

Biologická fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích



**Izolace genu pro antimikrobiální peptid (defensin)
z tvrdého klíštěte *Ixodes ricinus* po infekci spirochétami
druhového komplexu *Borrelia burgdorferi*.**

Bakalářská diplomová práce

Veronika Skladaná

2007

Vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD.

Maryna Golovchenko, MSc.

Fakultní garant: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

Skladaná V., 2007: Izolace genu pro antimikrobiální peptid (defensin) z klíštěte *Ixodes ricinus* po infekci spirochétami druhového komplexu *Borrelia burgdorferi*. [Isolation of the antimicrobial peptide gene (defensin) from the hard tick *Ixodes ricinus*, challenged by the pathogen infection] – 46 p., Faculty of Biological Science, University of the South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Antimicrobial peptides are major components of the innate immune response of epithelial cells. In hematophagous organisms, which acts as vectors of parasitic diseases, in particular Lyme borreliosis, the gut pathogen induce the expression of defensin, that provide the first barrier of host defence. This raises the possibility that defensin may play a key role in the development of parasitic infection. The gene expressed in midgut was isolated from cDNA of the hard tick, *Ixodes ricinus*. The gene is coding the protein, that is produced and secreted during tick infection, and is known as defensin. Expression of the gene for defensin (224 bp) was induced by the pathogen. The gene was cloned into bacterial expression system.

Bakalářská diplomová práce byla financována z grantu VZ BF 30-801C (L.G.); grant výzkumného centra MSMT LC-06009 a grant GACR 524/1407.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, Biologickou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Veronika Skladaná

V Českých Budějovicích, 9.5.2007

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména Maryně Golovchenko, PhD., Natalii Rudenko, PhD. a prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc. za možnost pracovat v Laboratoři molekulární biologie vektorů a patogenů, za odborné vedení, cenné připomínky a podporu při vypracování této práce. Děkuji všem členům laboratoře za příjemnou atmosféru. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům za umožnění studia, podporu a velkou trpělivost.

Obsah

1. ÚVOD	6
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	7
2.1. Klíšťata	7
2.2 Přenašeč <i>Ixodes ricinus</i>	7
2.2.1. Výskyt.....	7
2.2.2. Vývoj klíšťete, spektrum hostitelů a jejich vyhledání.....	7
2.2.3. Příjem potravy.....	8
2.3. Patogeny přenášené klíšťaty	8
2.3.1. <i>Borrelia burgdorferi</i> a lymeská borelióza.....	9
2.3.2. Genom a antigeny borelií a změna antigenů během sání klíšťete.....	10
2.4. Imunita klíšťat	10
2.5. Velká skupina defensin, jejich charakteristika, rozšíření u některých členovců, zvláště klíšťat, a intron/exonová organizace	12
2.5.1. Charakteristika defensinu.....	12
2.5.2. Defensiny identifikované u několika druhů klíšťat.....	13
2.5.2.1. Defensin objevený u tvrdého klíšťete <i>Dermacentor variabilis</i>	13
2.5.2.2. Defensin objevený u tvrdého klíšťete <i>Ixodes scapularis</i>	14
2.5.2.3. Defensin objevený u tvrdého klíšťete <i>Amblyomma hebraeum</i>	14
2.5.2.4. Defensiny objevené u tvrdého klíšťete <i>Boophilus microplus</i>	14
2.5.2.5. Defensiny objevené u měkkého klíšťete <i>Ornithodors moubata</i>	15
2.5.2.6. Defensiny objevené u tvrdého klíšťete <i>Ixodes ricinus</i>	15
2.5.3. Genomová organizace a intron/exonová struktura defensinu.....	16
2.5.4. Další antimikrobiální peptidy u některých druhů klíšťat.....	17
3. CÍLE PRÁCE	18
4. MATERIÁL A METODY	19
4.1. Materiál.....	19
4.2. Metody.....	20
4.2.1. Izolace RNA.....	20
4.2.2. Dvoukroková RT-PCR – Two step RT-PCR (syntéza cDNA).....	21
4.2.3. PCR (polymerázová řetězová reakce).....	22
4.2.4. Purifikace PCR produktu	25

4.2.5. Ligace PCR produktu do vektoru pCR [®] 4-TOPO.....	25
4.2.6. Transformace One Shot [®] TOP10 <i>E. coli</i> (Chemically Competent, Invitrogen).....	25
4.2.7. Izolace plazmidové DNA.....	26
4.2.8. Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu.....	27
4.2.8.1. PCR.....	27
4.2.8.2. Restrikční analýza.....	27
4.2.8.3. Sekvenční reakce.....	28
4.2.9. Analýza DNA sekvencí.....	29
4.2.10. Příprava rekombinantního konstruktu v expresním vektoru Champion [™] pET100/D-TOPO [®]	29
4.2.11. Transformace expresních buněk <i>E.coli</i> BL21 Star [™] (DE3) One Shot [®] Cells.....	31
4.2.12. Pilotní exprese.....	31
4.2.13. SDS-PAGE – kontrola exprese rekombinantního proteinu.....	31
5. VÝSLEDKY	33
5.1. Izolace RNA a syntéza cDNA.....	33
5.2. PCR, purifikace, klonování, transformace a sekvenování.....	34
5.3. Charakteristika izolovaného defensinu.....	35
5.4. Konstrukce expresního plazmidu a exprese rekombinantního proteinu.....	36
6. DISKUZE	39
7. ZÁVĚR	41
8. SEZNAM LITERATURY	42

1. Úvod

Denně jsme vystaveni desítkám tisíc potencionálním patogenům, během příjmu potravy, kontaktu s infikovanými povrchy (živými i neživými) a inhalace (Janeway C.A.Jr., 1988). Účinnou ochranu před nimi poskytuje imunitní systém, obzvláště důležitá je jedna složka imunity, fylogeneticky velmi stará a nacházející se u rostlin i živočichů, vrozená imunitní odpověď (Lai *et al.*, 2004). Mezi efekторы vrozené imunitní odpovědi jsou tradičně zahrnovány fagocyty, jako neutrofilů a makrofágy, různé leukocyty, včetně žírných buněk a sérových proteinů, takových jako komplement. Mezi efekторы imunitního systému patří také antimikrobiální peptidy (AMP).

Antimikrobiální peptidy představují starý mechanismus obrany hostitele, jsou velmi konzervované a nachází se u všech živých druhů. Většina antimikrobiálních peptidů je kationická. Mezi těmito přirozeně se vyskytujícími antibiotickými peptidy tvoří defensiny unikátní skupinu (Hancock a Diamond, 2000).

Peptidy mají různé účinky, ale jejich aktivity mohou být zvýšeny ve spolupráci s dalšími faktory. Kationické AMP vykazují součinnost s rozmanitou řadou konvenčních bakteriostatik, což vede k myšlence, že jsou tu přítomny další molekuly, obzvláště v místě zánětu, které synergicky pracují s kationickými peptidy (Nagaoka *et al.*, 2000).

Defensiny jsou syntetizované jako prekurzorové molekuly, které zahrnují signální sekvenci následovanou propeptidem, který je dále zpracován na zralý peptid. Bylo zjištěno, že tkáň exprese a inducibility antimikrobiálních peptidů odráží jejich genovou strukturu (Bevins *et al.*, 1996; Tsutsumi-Ishii *et al.*, 2000).

Funkční studie podpořily fakta o roli antimikrobiálních peptidů v obraně hostitele, i když tyto experimenty jsou komplikovány četnými geny defensinu často exprimovanými ve stejné tkáni, stejně jako redundantními obrannými mechanismy ve vrozeném imunitním systému.

Rozsáhlé studie na zvířecích modelech a klinické pokusy dokazují, že exogenně přidané peptidy chrání hostitele před lokální a systémovou infekcí bakteriemi nebo houbami. Exprese defensinu v buněčných kulturách také zajišťuje, že tyto kultury mají zvýšenou rezistenci vůči bakteriálním a virovým infekcím. U rostlin upregulace genové exprese antimikrobiálních peptidů také zvyšuje jejich rezistenci k patogenům. Tyto výsledky poskytují přesvědčivý důkaz o významu kationických antimikrobiálních peptidů v obraně hostitele proti infekcím (Hancock a Diamond, 2000). Ačkoli víme hodně o antimikrobiálních peptidech u hmyzu, detailní informace u dalších skupin členovců, například klíšťat, chybí.

2. Literární přehled

2.1. Klíšťata

Klíšťata patří do kmene *Arthropoda* (členovci), podkmene *Chelicerata* (klepítkatci), třídy *Arachnida* (pavoukovi) a řádu *Acarina* (roztoci). Na světě se vyskytuje kolem 1000 různých druhů.

Jsou to celosvětově rozšíření ektoparazité, kteří se živí krví obratlovců. Přenášejí řadu patogenů, jež vyvolávají vážná onemocnění lidí i zvířat. K neznámějším patří lymeská borelióza, bakteriální onemocnění způsobené spirochétami komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Dále mohou přenášet klíšťovou encefalitidu a tularémii. Jsou také zapojena do přenosu ehrlichiozy a babesiozy (Papáček *et al.*, 2000; Gudderra *et al.*, 2001).

Rozlišujeme dvě velké skupiny klíšťat:

1. *Argasidae*, tzv. měkká klíšťata (klíšťáci)
2. *Ixodidae*, tzv. tvrdá klíšťata (klíšťata)

Jako přenašeči virových, bakteriálních a parazitických onemocnění působí především *I. ricinus* v Evropě, *I. scapularis* a *I. pacificus* v Severní Americe a *I. persulcatus* v Asii (Steere, 2006).

2.2. Přenašeč *Ixodes ricinus* (klíšťe obecné)

2.2.1. Výskyt

Klíšťe obecné se vyskytuje po celé západní, střední a jižní Evropě. Na našem území je nejhojnějším druhem. Vyskytuje se především v listnatých a smíšených lesích, vlhčích loukách, pastvinách a v křovinách. Zvláště hojně se klíšťata nacházejí díky vyšší vlhkosti vzduchu v okolí řek. Mohou se vyskytovat až do 2000 m.n.m. (Rosický *et al.*, 1979; Dřevová, 2000). V přírodě se objevují již velmi brzy na jaře a první, většinou hlavní vrchol četnosti výskytu klíšťat nastává koncem jara. V létě množství klíšťat většinou klesá, ukřívají se a jsou méně aktivní. Další o něco nižší vrchol nastává počátkem podzimu.

2.2.2. Vývoj klíšťete, spektrum hostitelů a jejich vyhledání

Klíšťe obecné patří mezi typická trojhostitelská klíšťata. V každém vývojovém období saje klíšťe jen jednou.

K páření dochází mezi dospělci na podzim, buď přímo na hostiteli nebo mimo něj, a samci krátce po páření hynou. Samice pak může v závislosti na své váze klást na jaře až 5000

vajíček, poté umírá. Z vajíček se líhnou drobné šestinohé larvy (0.8mm), které sají na menších savcích, ptácích a zejména hlodavcích. Po nasátí prodělají metamorfózu na osminohé nymfy (1.1mm). Nymfy si opět vyhledají vhodného hostitele, jsou to zejména větší obratlovci (zajáci, králíci, veverky, bažanti atd.), po nasátí prochází metamorfózou v dospělého jedince – imago. Dospělci jsou již pohlavně dimorfní. Samečci jsou menší než samičky a potravu sají jen krátce. Samičky cizopasí především na větších obratlovcích – srnci, jeleni, kozy, psi atd. Larvy sají 2–6 dní, nymfy 2–7 dní a samice 5–14 dní (Rosický *et al.*, 1979; Dřevová, 2000; Schafer *et al.*, 1999; Steere *et al.*, 2004; Ryšavý *et al.*, 1989).

Celý cyklus trvá v našich podmínkách zhruba 3 roky, výjimečně za nepříznivých podmínek i 5 – 6 let (hlavně v oblastech s nedostatkem potravy) (Dřevová; 2000).

Klíšťata vyhledávají hostitele pomocí smyslových buněk Hallerova orgánu nacházejícího se na koncích předních končetin, který jim umožňuje zachytit mechanické, tepelné a chemické podněty (Kimming *et al.*, 2003).

2.2.3. Příjem potravy

Na začátku a v průběhu sání produkuje klíště cement sloužící k ukotvení v kůži hostitele, a sliny, jež obsahují směs látek tlumících bolest, zabraňujících srážení krve a dráždících okolní tkáň. Se slinami se však mohou do těla hostitele dostat i různé druhy patogenních organismů, které způsobují řadu onemocnění (Lai *et al.*, 2004; Kimming *et al.*, 2003; Ryšavý *et al.*, 1989).

2.3 Patogeny přenášené klíšťaty

Klíšťata jsou vektory celé řady patogenů.

Viry přenášené klíšťaty se řadí do čeledi *Flaviviridae*, patří sem viry způsobující klíšťovou encefalitidu, ruskou jaroletní encefalitidu, pawassanskou encefalitidu, skotskou klíšťovou encefalitidu a omskou hemoragickou horečku. Dále viry z čeledi *Bunyviridae*, které způsobují krymsko-konžskou hemoragickou horečku. Viry z čeledi *Reoviridae* vyvolávají kolorádkou klíšťovou encefalitidu, a čeleď virů *Iridoviridae* způsobující africkou prasečí horečku.

