe/moustique. *Allergie and Immunologie* 31, 175–184.
- SANDERS M.L., SCOTT A.L., GLASS G.E., SCHWARTZ B.S., 1996. Salivary gland changes and host antibody responses associated with feeding of male lone star ticks (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 33, 628–634.
- SARKIS J.J.F., GUIMARAEST J.A., RIBEIRO J.M.C., 1986. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. *Biochemistry Journal* 233, 885–891.
- SHAW M.K., TILNEY L.G., MCKEEVER D.J., 1993. Tick salivary gland extract and interleukin-2 stimulation enhance susceptibility of lymphocytes to infection by *Theileria parva* sporozoites. *Infection and Immunity* 61, 1486–1495.
- SKOV L.K., SEPPALA U., COEN J.J.F., CRICKMORE N., KING T.P., MONSLAVE R., KATRUP J.S., SPANGFORT M.D., GAJHEDE M., 2006. Structure of recombinant

Ves v 2 at 2.0 Å resolution: structural analysis of an allergenic hyaluronidase from wasp venom. *Acta Crystallographica D62*, 595–604.

SPICER A.P., OLSON J.S., McDONALD J.A., 1997. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the third putative mammalian hyaluronan synthase. *Journal of Biological Chemistry* 272, 8957–8961.

STERN R., CSOKA A.B., 2000. Mammalian hyaluronidases. *Glycoforum/Science of Hyaluronan Review Series*,  
<http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA15/HA15E.html>

STERN R., 2004. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *European Journal of Cell Biology* 83, 317–325.

STERN R., JEDRZEJAZ M.J., 2006. Hyaluronidases: Their genomics, structures, and mechanism of action. *Chemical Reviews* 106, 818–839.

STICH R.W., BANTLE J.A., KOCAN K.Y., FEKITE A., 1993. Detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in hemolymph of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with the polymerase chain reaction. *Journal of Medical Entomology* 30, 781–788.

TAKÁČ P., NUNN M. A., MESZAROS J., PECHANOVÁ O., VRBJAR N., VLASÁKOVÁ P., KOZÁNEK M., KAZIMÍROVÁ M., HART G., NUTTALL P.A., LABUDA M., 2006. Vasotab, a vasoactive peptide from horse fly *Hybomitra bimaculata* (Diptera, Tabanidae) salivary glands. *Journal of Experimental Biology* 209, 343–352.

TAYLOR K.R., GALLO R.L., 2006. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *Faseb Journal* 20, 9–22.

TERMEER C., SLEEMAN J.P., SIMON J.C., 2003. Hyaluronan – magic glue for the regulation of the immune response? *Trends in Immunology* 24, 112–114.

TOYODA H., KINOSHITA-TOYODA A., SELLECK S.B., 2000. Structural analysis of glycosaminoglycans in *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans* and demonstration that tout-velu, a *Drosophila* gene related to EXT tumor suppressors, affects heparan sulfate in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 275, 2269–2275.

VALENZUELA J.G., BELKAID Y., ROWTON E., RIBEIRO J.M.C., 2001. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. *Journal of Experimental Biology* 204, 229–237.

VAN DE LOCHT, STUBBS M.T., BODE W., FRIEDRICH, T., BOLLSCHWEILER C., HOFFKEN W., 1996. The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *EMBO Journal* 15, 6011–6017.

- VOLFOVÁ V., HOSTOMSKÁ J., ČERNÝ M., VOTÝPKA J., VOLF P., 2008. Hyaluronidase of bloodsucking insects and its enhancing effect on leishmania infection in mice. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2, e294.
- WAXMAN L., CONNOLLY T.M., 1993. Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of Biological Chemistry* 268, 5445–5449.
- WIKEL S.K., RAMACHANDRA R.N., BERGMAN D.K., 1996. Arthropod modulation of host immune responses. In: WIKEL, S.K. (Ed.), *The immunology of host-ectoparasitic arthropod relationships*. CAB International, 107–130.
- XU X., SONG Y., WANG Y., LU Y., YANG L., LAI R., 2008. Toward an understanding of the molecular mechanism for successfully blood-feeding by coupling proteomics analysis with pharmacological testing of horse fly salivary glands. *Molecular and Cellular Proteomics* 7, 582–590.
- YANG T., WITHAM T.F., VILLA L., ERFF M., ATTANUCCI J., WATKINS S., KONDZIOLKA D., OKADA H., POLLACK I.F., CHAMBERS W.H., 2002. Glioma-associated hyaluronan induces apoptosis in dendritic cells via inducible nitric oxide synthase. *Cancer Research* 62, 2583–2591.
- YOUNG A.R., PINCUS S.J., 2001. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. *Toxicon* 39, 391–400.
- ZEIDNER N.S., HIGGS S., HAPP O.M., BEATY B.J., MILLER B.R., 1999. Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. *Parasite Immunology* 21, 35–44.
- ZHU K.C., BOWMAN A.S., BRIGHAM D.L., ESSENBERG R.C., DILLWITH J.W., SAUER J.R., 1997. Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). *Experimental Parasitology* 87, 30–38.