Klíšťata mohou přenášet i celou řadu bakterií. Bakterie přenášené klíšťaty z čeledi *Rickettsiaceae* způsobují horečku Skalických hor (*R. rickettsii*), japonskou encefalitidu (*R. japonica*), klíšťovou horečku sibiřskou (*R. sibirica*), jihoafrickou horečku (*R. africae*), queenslandský klíšťecí tyfus (*R. australis*), maltskou horečku (*R. ciborii*), Q horečku (*C. burnetii*), lidskou granulocytární a monocytární ehrlichiozu (*E. chaffeensis*).

Dále mohou klíšťata přenášet bakterie způsobující tularémii (*Francisella tularensis*) a v neposlední řadě také bakterie z čeledi *Spirochaetaceae*, které mohou způsobovat jednak lymeskou boreliózu, tu vyvolávají bakterie z druhového komplexu *B. burgdorferi* sensu lato (*B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. spielmani*), a návratnou horečku (způsobena *B. hermsii*, *B. recurrentis*, *B. duttoni*).

Mezi parazitární nákazy přenášené klíšťaty patří babesióza (*Babesia microti*, *B. divergens*, *B. bovis*) a teilerióza (*Theileria parva*) (Kimmig *et al.*, 2003; Bednář *et al.*, 1996).

2.3.1. *Borrelia burgdorferi* a lymeská borelióza

V České republice je nejčastějším onemocněním přenášeným klíšťaty *I. ricinus* – lymeská borelióza. Klinické příznaky lymeské boreliózy lze rozdělit na 3 stádia. Na začátku infekce časné lokalizované stádium, důležitým příznakem tohoto stádia je erythema chronicum migrans, mapovité zarudnutí na kůži se zvětšenými uzlinami. Ve druhém diseminovaném stádiu dochází k šíření borelií krevní cestou, příznaky jsou patrné na kůži, v CNS, kardiální příznaky, postiženy mohou být i klouby. Poté následuje pozdní stádium, kde může dojít k postižení kůže, kloubů a nervového systému (Bednář *et al.*, 1996).

Bakterie způsobující toto onemocnění byla objevena v roce 1982 (Burgdorfer, Barbour, Benach a další) v klíštěti *I. dammini* (dnes *I. scapularis*). Později byla označena jako *Borrelia burgdorferi* (Steere *et al.*, 2004).

Rod *Borrelia* spolu s rody *Treponema* a *Leptospira* patří do čeledi *Spirochaetacea*, řád *Spirochetales* (Bednář *et al.*, 1996; Madigan *et al.*, 2003).

B. burgdorferi jsou gramnegativní, mikroaerofilní, pohyblivé spirochéty, které se množí příčným dělením a žijí extracelulárně. Jejich délka se pohybuje mezi 4-30 µm a na šířku mají 0.2-0.5 µm. Buňky spirochét jsou tvořeny protoplazmatickým cylindrem, který je obklopen cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou. Ta je složená ze tří vrstev, vnitřní peptidoglykanové, střední lipopolysacharidové a vnější lipoproteinové. Mezi buněčnou stěnou a cytoplazmatickou membránou se nachází periplazmatický prostor, v němž jsou na obou koncích buňky ukotveny bičíky (endoflagely), jejichž počet kolísá mezi 7 a 20 (Bartůněk *et al.*, 2001; Roháčová, 2005; Madigan *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 1999).

Doposud bylo popsáno 13 druhů (genospecies) v rámci druhového komplexu *B. burgdorferi* sensu lato. Liší se rozdílnou genomovou sekvencí a různým antigenním profilem, odlišným zastoupením strukturálních složek a jejich různou funkční aktivitou. Dále se tyto druhy liší svým geografickým rozšířením a jsou také spojeny s různými vektory a hostiteli. Těmito druhy jsou: *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B.*

lusitaniae, *B. bissetii*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. sinica*, *B. turdi*, *B. andersonii*, *B. spielmani* a *B. californiensis* (Steere, 2006; Postic *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1999).

2.3.2. Genom a antigeny borelií a změna antigenů během sání klíštěte

V roce 1997 byl publikován kompletní genom *B. burgdorferi* kmene B31 (Fraser *et al.*, 1997). Genom je poměrně malý (1.5 Mb) a obsahuje lineární chromozom, který má 853 genů kódujících proteiny zahrnuté v DNA replikaci, transkripci, translaci, transportu látek, pohybu a energetickém metabolismu, ale neobsahuje geny pro biosyntézu aminokyselin, mastných kyselin, enzymových kofaktorů a nukleotidů, proto jsou borelie závislé na hostiteli vzhledem k jejich nutričním požadavkům (Purse a Norris, 2000; Fraser *et al.*, 1997; Steere *et al.*, 2004).

Kromě toho genom zahrnuje také 9 cirkulárních a 12 lineárních plazmidů tvořících 40% bakteriální DNA. Některé z nich jsou nepostradatelné a mohou být považovány za mini-chromozomy (Fraser *et al.*, 1997; Steere *et al.*, 2004). Geny kódované na plazmidech většinou souvisejí s virulencí a infektivitou, biologická úloha však u většiny z nich není známá (Hinnebusch a Barbour, 1992; Xu a Johnson, 1995). Plazmidy kódují řadu proteinů, které hrají roli v interakci s přenašečem i hostitelem *B. burgdorferi* a v patogenezi lymeské nemoci. Mezi takové proteiny patří lipoproteiny vnější povrchové membrány, jejichž geny jsou lokalizované na lineárních plazmidech (Hinnebusch a Barbour, 1992; Kraiczy *et al.*, 1999).

Vnější povrchové proteiny Osp (outer surface proteins) buněčné stěny jsou zodpovědné za hostitelskou imunitní odpověď. Povrchové proteiny OspA - OspF a další se u jednotlivých kmenů borelií liší co do velikostí a antigenní reaktivity (Wang *et al.*, 1999; Schwan a Piesman, 2000). Ve střevě nenasátých klíšťat exprimují borelie na svém povrchu zejména OspA (zprostředkovává adhezi bakterií k epitelu střeva) a OspB, ale ne OspC.

Jakmile klíště saje na savčím hostiteli, stoupá jeho teplota až na 37°C, krev se dostává do střeva a poskytuje prostředí nedefinovaných signálů a živin. Přestává se tvořit OspA i OspB a začíná syntéza OspC, borelie se množí v přenašeči, migrují přes střevní stěnu do hemolymfy a odtud přestupují do různých tkání, včetně slinných žláz, kde se váží na protein Salp15 a jsou se slinami přeneseny do hostitele. K přenosu borelií nedochází okamžitě. Pravděpodobnost infekce tedy stoupá s délkou sání (Schwan a Piesman, 2000; Schwan *et al.*, 1995; de Silva a Fikrig, 1996).

2.4. Imunita klíšťat

Během sání jsou střeva vystavena různým patogenním i nepatogenním mikrobům a také nutričním složkám z krve. Jak některé patogeny přežívají ve střevě a vnitřních tkáních klíšťat,

zatímco jiné jsou zničeny, je otázka, kterou se zabývají vědci mnoho let (Sonenshine *et al.*, 2005).

Na rozdíl od hematofágního hmyzu je mnohem méně známo o schopnosti klíšťat rozpoznat a zničit invadující mikroorganismy. Klíšťata musí chránit sami sebe před infekcí bez protilátek a lymfocytů normálně zahrnutých v získané imunitě obratlovců. Vrozená imunitní odpověď je jediná cesta, kterou klíšťata mohou bojovat s mikroorganismy, a je složená z buněčných a humorálních odpovědí (Nakajima *et al.*, 2002). Buněčná obrana je namířena proti cizorodým částicím a patogenům, které se dostanou do hemocoelu. Malé částice nebo bakterie jsou fagocytovány, ale větší jsou obaleny několika hemocyty současně (nodulace).

Složkami humorální imunity jsou antimikrobiální peptidy jako lysozym nebo defensiny, které se vážou převážně na grampozitivní bakterie. Za další obranné mechanismy klíšťat lze považovat rovněž inhibitory proteáz, které blokují proteolytickou aktivaci patogenů při jejich přenosu (Paskenwitz a Christensen, 1996; Gudderra *et al.*, 2002).

Na obraně proti cizorodým částicím a patogenům se stejně jako u dalších členovců podílí hemolymfa. Hemolymfa je tvořena hemocyty a plazmou.

Hemocyty jsou schopné fagocytózy, nodulace a sekretují faktory, které jsou schopné rozpoznávat vlastní a cizí částice. U klíšťat *I. ricinus* jsou tři základní typy hemocytů, plazmocyty a granulocyty I. a II. typu. Plazmocyty se od granulocytů liší tím, že mají v cytoplazmě pouze malá granula. V granulách byla prokázána přítomnost lysozomálních enzymů (Paskenwitz a Christensen, 1996). Plazma obsahuje látky, které napomáhají rozpoznání a inaktivaci cizích částic.

Střevo klíšťat bylo dlouho pokládáno za vhodné prostředí pro přežití přijatých mikroorganismů kvůli domnělé nepřítomnosti intraluminálních proteolytických enzymů. Trávení u klíšťat je téměř výhradně intracelulární. Ale i u nich byly nalezeny antimikrobiální peptidy (Sonenshine *et al.*, 2005). Nedávné studie odhalily, že některé antimikrobiální peptidy jsou zahrnuté ve střevní obraně proti invazivním mikrobům alespoň u některých hematofágních členovců. Například defensiny byly pozorované ve střevě bodavé mouchy *Stomoxys calcitrans* (Munks *et al.*, 2001), malarického komára *Anopheles gambiae* (Richman *et al.*, 1996), mouchy tse-tse *Glossinia morsitans* (Boulanger *et al.*, 2002), *Ornithodoros moubata* (Nakajima *et al.*, 2001) a *Ixodes ricinus* (Rudenko *et al.*, 2005). Střevo je nekryté před útokem mikroorganismů přijatých krví. Proto je pro hematofágní členovce účinné, že jsou vybaveni imunitním faktorem v této oblasti, který jim zajišťuje ochranu střevního epitelu a umožňuje rozlišit patogenní mikroby od komenzálních a symbiotických. Střevní imunita tak hraje důležitou roli v kontrole parazitických infekcí. Například u klíštěte *O. moubata* jsou

do střevní obrany zapojeny 4 antimikrobiální peptidy (defensiny) (Nakajima *et al.*, 2001, 2002, 2003; Boulanger *et al.*, 2004).

2.5. Velká skupina defensinů, jejich charakteristika, rozšíření u některých členovců, zvláště klíšťat, a intron/exonová organizace

2.5.1. Charakteristika defensinu

Efektory imunitního systému jsou antimikrobiální peptidy (AMP). Znalost vrozené imunitní odpovědi klíšťat, obzvláště defensinu a dalších AMPs, je důležitá pro pochopení, jak mikroby v klíšťatech přežívají. Defensiny členovců jsou obvykle malé peptidy, přibližně 4 kDa velké a dlouhé 36-46 aminokyselin, s výjimkou defensinu včel a čmeláků, jejichž délka je 51 aminokyselin. Defensiny jsou charakteristické primární strukturou, která se skládá z 6 konzervovaných cysteinových (Cys) zbytků (Bulet *et al.*, 2004) tvořících 3 intramolekulární disulfidové páry. Páry mezi cysteiny jsou: Cys1-Cys4, Cys2-Cys5 a Cys3-Cys6. Defensiny ze škeble *Mytilus galloprovincialis* mají 4 disulfidové můstky (Varkey *et al.*, 2006). Tyto peptidy jsou nejznámější pro svou antimikrobiální aktivitu proti grampozitivním bakteriím, ale některé z nich také inhibují gramnegativní bakterie, houby (Gillespie *et al.*, 1997) a parazitické prvoky, například ookiny *Plasmodia* (Richman *et al.*, 1997). Antibakteriální aktivita defensinů je zpravidla připisována jejich účinkům na mikrobiální membrány, i když skutečný antibakteriální mechanismus není jasný. Defensiny (s kladným nábojem) reagují s negativně nabitými složkami mikrobiálních membrán, které obsahují lipopolysacharid u gramnegativních bakterií, polysacharid u grampozitivních bakterií a fosfolipidy (Lai *et al.*, 2004). Působením defensinů dochází k tvorbě kanálů v bakteriální membráně, což usnadňuje průnik lysozymu do buňky a následnou destrukci patogena.

Defensiny u hmyzu byly poprvé izolované z kultivovaných buněk masařky *Sarcophaga peregrina* (Matsuyama a Natori, 1988).

U hmyzu jsou defensiny přítomny u endopterygot (Diptera, Coleoptera, Hymenoptera a Trichoptera) a exopterygot (Hemiptera a Odonata) (Froy a Gurevitz, 2003). Kromě toho defensiny, které vykazují vysoké procento podobnosti v aminokyselinových sekvencích s defensinem vážky, byly popsány u dvou relativně starých členovců, škorpiónů *Leirus quinquestriatus* (Cociancich *et al.*, 1993) a *Androctonus australis* (Ehret-Sabatier, 1996). Tato zjištění spolu s přítomností defensinu u měkkýšů, *Mytilus edulis* (Charles *et al.*, 1996) a *M.*

galloprovincialis (Hubert *et al.*, 1996) ukazují, že defensiny jsou konzervované napříč širokou fylogenetickou oblastí.

2.5.2. Defensiny identifikované u několika druhů klíšťat

2.5.2.1. Defensin objevený u tvrdého klíštěte *Dermacentor variabilis*

Kationický defensin (**varisin**) byl identifikován v plasmě a hemocytech tvrdého klíštěte *Dermacentor variabilis* (Johns *et al.*, 2001; Ceraul *et al.*, 2003). Varisin má kladný náboj, molekulovou hmotnost 4229 Da, 225 nt ORF, který je translatován na 74 aminokyselinový preprodefensin. Sekvence varisinu je podobná členům skupiny defensinu u hmyzu. Kromě antimikrobiální aktivity proti grampozitivním bakteriím, je varisin aktivní také proti *B. burgdorferi*, obzvláště v kombinaci s lysozymem (Sonenshine *et al.*, 2002). Klíšťata *D. variabilis* vytváří velmi rychlou odpověď po napadení boreliemi (i jinými patogeny), skupina defensinu je v hemolymfě přítomná již po 15 minutách od začátku infekce a současně dochází k zvýšení exprese lysozymu. Lysozym sám o sobě není schopen ničit borelie, ale ve spojení s defensinem zabíjí většinu z nich během 1 hodiny, kdy spirochéty podléhají v hemolymfě rychlým lyzím. Johns *et al.* (2001) na základě těchto poznatků vytvořili hypotézu, že schopnost hemolymfy *D. variabilis* inhibovat borelie může být právě díky spojení účinků těchto dvou peptidů. I přesto, že jsou borelie velmi rychle ničeny v hemolymfě, zůstávají až 3 hodiny neporušené v lumen střeva, což není překvapivé vzhledem k jasné nepřítomnosti varisinu a lysozymu v této tkáni *D. variabilis* (Johns *et al.*, 2001; Sonenshine *et al.*, 2005). Další tkáň zodpovědná za produkci a uskladnění defensinů je tělní tuk.

Za zmínku stojí, že možnou existencí více než 1 isoformy defensinu u klíštěte *D. variabilis* se zabýval Ceraul (Ceraul *et al.*, 2003). Objevili jednu isoformu defensinu v hemocytech *D. variabilis*, která byla identická s dříve purifikovaným defensinem z plazmy u tohoto druhu (Johns *et al.*, 2001), s výjimkou jedné aminokyseliny v pozici 27. Čímž naznačili možnost, že v této pozici mohou být přítomny 2 různé aminokyseliny – glutamin nebo glycin. Ačkoli v získané aminokyselinové sekvenci převládal glutamin, jejich hypotéza o existenci dvou možných isoform defensinu u *D. variabilis* nebyla nikdy potvrzena, protože byl izolován pouze gen kódující peptid s glycinem v pozici 27.

2.5.2.2. Defensin u tvrdého klíštěte *Ixodes scapularis*

Ixodes scapularis je významný vektor patogenů, včetně *B. burgdorferi*. Znalost vrozené imunitní odpovědi, zvláště defensinu a jiných antimikrobiálních peptidů, je důležitá pro pochopení, jak mikroby přežívají v tomto druhu klíšťat.

Stejně jako u *D. variabilis* byla i u klíštěte *I. scapularis* objevena jediná isoforma defensinu, nazvaná **scapularisin** (Hynes *et al.*, 2005). Tkáně, kde je scapularisin syntetizován, nebyly určeny, ale transkript pro defensinový gen *slnA* byl amplifikován z mRNA izolované ze střeva, hemocytů a tělního tuku. Sekvence odpovídající antimikrobiálnímu defensinu byla objevena ve slinných žlázách *I. scapularis* (Valenzuela *et al.*, 2002).

Preprodefensin má 74 aminokyselin, 225 bp ORF, zralý peptid má 38 aminokyselin (Hynes *et al.*, 2005).

Zatím nebyl objeven defensin v hemolymfě tohoto druhu klíšťat, důvod je v současné době neznámý. Hemolymfa *I. scapularis* po napadení *B. burgdorferi* nebyla schopna inhibovat bakterie, což naznačuje, že nedostatek bakteriolýz umožňuje spirochétám přežít v hemolymfě *I. scapularis* dostatečně dlouho, aby byly schopné napadnout slinné žlázy a další tkáně. Je možné, že *I. scapularis* buď nemá signál, který vede k uvolnění defensinu, nebo tento signál není aktivován. Neschopnost *I. scapularis* objevit *B. burgdorferi* by také mohla být následkem nepřítomnosti defensinu v hemolymfě. Rozdíly v syntéze defensinu u dvou odlišných druhů klíšťat *D. variabilis* a *I. scapularis* možná pomohou objasnit, proč jen *I. scapularis* z těchto dvou je vektorově kompetentní (Hynes *et al.*, 2005).

2.5.2.3. Defensiny objevené u tvrdého klíštěte *Amblyomma hebraeum*

Dva nekationické peptidy defensiny s antimikrobiální aktivitou proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím byly identifikovány z hemolymfy samic tvrdého klíštěte *Amblyomma hebraeum* Koch (Lai *et al.*, 2004). Preproteiny mají 92 aminokyselinových zbytků. Tvorba obou peptidů se zvyšuje během sání klíštěte a jejich koncentrace je zvyšována i po ukončení vlastního sacího období (Lai *et al.*, 2004).

2.5.2.4. Defensiny objevené u tvrdého klíštěte *Boophilus microplus*

Dva na cystein bohaté antimikrobiální peptidy, jeden nový 10.2 kDa polypeptid, druhý 4.29 kDa peptid, byly identifikované v *Boophilus microplus* (Canestrini). Ačkoli obě molekuly obsahovaly 6 cysteinových zbytků, jen menší byla charakteristická pro skupinu defensin u hmyzu (Fogaca *et al.*, 2004).

2.5.2.5. Defensiny objevené u měkkého klíštěte *Ornithodoros moubata*

Defensiny byly identifikovány v měkkém klíštěti *Ornithodoros moubata* (sensu Walton), kde byly charakterizované **4 různé isoformy** z různých tkání (Nakajima *et al.*, 2001, 2002) – **A, B, C a D**. Všechny jsou kódované jako preprodefensiny. Zralý peptid všech 4 isoform je z více než 78% stejný. Obzvláště zralé peptidy defensinu A, B a C jsou si podobné (více než 89%).

Všechny isoformy jsou exprimované ve střevě, tělním tuku a reprodukčním traktu. Genová exprese defensinu A, B a C je v tělním tuku slabá ve srovnání se střevem. Naproti tomu genová exprese defensinu D je silnější v tělním tuku, než ve střevě. Zdá se, že lze tyto 4 isoformy rozdělit do dvou typů: první typ vykazuje primární expresi ve střevě (A, B a C) a druhý je primárně exprimován v tělním tuku (D). Tyto typy defensinu *O. moubata* jsou v různých stupních zahrnuty do imunity hemolymfy a střeva (Nakajima *et al.*, 2002).

2.5.2.6. Defensiny objevené u tvrdého klíštěte *Ixodes ricinus*

Byly izolovány dva geny pro defensin z cDNA knihovny nasátých a infikovaných klíšťat *I. ricinus*. Jejich nukleotidové sekvence byly z 93% stejné. Kódují dva preprodefensiny charakterizované 95% shodností a 98% podobností sobě navzájem, se třemi aminokyselinovými substitucemi. Totožnost obou isoform defensinu na zralých oblastech byla 97%. Velikost ORF byla 225 bp. Defensinový gen kóduje 74 aminokyselinových zbytků prepropeptidu a zahrnuje signální peptid 22 zbytků a propeptid 15 aminokyselin, následovaný zralým peptidem 37 zbytků. U tohoto druhu klíšťat byla odhalena přítomnost **2 isoform defensinu, Def1 a Def2**, v poměru 4:1. Def1 (s molekulovou hmotností 8231 Da a pI 9.18) obsahuje glutamin v pozici 23 (Q₂₃), glutamovou kyselinu v pozici 25 (E₂₅) a fenylalanin v pozici 45 (F₄₅). U Def 2 (molekulová hmotnost 8228 Da a pI 9.18) jsou nahrazeny glutamovou kyselinou (E₂₃) a asparagovou kyselinou (D₂₅) v propeptidu a argininem (R₄₅) ve zralém peptidu. Zda tyto náhrady ovlivňují vlastnosti peptidu je v současné době neznámé. Obě isoformy byly aktivní proti *M. luteus*, ale neinhibovali růst *E. coli*.

Identifikované defensinové geny *I. ricinus* se podobají většině katonických defensinů, které již byly popsány. Jsou silně indukované jen ve střevě po infekci *Borrelia burgdorferi* (Rudenko *et al.*, 2005). Zjištění, že klíštěcí defensiny jsou exprimovány pouze ve střevě bylo zpočátku překvapující. Nicméně, protože je střevo často v kontaktu s prostředím, exprese defensinu na tomto místě se zdá být velmi vhodná. Střevo je totiž příznivým prostředím pro přežití přijatých mikroorganismů, protože klíšťata postrádají extracelulární trávicí enzymy.

Proto je pro klíšťata přirozené vyvíjet imunitní odpověď střeva na přijaté mikroorganismy (Nakajima *et al.*, 2002).

Zdá se, že preprodefensin *I. ricinus* je indukován jako součást širokospektrální imunitní odpovědi s tkáňově specifickou expresí, která není schopná účinně odstranit patogenní infekce. Přítomnost defensinu u klíšťat napadených *B. burgdorferi* byla oznámena Sonenshine a spolupracovníky (2002). Ukázaly, že *B. burgdorferi*, ale ne *Bacillus subtilis* ani *Escherichia coli*, naočkované do hemolymfy klíšťete, indukovaly sekreci defensinu. Také uvažovali, že spirochéty možná přežívají v přítomnosti jediného střevního defensinu, ale jsou eliminovány dvěma odlišnými defensiny sekretovanými do hemolymfy (Sonenshine *et al.*, 2002).

Už je také známa částečná sekvence **třetího defensinu (Def3)** u *I. ricinus* se čtyřmi z šesti cysteinových zbytků nutných pro tvorbu disulfidových můstků. PCR produkt defensinu byl získán použitím cDNA knihovny slinných žláz jako templátu. Nukleotidová a odvozená aminokyselinová sekvence částečného Def3 fragmentu ukazuje více sekvenčních shodností k jinému klíšťeti, v porovnání se stejnými částmi prepropeptidů Def1 a Def2 u *I. ricinus*, které jsou exprimovány ve střevě. Jeho přítomnost ve slinných žlázách vede k hypotéze, že je zahrnut ve vrozené imunitě klíšťat, kvůli příjmu bakterií obsažených v krvi, kterou sají.

2.5.3. Genomová organizace AMP a intron/exonová struktura defensinu

Genomová organizace AMP byla popsána u hmyzu jako *Drosophila melanogaster* (Dimarcq *et al.*, 1994), *Aedes aegypti* (Cho *et al.*, 1997; Lowenberg *et al.*, 1999) *Rhodnius prolixus* (Lopez *et al.*, 2003), *Anopheles gambiae* (Egglestone *et al.*, 2000), *Stomoxys calcitrans* (Lehane *et al.*, 1997; Munks *et al.*, 2001), *Formica aquilonia* (Viljakainen a Pamilo, 2005).

Intron/exonová organizace nebyla ještě rozpoznána u celé hmyzí defensinové skupiny. Defensiny z *D. melanogaster* a *S. calcitrans* jsou bez intronů. Defensiny komárů (*A. aegypti*, *A. gambiae*) jsou tvořeny dvěma exony oddělených krátkým intronem. Introny byly nalezeny také u škorpióna *L. quinquestriatus* (Froy a Gurevitz, 2003), škeble *Mytilus galloprovincialis* (Mitta *et al.*, 2000), hmyzu *R. prolixus* (Polez *et al.*, 2003) a měkkém klíšťeti *O. moubata* (Nakajima *et al.*, 2002). Všechny defensinové geny *O. moubata* se skládají ze 4 exonů a 3 intronů. Stejné uspořádání lze nalézt u defensinu MGD2 škeblí (Mitta *et al.*, 2000; Nakajima *et al.*, 2002). Na rozdíl od defensinových genů *O. moubata*, geny defensinu u dříve studovaných tvrdých klíšťat (*I. scapularis*, *D. variabilis*, *A. hebraeum*, *B. microplus*, *H.*

longicornis) nevykazují přítomnost intronů. Organizace defensinu u tvrdého klíštěte *I. ricinus* je strukturálně podobná *O. moubata*. Defensinový gen *I. ricinus* zahrnuje 3 exony (43 bp, 62 bp a 118 bp), které jsou separovány dvěma introny (112 bp a 591 bp). Podobnosti v genomové struktuře defensinu a existence jeho isoform u *I. ricinus* a *O. moubata* naznačuje, že vrozená imunita u těchto vzdáleně příbuzných druhů možná sdílí společné znaky.

Přítomnost intronů má dopad na biologický význam defensinů klíšťat. Ještě ale nebylo potvrzeno, jestli existuje souvislost mezi přítomností intronů a četnými isoformami defensinu (jako v případě *O. moubata*). U tvrdých klíšťat (*I. scapularis* nebo *D. variabilis*), kde nejsou introny, se zdá, že je jen jediná isoforma defensinu (Hynes *et al.*, 2005; Rudenko *et al.*, 2005).

2.5.4. Další antimikrobiální peptidy u některých druhů klíšťat

Ještě jeden antimikrobiální peptid, **ricinusin**, který se liší od klasické skupiny defensinu, byl identifikován v cDNA knihovně *I. ricinus* (Rudenko, Golovchenko, Grubhoffer, nepublikovaná data). Ricinusin ukazuje vysokou podobnost k izolátu ISN-L582 *I. scapularis*, k novému antimikrobiálnímu preproteinu u *B. microplus*, microplusin, a novému typu antimikrobiálního proteinu s četnými histidiny u tvrdého klíštěte *A. hebraeum*.

U *D. variabilis* byl objeven lysozym, který zvyšuje účinnost varisinu (Johns *et al.*, 2001). U *B. microplus* nový antimikrobiální peptid, ixodidin, vykazuje proteinázovou inhibiční aktivitu proti chymotrypsinu (Fogaca *et al.*, 2006). Peptidy schopné inhibovat jak proteinázovou inhibiční aktivitu, tak mikrobiální aktivitu, byly popsány u *Tachipleus tridentatus* (Agarwala *et al.*, 1996) a u rostlin *Helianthus annuus* (Guidici *et al.*, 2000), ale ne u Arachnid.

3. Cíle práce

1. Literární studie k problematice metodických přístupů při studiu diferenciallyně exprimovaných genů.
2. Optimalizace technik pro detekci a izolaci genu defensinu z klíčštěte (například RNA/DNA purifikace, cDNA syntéza, PCR, elektroforéza, klonování, sekvenování).
3. Interpretace výsledků a zkušeností se zvolenými metodami s konečným cílem identifikace a izolace genu klíšťového defensinu po indukci patogenem.

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

Použité primery

Primer	Sekvence	T _A (°C)
Def-Forw	5'- CAC CAT GAA GGT CCT TGC CGT CT - 3'	52
Def-Rev	5'- CTA TTT CAG ACG CAG ATG CAG GTC C - 3'	52
M13-Forw	5'- GTA AAA CGA CGG CCA - 3'	50
M13-Rev	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'	50
T7-promotor	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'	50

DNA a RNA elektroforéza

Chemikálie	Složení
1x TBE pufr	2 mM Na ₂ EDTA, 89 mM kyselina boritá, 89 mM Tris
50x TAE pufr	200 mM Tris-HCl, 50mM EDTA
Agaróza	1% agaróza (SERVA) pro ELFO v 1x TAE pufru
Agaróza NA	1.2% agarosa NA (SERVA) bez RNáz v 1x TBE pufru
6x Loading dye (RNA)	0.25% (w/v) bromophenol blue, 0.25% (w/v) xylene cyanol, 30% (w/v) glycerol, 1.2% SDS, 60mM podium phosphate, 500x SYBR Green; pH 6.8
5x Loading dye (DNA)	20% Ficoll, 10mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mg/ml Orange G, 500x SYBR Green

SDS-PAGE

Chemikálie	Složení
10% SDS	Laurysulfát sodný
10% APS	Amonium persulfát
TEMED	N, N, N', N'- tetramethylenediamine
40% AA	Acrylamide a bisacrylamide (37.5:1)
Gel. pufr C	1.5 M Tris-HCl pH 8.8
10x ELFO pufr	250 mM Tris, 1.92 mM glycin, 1% SDS
1x vzorkový pufr	50 mM Tris-HCl pH6.8, 100 mM dithiotraitol, 2% SDS, 0.2% bromophenol blue, 10% glycerol
Barvicí roztok	PageBlue™ (Invitrogen)
30% AA	Acrylamide a bisacrylamide (19:1)

Restrikční analýza

Enzym	Restrikční místo
EcoRI	5' - G↓AATTC - 3' 3' - CTTAA↓G - 5'

Plazmid pro sekvenování a expresní plazmid

pCR [®] 4-TOPO	Invitrogen – selekce přes ampicilin
pET100/D-TOPO [®]	Invitrogen – selekce přes ampicilin

Média a půdy pro pěstování bakterií a pro expresi

Chemikálie	Složení
LB médium	1% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extrakt, 0.5% NaCl, pH 7.0; sterilní
LB agar	1,5% bacto-agar v LB médiu
IPTG	Isopropyl-β-D thiogalactoside (zásobní roztok: 1 M)
Antibiotikum	Ampicilin (zásobní roztok 50mg/ml H ₂ O)
SOC médium	2% bacto-tryptone, 0.5% bacto-yeast extrakt, 0.05 % NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glukosa, pH 7.0; sterilní

Bakteriální příjemci plazmidu

One Shot [®] TOP10 E.coli (Chemically Competent, Invitrogen)
BL21 Star [™] (DE3) One Shot [®] Cells (Invitrogen)

4.2. Metody

4.2.1. Izolace RNA

Pro izolaci RNA byl použit 1 ml homogenátu nasátých klíšťat *I. ricinus* v TRI REAGENTU (Sigma).

1. Homogenát byl centrifugován 10 minut při 12000 rpm a 4°C.
2. Supernatant byl přenesen do čisté eppendorfky a ponechán 5 minut při pokojové teplotě.
3. Po inkubaci bylo přidáno 200 µl chloroformu a vzorek byl vortexován 15 sekund.
4. Pak byl po dobu 10 minut inkubován za pokojové teploty a centrifugován 15 minut při

12000 rpm a 4°C.

5. Horní bezbarvá fáze obsahující RNA byla přenesena do čisté eppendorfky a promíchána s 500 µl isopropanolu.
6. Po 10 minutové inkubaci byl vzorek centrifugován po 10 minut při 12000 rpm a 4°C.
7. Supernatant byl odstraněn a pelet RNA byl promyt 1 ml 75% etanolu.
8. Vzorek byl opět vortexován, centrifugován při 13000 rpm a 4°C po dobu 5 minut.
9. Supernatant byl odsán a vzniklý pelet RNA byl sušen po dobu 15 minut při pokojové teplotě.
10. K peletu bylo přidáno 50 µl vody, vzorek byl opatrně promíchán pipetou a inkubován za občasného promíchání po 10 minut při 55°C. Vyizolovaná RNA byla uchována při teplotě -20°C pro další použití.

Příprava 1x TBE pufru

80 ml 5x TBE bylo doplněno do 400 ml destilovanou vodou.

Kvalita RNA byla zhodnocena pomocí gelové elektroforézy na 1.2% agarózovém gelu v 1x TBE při napětí 110V. Před nanesením na gel byla RNA denaturována při 75°C po dobu 5 minut v přítomnosti vzorkového pufru.

7.2.2. Dvoustupňová RT-PCR –Two step RT-PCR (syntéza cDNA)

Dvoustupňová RT-PCR je metoda užívaná pro syntézu prvního vlákna cDNA. V této práci byl použit kit Enhanced Avian RT-PCR Kit (Sigma).

Do 0.5 ml eppendorfky umístěné na ledu byly přidány následující komponenty:

<i>Rreakční komponenta</i>	<i>Objem (1 reakce)</i>	<i>Objem (negativní kontrola)</i>
RNase free water	3 µl	8 µl
RNA templát	5 µl	0 µl
Deoxynucleotide mix	1 µl	1 µl
Anchored oligo (dT) ₂₃	1 µl	1 µl

Celkový objem 10 µl

Vzorky byly opatrně promíchány, krátce centrifugovány a inkubovány 10 minut při 70°C.

Poté byly ochlazeny na ledu, opět krátce stočeny a byly přidány následující složky:

<i>Reakční komponenta</i>	<i>Objem (1 reakce)</i>	<i>Objem (negativní kontrola)</i>
RNase free water	6 μ l	6 μ l
10x buffer for eAMV-RT	2 μ l	2 μ l
RNase inhibitor	1 μ l	1 μ l
Enhanced avian RT	1 μ l	1 μ l

Celkový objem 20 μ l

Vzorky byly inkubovány po dobu 50 minut při teplotě 45°C (syntéza cDNA).

Příprava 1x TAE pufru a 1% agarózového gelu

1x pufr TAE

20 ml 50x TAE bylo doplněno destilovanou vodou do 1 litru.

1% agarózový gel

1g agarózy + 100 ml 1x TAE.

Získaná cDNA byla ověřena gelovou elektroforézou na 1% agarózovém gelu v 1x TAE při napětí 125V a uchována při -20°C.

7.2.3. PCR (polymerázová řetězová reakce)

PCR je *in vitro* metoda umožňující mnohonásobnou amplifikaci vybraného úseku DNA, pro který jsou k dispozici dva oligonukleotidové primery. Ty jsou komplementární k 3' a 5'-koncovým sekvencím úseku, jenž má být namnožen. Reakce je katalyzována termostabilní DNA polymerázou. Tento enzym je izolován z termostabilního druhu bakterie. Nejčastěji je používána Taq – polymeráza nazvaná podle bakterie *Thermus aquaticus*. DNA polymeráza vykazuje dostatečnou enzymovou aktivitu po celou dobu reakce a je schopna syntetizovat komplementární vlákno podle templátu jednovláknové DNA tak, že přidává k existujícímu úseku druhého vlákna nové nukleotidy ve směru 5'- 3'. K tomu potřebuje kromě templátového vlákna a 4 deoxynukleosidtrifosfátů krátký exprimující úsek druhého vlákna – primer. Jako primery se používají synteticky připravené oligonukleotidy, které zpravidla obsahují 18-24 nukleotidů a jejichž sekvence je komplementární k požadovaným úsekům DNA. Aby došlo k hromadění produktu, musí být použity v PCR dva primery, přičemž každý je komplementární k sekvenci jednoho řetězce dvoušroubovice na opačných koncích úseku, který má být amplifikován.

Prvním krokem je denaturace DNA zvýšením teploty na 90-98°C, kdy se od sebe oddělí jednotlivá vlákna dvoušroubovice DNA. Poté je reakční roztok ochlazen v nadbytku obou primerů, které nasedají na komplementární úseky těchto jednovláknových DNA v protisměrné orientaci. Ve třetím kroku následuje zahřátí na takovou teplotu, která je vhodná pro práci Taq DNA polymerázy a je nasyntetizováno nové vlákno DNA. Poté se celý cyklus vícekrát opakuje. V dalších cyklech slouží jako templát již v předchozích cyklech nasyntetizované molekuly DNA. Počet opakování závisí na tom, jaké je výchozí množství templátu ve vzorku, obvykle se používá 25-35 cyklů, přičemž se v každém cyklu množství molekul oproti předchozímu cyklu zdvojnásobí. Během několika cyklů tak začnou v roztoku převažovat amplifikované molekuly ohraničené z obou stran primery. Produkt se hromadí geometrickou řadou, takže po 30 cyklech se získá ze dvou vláken teoreticky celkem 2^{30} kopií (tj. 107 miliónů kopií).

Výhoda PCR je, že jí lze použít k namnožení jakékoliv sekvence i v případě, kdy máme k dispozici malé množství vzorku.

Základním mechanismem PCR je cyklické opakování tří kroků:

1. denaturace DNA – dojde k oddělení vláken dvoušroubovice DNA
2. annealing – nasednutí primerů na svou komplementární sekvenci
3. extension – syntetizování sekvence mezi primery pomocí DNA polymerázy

Příprava primerů a dNTPs

Deoxynukleosidtrifosfáty (dNTPs) (MBI Fermentas)

Z 100mM zásobních roztoků dNTPs byly připraveny 10mM roztoky dNTPs, kdy bylo k 10 μ l 100mM zásobního roztoku přidáno 90 μ l deionizované vody. Poté byla připravena směs ze všech 4 deoxynukleosidtrifosfátů ve stejných poměrech: 25 μ l dATP + 25 μ l dTTP + 25 μ l dCTP + 25 μ l dGTP.

Primery (Generi Biotech)

0.1mM zásobní roztoky primerů byly naředěny na 0.01mM. K 10 μ l 0.1mM zásobního roztoku bylo přidáno 90 μ l deionizované vody.

Byly použity specifické primery forward a reverse pro gen defensinu.

Reakční směs pro PCR

Reakční směs byla připravena na ledu a co nejrychleji dána do cycleru Mastercycler (Eppendorf), v němž reakce probíhala. Byl použit 10x kompletní PCR pufr (Top-Bio) (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0.1% Triton[®] X-100, 1.5 mM MgCl₂).

<i>Reakční komponenta</i>	<i>Objem (1 reakce)</i>
deionizovaná voda	9.5 µl
10x kompletní pufr	2 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
primer forward (0.01mM)	1 µl
primer reverse (0.01mM)	1 µl
Taq polymeráza (1U/ µl)	0.5 µl
templátová DNA (295 µg/ml)	5 µl

Celkový objem PCR reakce je 20 µl

Pro detekci případné kontaminace byla provedena negativní kontrola, která zahrnovala všechny reakční komponenty, ale templátová DNA byla nahrazena deionizovanou vodou. Pro kontrolu falešné negativity byla použita pozitivní kontrola, která byla opět tvořena reakčními komponentami, ale jako templátová DNA byla použita plazmidová DNA.

Nastavení programu pro PCR:

Pro PCR se použil automatický teplotní Mastercycler (Eppendorf).

1. počáteční denaturace 95°C.....5minut
2. denaturace pro každý cyklus 95°C.....30 sekund
3. zchlazení a nasedání primerů 52°C.....30 sekund
4. extension- syntéza DNA 72°C.....30 sekund
5. opakování od kroku 2. – celkem 35 cyklů
6. finální extension 72°C.....25 minut
7. udržovat teplotu na 4°C

Výsledky reakce byly zhodnoceny na 1% agarózovém gelu v 1x TAE při napětí 125V.

7.2.4. Purifikace PCR produktu

PCR produkt byl vyříznut z agarózového gelu a následně purifikován pomocí QIAquick® Gel Extraction Kit (250) (Qiagen).

1. Byl zvážen vyříznutý kousek gelu obsahující PCR produkt a přidáno trojnásobné množství QG pufru.
2. Vzorek byl inkubován 10 minut při 50°C a vortexován každé 2-3 minuty.
3. Byl přidán 1 objem isopropanolu a směs byla vortexována.
4. Celý objem byl přenesen do 2 ml kolonky.
5. Vzorek byl centrifugován po dobu 1 minuty a supernatant byl odstraněn.
6. Bylo přidáno 0.5 ml buffer QG a centrifugováno 1 minutu.
7. Opět byl odstraněn supernatant, přidáno 0.75 ml buffer PE a centrifugováno 1 minutu.
8. Supernatant byl odsán, vzorek byl centrifugován 1 minutu při 13 000 rpm a kolonka byla přendána do 1.5 ml eppendorfky.
9. Bylo přidáno 30 µl deionizované vody (pro dosažení vyšší koncentrace PCR produktu v roztoku), vzorek stál 1 minutu stát při pokojové teplotě a byl centrifugován 1 minutu.

7.2.5. Ligace PCR produktu do vektoru pCR® 4-TOPO

Purifikovaný PCR produkt byl ligován do vektoru pCR® 4-TOPO (Invitrogen).

<i>Reakční komponenta</i>	<i>Objem</i>
PCR produkt	4 µl
salt solution	1 µl
TOPO vektor	1 µl

Celkový objem 6 µl

Ligační směs byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě a následně byla přemístěna na led.

7.2.6. Transformace One Shot® TOP10 *E. coli* (Chemically Competent, Invitrogen)

Kompetentní buňky One Shot® TOP10 *E. coli* (Chemically Competent, Invitrogen) byly transformovány plazmidem obsahujícím inzert. Bakterie *E. coli* musí být vystavena působení látek modifikujících cytoplazmatickou membránu a po rychlém přemístění do teploty kolem 40°C (teplotní šok) je teprve schopna přijmout vektorovou DNA.

Kompetentní buňky One Shot[®] TOP10 *E. coli* (Chemically Competent, Invitrogen) byly skladovány při teplotě -70°C. Před použitím byly zvolna rozmrazeny na ledu. K buňkám byly přidány :

1. 2 µl ligační směsi (viz. 7.2.5.) a vše bylo opatrně promícháno
2. Směs byla inkubována 30 minut na ledu.
3. Buňky byly vystaveny teplotnímu šoku při teplotě 42°C 30 sekund (bez třepání), kdy se vektor dostal přes rozvolněnou plazmatickou membránu do kompetentních buněk.
4. Po teplotním šoku následovalo okamžité zchlazení na ledu a v boxu bylo k buňkám přidáno 250 µl sterilního roztoku SOC média.
5. Směs byla kultivována při teplotě 37°C na třepačce 1 hodinu.
6. V boxu byla transformační směs rozdělena na dva díly (100 µl a 200 µl, pro zajištění růstu jednotlivých kolonií) a každý díl byl přenesen na předem připravenou Petriho misku s agarem a antibiotikem, rozetřen a inkubován přes noc při 37°C (bez třepání).
7. Z narostlých kolonií bylo 10 vybráno a každá přeočkovaná v boxu do 1.5 ml LB média s ampicilinem (50 µg/ml) a kultivovány na třepačce přes noc při 37°C.
8. Buňky byly centrifugovány 15 minut při 16 000 rpm a 4°C.
9. Byl odsán supernatant a pelet byl uchován při -20°C.

Z buněčného peletu byla poté izolována plazmidová DNA.

Příprava kultivačního média

25 g směsi pro LB médium bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Vše bylo promícháno na míchačce a poté doplněno vodou do 1 litru. Roztok byl rozdělen do 200 ml lahvíček a do 2 z nich bylo přidáno po 3g agaru. Vše bylo zautoklávováno.

Příprava Petriho misek pro kultivaci

Byly připraveny dvě Petriho misky s LB/agarem. Na každou bylo potřeba 20 ml LB média s agarem a s 20 µl ampicilinu (50µg/ml). Příprava probíhala ve sterilním boxu. Na ampicilinových plotnách narostou pouze buňky, které obsahují plazmid, ten totiž nese geny pro rezistenci vůči antibiotikům.

7.2.7. Izolace plazmidové DNA

K izolaci plazmidové DNA byl použit kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen).

1. Do každé eppendorfky s buňkami bylo přidáno 250 µl pufru P1 a vzorky byly vortexovány.

2. Bylo přidáno 250 µl pufru P2 a směsi byly opatrně 4-6x protřepány.
3. Přidáno 350 µl pufru P3 a opět opatrně 4-6x protřepány.
4. Směsi byly centrifugovány 10 minut při 16 000 rpm.
5. Supernatanty byly přeneseny na kolonky, 60 sekund centrifugovány a to, co proteklo přes kolonku bylo, odstraněno.
6. Bylo přidáno 500 µl pufru PB, vzorky byly centrifugovány 60 sekund a bylo odstraněno to, co proteklo přes kolonku.
7. Bylo přidáno 750 µl pufru PE, vzorky byly centrifugovány 60 sekund a odstraněno to, co proteklo přes kolonku.
8. Vzorky byly centrifugovány 1 minutu a kolonky přeneseny do eppendorfek.
9. Do každé kolonky bylo přidáno 50 µl deionizované vody (pro dosažení vyšší koncentrace této DNA v roztoku), vzorky byly ponechány 1 minutu při pokojové teplotě a 1 minutu byly centrifugovány při maximálních otáčkách.

7.2.8. Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu

7.2.8.1. PCR

Metoda PCR byla použita pro ověření přítomnosti inzertu ve vektoru pCR[®] 4-TOPO s následným osekvenováním vybraných plazmidů s inzertem. PCR reakce byla provedena dle postupu 7.2.3.

7.2.8.2. Restriční analýza

Restriční analýza je druhý způsob, jak ověřit přítomnost PCR inzertu v plazmidu, neboť plazmid pCR[®] 4-TOPO obsahuje EcoRI restriční místa.

Restriční analýza je soubor technik, využívajících zvláštní vlastnosti restričních endonukleáz (restriktáz). Tyto enzymy se vážou na specifické rozpoznávací sekvence dsDNA, dlouhé zpravidla 4-6 bp, přičemž oba řetězce štěpí buď uvnitř, nebo poblíž této sekvence. Rozpoznávací sekvence mohou být unikátní (např. u enzymu EcoRI) nebo neurčité (např. HindII), kdy jeden nebo více nukleotidů v sekvenci je libovolných. Místo štěpení DNA se označuje jako restriční místo. Počet restričních míst na zkoumané DNA závisí na její sekvenci a na délce rozpoznávací sekvence. Činností restriktáz je DNA rozštěpena na několik fragmentů o různé délce, které lze od sebe oddělit elektroforézou. Délka jednotlivých fragmentů je zjišťována jejich porovnáním s hmotnostními standardy, které jsou umístěny na tomtéž gelu.

Příprava restrikční směsi

<i>Reakční komponenta</i>	<i>Objem (1 reakce)</i>
Plazmidová DNA (65-123 µg/ml)	5 µl
Pufr EcoRI	2 µl
Enzym EcoRI (15U/ µl)	1 µl
deionizovaná voda	7 µl

Celkový objem 15 µl

Směs byla inkubována po 3 hodiny při 37°C . Elektroforézou na 1% agarózovém gelu v 1x TAE byla zkontrolována přítomnost plazmidu s PCR produktem. Vybrané plazmidy s inzerty byly následně osekvenovány.

7.2.8.3. Sekvenční reakce

K sekvenování byly použity jen vybrané plazmidy, u kterých byl prokazatelně přítomný inzert. Proto byly použity 4 plazmidové DNA, které byly vybrány na základě výsledku předchozí PCR a restrikce. K přípravě sekvenční reakce byl použit kit Big Dye[®] Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Příprava reakční směsi

Do reakce je potřeba přidat vhodné množství templátové DNA, proto byla měřena koncentrace purifikovaného PCR produktu v tenkostěnných kyvetách (UVette220-1600nm; Eppendorf) ve spektrofotometru (BioPhotometer, Eppendorf) při 260 nm. Koncentrace DNA se pohybovala mezi 72-106 µg/ml. Čistota DNA byla zkontrolována pomocí indexu OD₂₆₀/OD₂₈₀.

Množství DNA potřebné pro reakci bylo odečteno z tabulky dodávané výrobcem sekvenčního kitu. Pro ds DNA by měla koncentrace templátové DNA v reakci dosahovat 50-100fmol. Pro získaný purifikovaný produkt odpovídá této koncentraci 13-26 ng templátové DNA.

Použité množství templátové DNA : 1. plazmidová DNA 2.8 µl

2. plazmidová DNA 3.9 µl

3. plazmidová DNA 4.0 µl

4. plazmidová DNA 2.7 µl

Zbylé objemy byly doplněny do 11 µl deionizovanou vodou a inkubovány 1 minutu při 96°C.

Sekvenční reakce obsahovala:

<i>Reakční komponenta</i>	<i>Objem (1 reakce)</i>
Reagent Mix	4 µl
2.5x Sequencing Reaction Buffer	4 µl
Primer M-13 Forw/M-13 Rev (1.6 pmol)	1 µl
Templát (72-106 µg/ml) + deionizovaná voda	11 µl

Celkový objem 20 µl

Pro každý primer (M-13 Forw a M-13 Rev) byly připraveny 4 reakční směsi s jednotlivými plazmidovými DNA.

Program pro sekvenční reakci:

96°C.....20 sekund
50°C20 sekund
60°C.....4 minuty
Celé opakováno v 30 cyklech.
Udržovací teplota 4°C

Po skončení reakce byla provedena precipitace DNA. Ke každému vzorku byly přidány 4 µl stop solution (1.5 M NaOAc, 50 mM EDTA). DNA byla vysrážena přidáním 1 µl glykogenu a 60 µl chlazeného 95% ethanolu. Vzorky byly řádně promíchány a centrifugovány při maximálních otáčkách a 4°C 15 minut. Po odsání supernatantu byl pelet dvakrát promyt chlazeným 70% ethanolem a centrifugován 2 minut při 14 000 rpm a 4°C. Pelet byl sušen na vzduchu (cca 30 minut).

Vzorky byly analyzovány na sekvenátoru Beckman Automatic Sequenator (Beckman Coulter).

7.2.11. Analýza DNA sekvencí

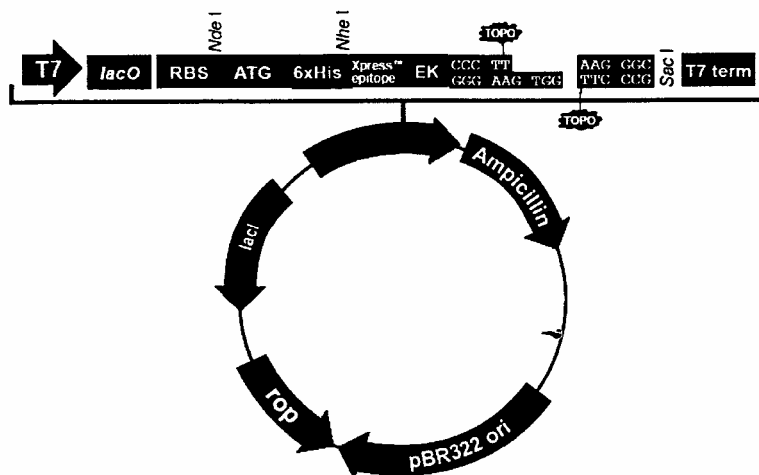
Získané DNA sekvence byly analyzovány pomocí programu Chromas a DNASTar a srovnány se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank.

7.2.12. Příprava rekombinantního konstruktů v expresním vektoru Champion™

pET100/D-TOPO®

Rekombinantní proteiny byly připraveny v bakteriálním systému za použití Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kitu (Invitrogen).

K expresi rekombinantního proteinu defensinu posloužil expresní vektor pET 100/D-TOPO[®] se silným bakteriofágovým T7 promotorem, který umožňuje indukci exprese. Promotor obsahuje laktóзовý operátor, který je indukovatelný laktózou nebo jejím derivátem IPTG. V jejich přítomnosti dochází k vytlačení lac represoru, který se vázal na laktóзовý operátor a bránil expresi rekombinantního proteinu bez indukce, a začíná exprese daného genu. Pro indukci exprese byl použit 1mM roztok IPTG.



Obrázek 1: Mapa expresního vektoru pET 100/D-TOPO[®].

Na základě výsledku sekvenční reakce byl vybrán plazmid pCR[®] 4-TOPO obsahující celý požadovaný gen, který byl vhodný pro klonování do expresního plazmidu pET100/D-TOPO[®]. Tato plazmidová DNA (s celým požadovaným genem) nejprve posloužila jako templát pro PCR reakci se specifickými primery. K 5' konci forward primeru byla (před ATG kodon) přidána CACC sekvence pro správnou orientaci produktu ve vektoru; 3' konec reverse primeru obsahoval stop kodon. PCR reakce proběhla dle uvedeného schématu (viz. 7.2.3.). PCR produkty byly purifikované (viz.7.2.4.).

Ligace inzertu do expresního plazmidu

Purifikovaný PCR produkt byl ligován do vektoru pET100/D-TOPO[®].

<i>Reakční komponenta</i>	<i>Objem</i>
Čerstvě přečištěný PCR produkt	4 µl
Salt solution	1 µl
pET100/D-TOPO [®]	1 µl

Celkový objem 6 µl

Ligační směs byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě.

Plazmidy, obsahující inzert, byly osekvenovány (za použití primeru T7 promotor) pro zjištění správného čtecího rámce podle postupů 7.2.6 – 7.2.8.1.

7.2.13. Transformace expresních buněk *E.coli* BL21 StarTM (DE3) One Shot[®] Cells

Transformace expresních kompetentních buněk BL21 StarTM (DE3) One Shot[®] Cells (Invitrogen) byla provedena vektorem obsahující inzert ve správném čtecím rámci.

Kompetentní buňky byly skladovány při -70°C. Před použitím byly pozvolna rozmrazeny na ledu. K expresním buňkám bylo přidáno:

1. 5 µl plazmidové DNA obsahující rekombinantní plazmid s inzertem
2. Směs byla inkubována 30 minut na ledu.
3. Poté byly buňky vystaveny teplotnímu šoku (42°C 30 sekund).
4. Buňky byly hned přemístěny na led.
5. V boxu bylo k buňkám přidáno 250 µl SOC média.
6. Směs byla inkubovaná na třepačce při 37°C 30 minut.
7. Poté byla přeočkovaná v boxu do 10 ml LB media s ampicilinem (50 µg/ml) a kultivovaná přes noc za stálého třepání při 37°C.

7.2.14. Pilotní exprese

1. 500 µl kultury BL21 StarTM (DE3) One Shot[®] Cells (transformované rekombinantním vektorem obsahující inzert) narostlé přes noc bylo přeneseno do 10 ml čerstvého LB média s ampicilinem (50 µg/ml).
2. Buňky byly kultivovány 3 hodiny na třepačce při 37°C.
3. Poté bylo odebráno 500 µl kultury. Vzorek byl uschován pro SDS-PAGE analýzu jako předindukční kontrola.
4. Bylo přidáno 10 µl IPTG (konečná koncentrace v kultuře 1mM) pro indukci exprese.
5. Exprese probíhala 6 hodin (na třepačce při 37°C) a každou hodinu byl odebrán jeden 500 µl vzorek pro kontrolu exprese.
6. Bakteriální pelet byl z každého vzorku získán centrifugací při maximálních otáčkách a 4°C (30 sekund), odsátím supernatantu a byl zmražen při teplotě -20°C.

7.2.15. SDS-PAGE – kontrola exprese rekombinantního proteinu

Vzorky z pilotní exprese byly analyzovány v 17.5% polyakrylamidovém gelu s použitím 5% zaostřovací (stacking) polyakrylamidové části gelu. Gel a pufrý byly připraveny podle

standardních postupů (Laemmli, 1970). Elektroforéza probíhala na aparatuře SE 250 (Hofer Scientific Instruments) při napětí 140V v 1x ELFO pufu.

Příprava gelu

Rozdělovací gel

<i>Reakční komponenta</i>	<i>Objem</i>
Deionizovaná voda	2.975 ml
40% Acrylamide/Bis 0.5 M Tris-HCl pH 6.8	4.375 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
Temed	5 µl
10% APS	50 µl

Zaostřovací gel

<i>Reakční komponenta</i>	<i>Objem</i>
Deionizovaná voda	2.7 ml
30% Acrylamide/Bis mix	0.67 ml
1.0 M Tris-HCl pH 8.8	0.5 ml
10% SDS	40 µl
Temed	4 µl
10% APS	40 µl

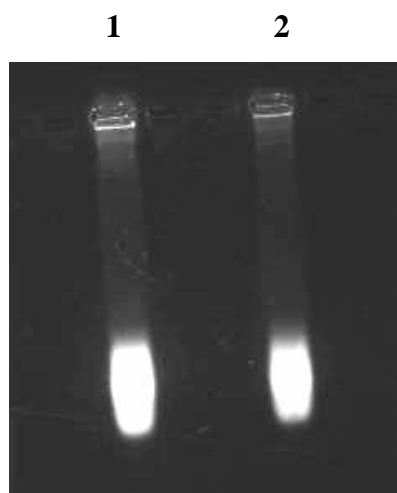
Příprava na analýzu vzorků

1. Buněčné pelety z pilotní exprese (vzorky : 0h, 1h-6h) byly resuspendovány v 80 µl deionizované vody.
 2. Z každého vzorku bylo použito 20 µl.
 3. Do každého se přidaly 4 µl 5x vzorkového pufu.
 4. Roztoky byly denaturovány 5 minut při 100°C.
 5. Poté byly ochlazeny na ledu a stočeny při maximálních otáčkách (10 minut).
 6. Vzorky byly nanášeny na gel po 18 µl supernatantu na jamku.
 7. Jako standard molekulových hmotností byl použit marker Precision plus Protein (BioRad).
 8. Po skončení elektroforézy byl gel 3x promyt destilovanou vodou (po 10 minutách) a obarven v roztoku PageBlue™ (Invitrogen).
- Po 4 dnech byl gel odbarven (3x promyt) v destilované vodě a fotograficky zaznamenán.

5. Výsledky

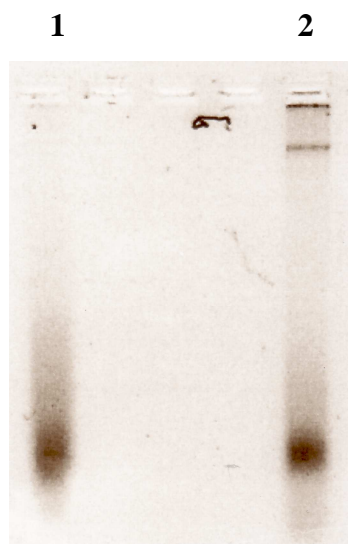
5.1. Izolace RNA a syntéza cDNA

Z homogenátu nasátých klíšťat *I. ricinus* se podařilo izolovat RNA (obr.2), která byla použita jako templát ve dvoukrokové RT-PCR pro syntézu prvního řetězce cDNA. cDNA byla syntetizována pomocí Anchored oligo (dT)₂₃ primerů (obr. 3).



Obrázek 2: Kontrola celistvosti izolované RNA z homogenátu nasátých klíšťat v Tri Regentu.

- 1- novější RNA
- 2- starší RNA



Obrázek 3: Kontrola nasyntetizované cDNA z RNA.

- 1 – vzorek starší cDNA
- 2 – vzorek novější cDNA

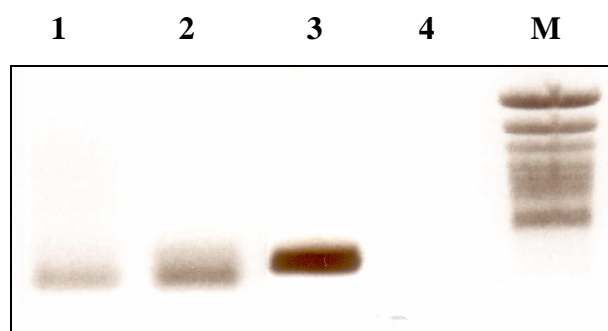
Koncentrace izolované RNA byla 4269 µg/ml.

Koncentrace cDNA byla 295 µg/ml.

5.2. PCR, purifikace, klonování, transformace a sekvenování

Pomocí PCR s genově specifickými primery Def-Forw a Def-Rev, jejichž optimální teplota pro nasedání na DNA je 52°C, byl z cDNA nasátých klíšťat *I. ricinus* získán celý gen pro antimikrobiální peptid defensin s předpokládanou velikostí 225 bp.

Výsledek PCR reakce je zachycen na obrázku 4. Marker není pořádně rozjetý, protože byla elektroforéza vypnutá předčasně.

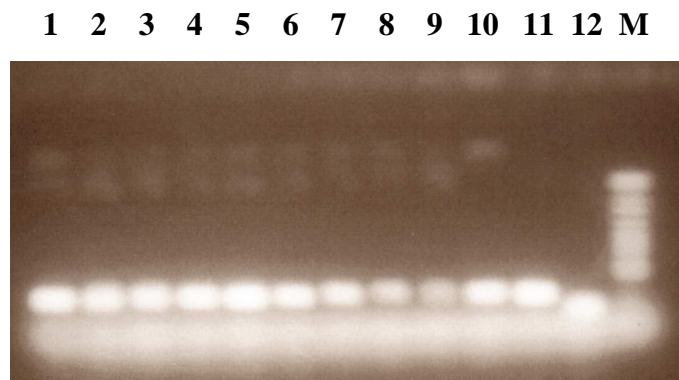


Obrázek 4: Produkty PCR s genově specifickými primery na cDNA z homogenátu nasátých klíšťat.

- 1 – defensin (224 bp) – jako templát pro PCR byla použita starší cDNA
- 2 – defensin (224 bp) – jako templát pro PCR byla použita novější cDNA
- 3 – pozitivní kontrola
- 4 – negativní kontrola
- 5 – marker Gene Ruler 100bp Ladder Plus

Amplifikovaný fragment DNA byl vyříznut z gelu, purifikován, zaklonován do vektorového plazmidu pCR[®] 4-TOPO a použit pro transformaci kompetentních buněk One Shot[®] TOP10 *E.coli* (Chemically Competent). Na ampicilinových plotnách narostly pouze buňky obsahující plazmid, který nese gen pro rezistenci vůči antibiotikům. Z narostlých kolonií jich bylo vybráno 10. Byly přeočkovány do tekutých kultur (LB média s ampicilinem), inkubovány přes noc při teplotě 37°C a poté byla z kultur izolovaná plazmidová DNA (obr. 5). Všech deset vybraných kolonií obsahovalo inzert, ale jen 4 z nich měly inzert ve správné orientaci

(zjištěno pomocí PCR a restrikce). Tyto 4 plazmidové DNA s inzertem byly dále osekvenovány za použití primerů M-13 Forw a M-13 Rev. Výsledky sekvenční reakce byly analyzovány pomocí programů Chromas a DNASTar a byly porovnány v programu Blast.



Obrázek 5: Kontrola přítomnosti inzertu ve vektoru pCR[®] 4-TOPO.

1 – 10 plazmidy, velikost PCR produktu 224 bp

11 - pozitivní kontrola

12 – negativní kontrola

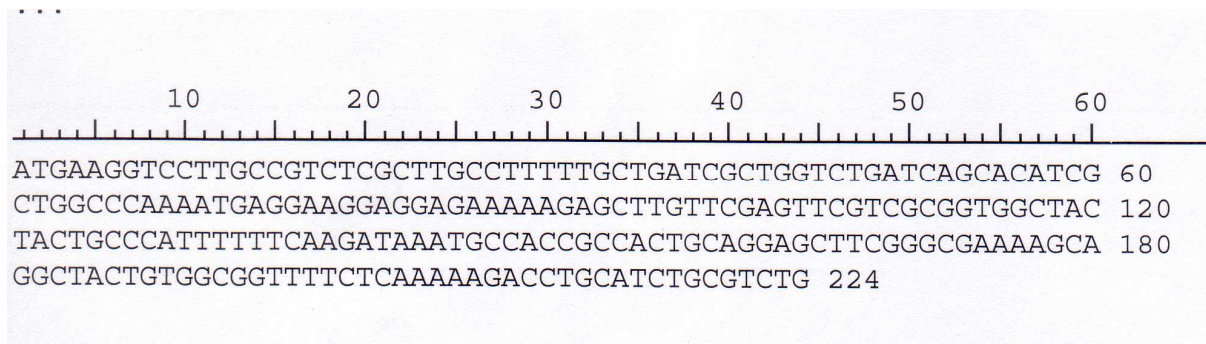
M – marker Gene Ruler 100bp Ladder Plus

5.3. Charakteristika izolovaného defensinu

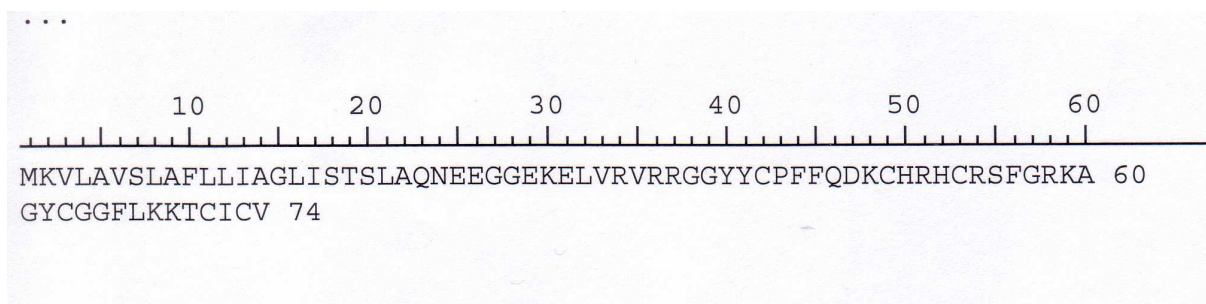
Transkript genu pro defensin je 224 bp dlouhý a je překládán na 74 aminokyselinový preprodefensin. Nukleotidová sekvence transkriptu a aminokyselinová sekvence preprodefensinu jsou znázorněny na obrázcích 6 a 7.

Protein má molekulovou hmotnost 8231.76 Daltonů a již zmíněných 74 aminokyselin, z nichž 12 je silně bazických (K,R) a 5 silně kyselých (D,E). Dále protein obsahuje 26 hydrofóbních aminokyselin (A, I, L, F, W, V) a 18 polárních aminokyselin (N, C, Q, S, T, Y). Jeho izoelektrický bod (pI) má hodnotu 9.176. Celkový počet přeložených bazí je 224, přičemž procentuální zastoupení A je 22.52% (tedy 50 nukleotidů), G 27.03% (60 nukleotidů), T 25.23% (56) a C 25.23% (56).

V programu Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov) byla porovnána získaná aminokyselinová sekvence proteinu. Bylo zjištěno, že se jedná o již popsany a izolovaný defensin- Def1 u klíšťat *I. ricinus*.



Obrázek 6: Nukleotidová sekvence genu pro defensin

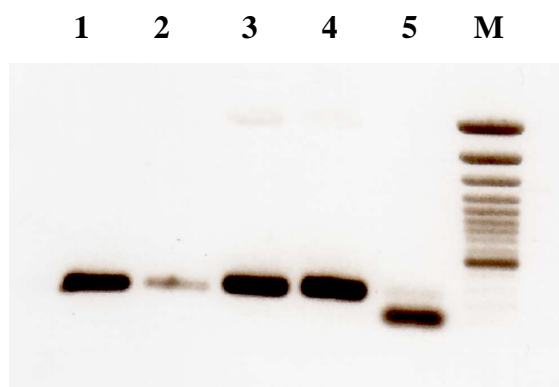


Obrázek 7: Aminokyselinová sekvence genu pro defensin

5.4. Konstrukce expresního plazmidu a exprese rekombinantního proteinu

Pro klonování do expresního plazmidu byla vybrána jediná plazmidová DNA (obr. 8) na základě výsledku z předchozí sekvenční reakce. Klonovací reakce obsahovala čerstvě připravený PCR produkt purifikovaný z agarózového gelu, obsahující na začátku 5' konce (před ATG) sekvenci nukleotidů CACC nezbytnou pro správné umístění inzertu do plazmidového vektoru pET100/D-TOPO®.

Těmito plazmidy byly transformovány kompetentní buňky One Shot® TOP10 *E.coli* (Chemically Competent). Deset narostlých kolonií transformovaných buněk rezistentních vůči antibiotiku bylo přeočkováno do tekutých médií (LB médium s ampicilinem) a po kultivaci z nich byla izolovaná plazmidová DNA a pomocí PCR se specifickými primery byla zkontrolována přítomnost inzertu ve vektoru (obr. 9). Plazmidy, které prokazatelně obsahovaly inzert byly osekvenovány (za použití primeru T7 promotor) pro zjištění správného čtecího rámce.



Obrázek 8: PCR se specifickými primery a s plazmidovou DNA (jako templát), která byla dále použita pro klonování do expresního plazmidu.

1 – PCR produkt (1 μ l plazmidové DNA jako templát v PCR)

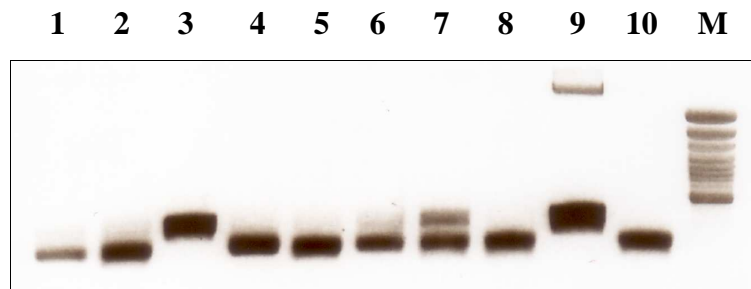
2 – PCR produkt (2 μ l plazmidové DNA jako templát v PCR, vzorek byl špatně nanesen)

3- PCR produkt (3 μ l plazmidové DNA jako templát v PCR)

4 – pozitivní kontrola

5 – negativní kontrola

M – marker Gene Ruler 100bp Ladder Plus



Obrázek 9: Kontrola přítomnosti inzertu ve vektoru pET 100/D-TOPO[®] pomocí PCR se specifickými primery.

1 – 8 plazmidy, velikost 224 bp

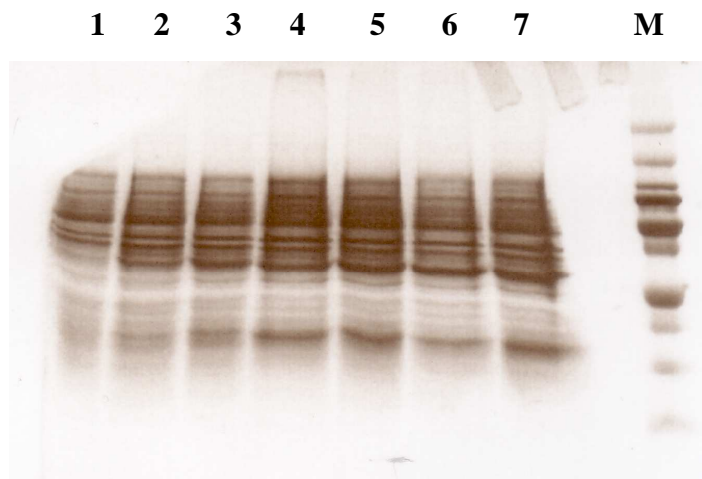
9 – pozitivní kontrola

10- negativní kontrola

M- marker Gene Ruler 100bp Ladder Plus

Ověřený rekombinantní plazmid je použit pro transformaci expresních buněk BL21 Star[™] (DE3) One Shot[®] Cells. Následovala pilotní exprese. Exprese rekombinantního defensinu byla po 3 hodinách kultivace v čerstvém LB médiu s ampicilinem při 37°C vyvolána přidáním 1mM IPTG. Exprese byla patrná již po 1 hodině a trvala dalších 5 hodin. Průběžně byly

odebírány vzorky kultury v časovém intervalu – 1 hodiny. Průběh exprese rekombinantního proteinu byl analyzován na SDS-PAGE (obr. 10). Jako kontrola byl použit vzorek odebraný před indukcí IPTG.



Obrázek 10: Analýza exprese defensinu pomocí SDS-PAGE.

1 – vzorek neindukovaných expresních buněk BL21 StarTM (DE3) One Shot[®] Cells

2 – 7 vzorky expresních buněk po indukci (časový interval – 1 hodina)

M – marker Precision plus Protein (BioRad)

6. Diskuze

Zadání této práce vychází z problematiky řešené v Laboratoři molekulární ekologie parazitů se zaměřením na studii genů, které jsou exprimovány v klíšťeti po infekci patogenem. Klíště jako hematofágní členovec má vyvinutý obranný systém, který mu umožňuje více či méně účinnou ochranu před patogenními mikroorganismy, které proniknou do jeho těla. Antimikrobiální peptidy jsou hlavní součástí přirozené imunity epitelálních buněk.

Defensiny jsou důležitou složkou vrozeného imunitního systému, který přispívá na schopnost většiny živočichů zničit invadující mikroorganismy (Gillespie *et al.*, 1997). Hlavní funkce defensinu je obrana před grampozitivními a gramnegativními bakteriemi, houbami a prvoky. Nicméně, detekce patogena, zatím nějakým neznámým mechanismem, musí nastat předtím, než může být defensin upregulován a/nebo sekretován. Jestliže u *I. ricinus* nejsou přítomny vhodné spouštěcí mechanismy, defensin nemůže být produkován a uvolněn. Zjištění, že *I. ricinus* má defensin, ale nezdá se, že by byl schopen kontrolovat *B. burgdorferi* zahrnuje další faktory, v současné době neznámé, v antimikrobiální obraně klíšťat.

Do dnešní doby bylo identifikováno několik defensinů z různých tkání u různých členovců, včetně klíšťat. Na rozdíl od znalostí, které máme o defensinech u hmyzu, víme velmi málo o defensinech u klíšťat. U tvrdého klíštěte *I. ricinus* byly objeveny 3 defensiny, byla prokázána existence jejich isoform a intron/exonová struktura genů, která je podobná struktuře defensinu u *O. moubata*.

Cílem této práce bylo získat a exprimovat gen pro antimikrobiální peptid defensin z klíštěte *I. ricinus* po indukci patogenem. V této práci byl gen kódující defensin izolován, osekvenován a klonován do expresního vektoru pro další analýzu jeho exprese v prokaryotním systému a studium antimikrobiální aktivity.

K amplifikaci sekvence celého genu pomocí PCR byly použity genově specifické oligonukleotidy a jako templát byla použita cDNA syntetizována z izolované RNA z nasátých klíšťat *I. ricinus*. Získaná forma genu pro defensin byla klonována do pCR[®] 4-TOPO plazmidu, transformována do kompetentních buněk *E. coli* a následně osekvenována. Připravená forma genu byla klonována do expresního plazmidu pET 100/D-TOPO[®]. K expresi defensinu byl použit IPTG, jehož konečná koncentrace dosáhla 1mM. Pokusy byla ověřována i 0.5 mM koncentrace IPTG, ale množství produkovaného proteinu bylo menší. Maximální produkce proteinu nastala během 3-4 hodin od počátku indukce exprese.

Analýzou aminokyselinového složení proteinu odvozeného z nukleotidové sekvence genu bylo zjištěno, že získaný protein je homologický s proteinem Def1, který byl izolován a

popsán u klíštěte *I. ricinus* (obrázek 11) (Rudenko, Golovchenko, Grubhoffer, nepublikovaná data). Def1 je indukován pouze ve střevě po infekci *B. burgdorferi* (Rudenko *et al.*, 2005).

```
tr      A0T093          Defensin [Ixodes ricinus (Sheep 74 AA
      A0T093_IXORI          tick)]          align

Score = 187 bits (425), Expect = 1e-46
Identities = 74/74 (100%), Positives = 74/74 (100%)

Query: 1  MKVLAVSLAFLLLIAGLISTSLAQNEEGGEKELVRRVRRGGYYCPFFQDKCHRHCRSFGRKA 60
      MKVLAVSLAFLLLIAGLISTSLAQNEEGGEKELVRRVRRGGYYCPFFQDKCHRHCRSFGRKA
Sbjct: 1  MKVLAVSLAFLLLIAGLISTSLAQNEEGGEKELVRRVRRGGYYCPFFQDKCHRHCRSFGRKA 60

Query: 61  GYCGGFLKKTICIV 74
      GYCGGFLKKTICIV
Sbjct: 61  GYCGGFLKKTICIV 74
```

Obrázek 11: Srovnání proteinových sekvencí získaného defensinu o velikosti 8231.76 kDa s Def1 u klíštěte *I. ricinus*.

Query: znázorňuje získanou sekvenci defensinu

Sbjct: znázorňuje sekvenci Def1

Podobnost sekvence získaného preprodefensinu *I. ricinus* s Def2 u *I. ricinus* byla 95%, s *I. scapularis* 57%, s *D. variabilis* 47%, s *B. microplus* 47% a s defensiny *O. moubata* od 41% po 52%.

Podobnost zralých peptidů *I. ricinus* a *I. scapularis* byla pouze 55%. Fylogenetická analýza komplexu *I. ricinus*, který zahrnuje *I. scapularis*, ukazuje, že *I. ricinus* a *I. scapularis* nejsou příbuzné druhy. Alignments zralého defensinu *I. scapularis* ukázalo nejvyšší podobnost 86.6% s *B. microplus* a nejmenší 44.7% s *A. hebraeum*, jen 55% podobnost s defensinem *I. ricinus* (Xu *et al.*, 2003). Tyto výsledky ukazují vysoký stupeň variability mezi klíštěcími defensiny, které jsou možná ovlivněny různými druhy mikrobů, s nimiž se setkaly jednotlivé druhy klíšťat během evolučního vývoje, stejně jako geografickou izolací.

Závěrem lze na základě výše uvedených výsledků shrnout, že klíšťata *I. ricinus* mají geny pro defensin, který je sekretován u tohoto druhu v reakci na infekci patogenem, ale jsou potřebné další studie pro zjištění, jestli jsou defensiny *I. ricinus* účinné proti *B. burgdorferi* a dalším mikrobiálním patogenům přenášených klíšťaty a pokud ano, tak za jakých podmínek, například samostatně nebo v kombinaci s dalšími indukovanými AMP, jako lysozym. Další studie jsou také nutné, pro zjištění tkání, které jsou zahrnuty do produkce, stejně tak rychlosti a udržitelnosti exprese defensinů. Nezbytná je také znalost celého spektra antimikrobiálních

peptidů zahrnující klíčící imunitní odpověď, stejně tak rozšíření studií o mechanismu působení takových peptidů. Tyto studie jsou důležité pro pochopení, proč některé klíčící druhy jsou schopnými vektory patogenů, zatímco další ne.

7. Závěr

Podařilo se izolovat, klonovat a osekvenovat gen kódující protein pro defensin *I. ricinus*. Po potvrzení sekvence a analyzování podobnosti se sekvencemi dostupnými v databázi GenBank bylo potvrzeno, že defensin *I. ricinus* patří do velké skupiny kationických antimikrobiálních peptidů. Defensin *I. ricinus* je produkován jako prepropeptid, který sdílí společné znaky defensinů hmyzu. Nejvyšší podobnost byla prokázána s defensinem *I. scapularis* na základě aminokyselinové sekvence a podobnost byla 57%. Izolovaný defensinový gen byl klonován do expresního vektoru pro tvorbu rekombinantního peptidu a další studie jeho antimikrobiální aktivity. Pilotní exprese klíčícího defensivu v prokaryotním systému ukázala, že exprese je patrná po 3 hodinách inkubace při teplotě 37°C s 1 mM IPTG.

8. Seznam literatury

Alberts B., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. 1998. Základy buněčné biologie. Espero publishing, s.r.o., Ústí nad Labem, str.315-327, 332-335.

Barbour A. G. 1988. Plasmid Analysis of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme Disease Agent. Journal of Clinical Mikrobiology 475-478.

Bartůněk P., M. Bojar, P. Calda, P. Diblík, J. Hančil, J. Herzogová, J. Hoza, D. Hulínská, D. Janovská, D. Pícha, M. Valešová. 2001. Lymeská borrelióza. 2. vyd., Grada Publishing, Praha.

Bartůňková J., M. Paulík a kol. 2005. Vyšetřovací metody v imunologii. 1. vyd., Grada publishing. Praha, str. 91-92.

Bednář M, V. Fraňková, J. Schindler, A. Souček, J. Vávra.1996. Lékařská mikrobiologie. 1. vyd., Marvil, Praha, 1996.

Bevins C.L. et al., 1996. Human enteric defensin genes: chromosomal map positron and a model for possible evolutionari relationships. Genomics 31: 95-106.

Boulanger N., R. Brun, L. Efret-Sabatier, C. Kunz, P. Bulet. 2002. Immuno peptides in the defense reactions of *Glossina morsitans* to bacterial and *Trypanosoma brucei* infections. Insect Biochemistry and Molecular Biology 32:369-375.

Boulanger N., C. Lowenberger, P. Volf, R. Ursic, L. Sigutova, L. Sabatier, M. Svobodova, S. M. Beverley, G. Späth, R. Brun, B. Pesson, P. Bulet. 2004. Characterization of a Defensin from the Sand Fly *Phlebotomus duboscqi* Induced by Challenge with Bacteria or the Protozoan Parasite *Leishmania major*. Infection and Immunity 7140-7146.

Bulet P., R. Stocklin, L. Menin. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunology Review 198:169-184.

Ceraul S. M., D. E. Sonenshine, R. E. Ratzlaff, W. L. Hynes. 2003. An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari:Ixodidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology 1099-1103.

Cociancich S., M. Goyffon, F. Bontems, P. Bulet, F. Bouet, A. Menez, J. Hoffmann. 1993. Purification and characterization of a skorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensin and scorpion toxins. Biochemical Biophysical Research Communication 15:17-22.

Dřevová H., Z. Kurzová, J. Plch, D. Hulínská. 2000. Vývojový cyklus klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) v laboratorních podmínkách. Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 9:455-456.

Ehret-Sabatier L., D. Loew, M Goyffon, P. Fehlbaum, J.A. Hoffmann, A. van Dorsseleer, P. Bulet. 1996. Characterization of novel cystein-rich antimicrobial peptides from scorpion blood. Journal of Biological Chemistry 271:29537-29544.

Fogaca A.C., D.M. Lorenzini, L.M. Kaku, E. Esteves, P. Bulet, S. Daffre. 2004. Cystein-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental and Comparative Immunology* 28:191-200.

Fraser C. M., S. Casjens, W.M. Huang, G.G. Sutton, R. Clayton, R. Lathringa, O. White, K.A. Ketchum, R. Dotson, E.K. Hickley, M. Gwinn, B. Dougherty, J.F. Tomb, R.D. Fleishmann, D. Richardson, J. Peterson, A.R. Kerlavage, J. Quackenbush, S. Salberg, M. Hanson, R. van Vugt, N. Palmer, M.D. Adams, J. Gocayne, J. Weidman, T. Utterback, L. Watthey, L. McDonald, P. Artiach, C. Bowman, S. Garland, C. Fuii, M.D. Citron, K. Horst, K. Roberts, B. Hatch, H.O. Smith, J.C. Center. 1997. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*, *Nature* 390:580-586.

Froy O., M. Gurevitz. 2003. Arthropod and mollusk defensins – evolution by exon-shuffling. *Trends in Genetics* 19:684-687.

Gillespie J.P., M.R. Kanost, T. Trenczek. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42:611-43.

Gudderra N. P., D. E. Sonenshine, C.S. Apperson, R.M. Roe. 2002. Hemolymph proteins in ticks. *Journal of Insect Physiology* 48:269-278.

Giudici A.M., M.C. Regente, L. de la Canal. 2000. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. *Plant Physiology and Biochemistry* 38:881-888.

Hancock R.E.W., G. Diamond. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Mikrobiologie* 8:402-410.

Hinnebusch J., A.G. Barbour. 1992. Linear- and Circular Plasmid Copy Numbers in *Borrelia Burgdorferi*. *Journal of Bacteriology* 5251-5257.

Hinnebusch J., A.G. Barbour. 1991. Linear Plasmids of *Borrelia burgdorferi* Have a Telomeric Structure and Sequence Similar to Those of a Eukaryotic Virus. *Journal of Bacteriology* 7233-7239.

Hubert F., T. Noe, P. Roch. 1996. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *European Journal of Biochemistry* 240:302-306.

Hynes W. L., S. M. Ceraul, S. M. Todd, K. C. Seguin, D. E. Sonenshine. 2005. A defensin-like gene expressed in the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. *Medical and Veterinary Entomology* 339-344.

Charles M., S. Chernysh, H. Philippe, C. Hetru, J.A. Hoffmann, P. Bulet. 1996. Innate immunity. Isolation of several cysteine- rich antimicrobial peptides from the blood of mollusk, *Mytilus edulis*. *Journal of Biological Chemistry* 271:21808-21813.

Cho W.L., T.F. Chiou, C.C. Chen. 1997. Molecular characterization of a defensin gene from the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27:351-358.

Janeway C.A.Jr.. 1998. Presidential address to the American Association of Immunologists. The road less traveled by: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Journal of Immunology* 161: 539-544.

Johns R., D. E. Sonenshine. 2001. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 857-865.

Kimmig P., D. Hassler, R. Braun. 2003. Klíšťata. Nepatrné kousnutí s neblahými následky. Pragma Hodkovičky, Praha.

Kraiczky P., G. Acker, V. Brade. 1999. Characteristics of the pathogen. v. P. Oschmann, P. Kraiczky, J. Halperin, V. Brade. 1999. Lyme Borreliosis and Tick-Borne Encephalitis. 1. vyd. UNI-MED, Bremen, str. 20-26.

Lai R., L. O. Lomař, J. Jonczy, P. C. Turner, H. H. Rees. 2004. Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from hemolymph of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *Biochemical Journal* 681-685.

Lowenberger C. 2001. Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 219-229.

Madigan M. T., J.M. Martinko, J. Parker. 2003. Brock Biology of Microorganisms. 10. vyd., Pearson education, Inc., Upper Saddle River, NJ 07458.

Matsuyama K., S. Natori. 1988. Molecular cloning of cDNA for sapecin and unique expression of the sapecin gene during the development of *Sarcophaga peregrina*. *Journal of Biological Chemistry* 263:17117-17121.

Mitta G., F. Hubert, E.A. Dyrzynda, P. Boundry, P. Roch. 2000. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Developmental and Comparative Immunology* 24:381-393.

Munks R.J., J.V. Hamilton, S.M. Lehane, M.J. Lehane. 2001. Regulation of midgut defensin production in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Insect Molecular Biology* 10:561-571.

Nagaoka I. et al. 2000. Synergistic action of antibacterial neutrophil defensin and athelcidins. *Inflammation Research* 49: 73-79.

Nakajima Y., A. van der Goes van Naters-Yasui, D. Taylor, M. Yamakawa. 2001. Two isoforms of member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31:747-751.

Nakajima Y., A. van der Goes van Naters-Yasui, D. Taylor, M. Yamakawa. 2002. Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. *Insect Molecular Biology* 11:611-618.

- Nakajima Y., S.-S. Hisako, D. Taylor, M. Yamakawa.** 2003. Up-regulated humoral immune response in the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Parasitology Research* 91:476-481.
- Nakajima Y., D. Taylor, M. Yamakawa.** 2003. Involvement of antibacterial peptide defensin in tick midgut defense. *Experimental and Applied Acarology* 28:135-140.
- Nakajima Y., J. Ishibashi, F. Yukuhiro, A. Azalka, D. Taylor, M. Yamakawa.** 2003. Antitubercular activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subject* 125-130.
- Papáček M., V. Matěnová, J. Matěna, T. Soldán,** 2000. *Zoologie*. Nakladatelství Scientia, Praha.
- Paskenwitz S.M., B.M. Christensen.** 1996. Immune response of vectors. v: B.J. Beaty, W.C. Marquard. *The biology of disease vectors*. University Press of Colorado 371-392.
- Postic D., M. Garnier, G. Baranton.** 2007. Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates – Description of *Borrelia californiensis* sp. Nov., and genomospecies 1 and 2. *Journal of Medical Microbiology* (v tisku) www. sciencedirect.com doi: 10.1016/j.ijmm.2007.01.006
- Purser J. E., S. J. Norris.** 2000. Correlation between plastid content and infectivity in *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A.* 97:13865-13870.
- Richman A.M., P. Bulet, C. Hetru, C. Barillas-Mury, J.A. Hoffmann, F.C. Kafalos.** 1996. Inducible immune factors of the vector mosquito *Anopheles gambiae*: biochemical purification of the defensin antibacterial peptide and molecular cloning of preprodefensin cDNA. *Insect Molecular Biology* 5:203-210.
- Richman A.M., G. Dimopoulos, D. Seeley, F.C. Kafatos.** 1997. *Plasmodium* activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitos. *The EMBO Journal* 16:6114-6119.
- Roháčová H.** 2005. *Lymeská borelióza*, Maxdorf, Praha.
- Rosický B., V. Černý, M. Daniel, F. Dusbábek, P. Palička, K. Samšínák.** 1979. Roztoči a klíšťata škodící zdraví člověka. *Academia, Praha*. str. 41-46.
- Rudenko N., M. Golovchenko, M. J. Edwards, L. Grubioffer.** 2005. Differential Expression of *Ixodes ricinus* Tick Genes Induced by Blood Feeding or *Borrelia burgdorferi* Infection. *Journal of Medical Entomology* 42:36-41.
- Ryšavý B., Ž. Černá, J. Chalupský, I. Orszách, J. Vojtek.** 1989 *Základy parazitologie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha, str. 216.
- Schafer C., M. Hahn, P. Oschmann.** 1999. Tick ecology and epidemiology. v: P. Oschmann, P. Kraiczy, J. Halperin, V. Brade. 1999. *Lyme Borreliosis and Tick-Borne Encephalitis*. 1. vyd., UNI-MED, Bremen, str. 30-34.

Schwan T.G., J. Piesman, W. T. Golde, M. C. Dolan, P. A. Rosa. 1995. Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* dutiny tick Frediny. Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A. 2909-2913.

Schwan T.G., J. Piesman. 2000. Temporal Changes in Outer Surface Proteins A and C of the Lyme Disease-Associated Spirochete, *Borrelia burgdorferi*, during the Chain of Infection in Ticks and Mice. Journal of Clinical Microbiology 38: 382-388.

de Silva A. M., E. Fikrig. 1997. Perspectives Series:Host/Pathogen Interactions. Journal of Clinical Investigation 377-379.

Sonenshine D. E., S. M. Ceraul, W. E. Hynes, K. R. Macaluso, A. F. Azad. 2003. Expression of defensin – like peptides in tick hemolymph and midgut in response to challenge with *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Experimental and Applied Acarology 28:127-134.

Sonenshine D. E., W. L. Hynes, S. M. Ceraul, R. Mitchell, T. Benzine. 2005. Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. Experimental and Applied Acarology 36:207-223.

Steere A. C., J. Coburn, L. Glickstein. 2004. The emergence of Lyme disease. Journal of Clinical Investigation 113:1093-1101.

Steere A. C.. 2006. Lyme borreliosis in 2005, 30 years after initial observations in Lyme Connecticut. Wiener Klinische Wochenschrift 22:625-633.

Tsutsumi-Ishii Y. et al. 2000. Role of CCAAT/ enhancer-binding protein site in transcription of human neutrophil peptide-1 and-3 defensin genes. Journal of Immunology 164, 3264-3273.

Valenzuela J.G., I.M. Francischetti, V.M. Pham, M.K. Garfield, T.N. Mater, J.M. Ribeiro. 2002. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. Journal of Experimental Biology 205:2843-2864.

Varkey J, S. Singh, R. Nagaraj. 2006. Antibacterial aktivty of linear peptides spanning the carboxy-terminal β -sheet domain of arthropod defensin. Peptides 2614-2623.

Wang G., A. P. van Dam, I. Schwarz, J. Dankert. 1999. Molecular Tyliny of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato:Taxonomic, Epidemiological, and Clinical Implications. Clinical Microbiology Review 12:633-653.

Xu Y., R. C. Johnson. 1995. Analysis and Comparison of Plastid Profile sof *Borrelia Burgdorferi* Sensu Lato Strains. Journal of Clinical Mikrobiology 2679-2685.

