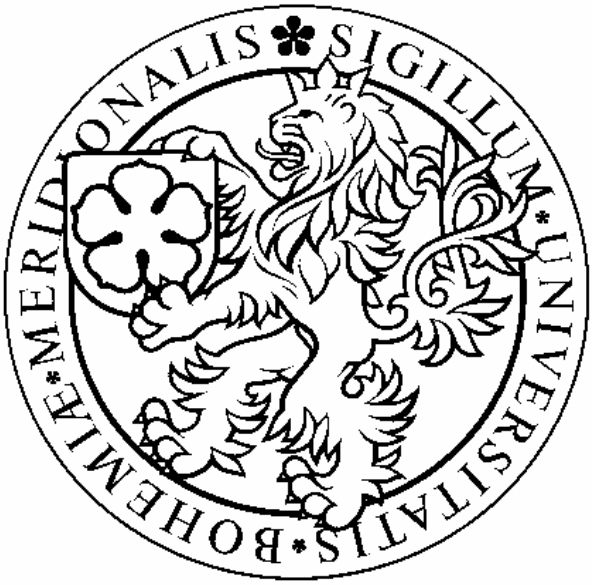
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY

KATEDRA MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A BIOCHEMIE



Charakterizace cystatinu z klíštěte *Ixodes ricinus*

JAN PERNER

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Lenka Grunclová, Ph.D.

2008

Bakalářská práce

Perner J., 2008: Charakterizace cystatinu z klíštěte *Ixodes ricinus*. [Characterization of cystatin in the tick *Ixodes ricinus*. Bachelor Thesis, in Czech] – 34 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: In numerous organisms, proteases and their proteinaceous inhibitors constitute a major defence mechanism. As vectors are in constant touch with pathogens their proteolytic activity is of crucial importance. In *Ixodes ricinus* (IR), the main vector of Lyme disease in Europe, the midgut cells process bloodmeal particles as well as provide a major barrier to a pathogen invasion. Tick salivary secretion plays a indispensable role in both bloodmeal completion and inadvertant pathogen transmission. This thesis describes 3 IRcystatins, cysteine protease inhibitors, using standard biochemical and molecular protocols. Moreover, this work provides evidence that cystatin 3 is likely to be involved in gut processes. This study also highlights recent knowledge on tick physiology during blood-feeding.

Tato práce byla financována z grantu číslo 206/06/0865 od Grantové agentury České republiky a z Výzkumného centra 06009.

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

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

V Českých Budějovicích 30. dubna 2008:

Poděkování

Chci poděkovat panu Petru Kopáčkovi za odborné vedení mé práce v laboratoři. Dále děkuji Lence Grunclové za pečlivé vedení mé bakalářské práce, za její trpělivost a ochotu mi kdykoli pomoci. Chtěl bych poděkovat Veronice, Danovi a Zdeňkovi za pomoc při práci v laboratoři. Děkuji výše zmíněným a všem ostatním lidem z laboratoře za vlídnou badatelskou atmosféru. Chci poděkovat i Petrovi Frantovi a Evě Šourkové za pomoc s korekturou textu. Obrovský dík patří mým rodičům, prarodičům a mé drahé polovičce Verunce za jejich bezmeznou podporu při mém studiu. Nemalý dík patří i mým kamarádům spolubydlícím za přátelskou atmosféru při psaní této bakalářské práce a za jejich cenné kritické názory.

Obsah:

1. Úvod 5

2. Literární přehled

2.1. Klíštěcí střevo a trávení 6

2.2. Klíštěcí imunita 7

2.3. Slinné žlázy a přenos patogenů 8

2.4. Chemická podstata cystatinů 10

2.5. Cystatiny v neklíštěcích organizmech 10

2.6. Klíštěcí cystatiny 11

3. Materiál a metody

3.1. Klíšťata a pitva tkání 13

3.2. Izolace totální RNA 13

3.3. Tvorba cDNA 13

3.4. Amplifikace DNA (PCR) 13

3.5. Izolace genu pro cystatiny 13

3.6. DNA klonování a sekvenace 14

3.7. Tkáňový profil transkripce 14

3.8. Transkripční kinetika 14

3.9. Exprese rekombinantního IRcystatinu 14

3.10. Izolace inkluzních tělísek z bakteriální kultury 15

3.11. Purifikace proteinu 15

3.12. Refolding 16

3.13. Příprava primárních protilátek a western blot 16

3.14. Měření inhibiční aktivity 16

4. Výsledky

4.1. Optimalizace podmínek exprese rekombinantního IRcystatinu 18

4.2. Tkáňový profil transkripce 20

4.3. Sáním indukovaná transkripce IRcystatinu 20

4.4. Tkáňový expresní profil 21

4.5. Důkaz inhibiční aktivity IRcystatinu proti papainu 22

4.6. Identifikace, lokalizace a sekvenace dvou dalších cystatinů z *I. ricinus* . 23

5. Diskuse 27

6. Literatura 31

1. Úvod

Ixodes ricinus je hematofágní roztoč z čeledi Ixodidae. Je významným vektorem arbovirů, spirochét a některých protozoí. Zástupci čeledi Ixodidae střídají ve svém životním cyklu tři hostitele, na kterých sají několik dní. Střevo je k tomu přizpůsobeno specifickým intracelulárním trávením, tzv. heterofágie. Slinné žlázy umožňují sekrecí slin dlouhodobé sání na hostitelovi.

Klíštěcí střevo neobsahuje extracelulární trávicí enzymy. Střevo slouží hlavně jako zásobárna nasáté krve. K trávení dochází ve vakuolách epiteliálních střevních buněk (Sonenshine, 1991). Díky absenci trávicích enzymů poskytuje klíštěcí střevo pohostinné prostředí pro patogeny, které jsou nasáté s hostitelskou tkání.

Orgánem důležitým pro interakci host-parazit jsou slinné žlázy. Ve slinných žlázách klíšťat dochází k sekreci slin, které jsou během sání uvolňovány do hostitele. Sliny obsahují pestrý koktejl protisrážlivých, protizánětlivých a imunomodulačních látek. Touto cestou se dostávají patogeny do hostitele.

Cílem této práce je charakterizovat cystatin(y) v klíštěti *I. ricinus*. Cystatiny jsou inhibitory cysteinových proteáz. Proteázy se vyskytují u živočichů ve funkci „house keeping“ proteinů při katabolizmu peptidických složek. Účastní se i mnohých „sofistikovaných“ biologických dějů: prezentace antigenu, metastáze, tělní imunita, buněčná smrt, aj. (Vray et al., 2002). Proteázy parazitů hrají klíčovou roli v invazi do hostitelské tkáně (McKerrow et al., 2006). Cystatiny jsou důležitými regulačními molekulami těchto proteáz.

U klíšťat se cystatiny účastní střevních aktivit a ovlivňují hostitelský imunitní systém. Om-cystatiny inhibují funkci střevních proteáz u klíšťáka *Ornithodoros moubata* (Grunclová et al., 2006). Cystatiny klíštěte *Ixodes scapularis* jsou uvolňovány spolu se slinami do těla hostitele, kde působí protizánětlivě a také v něm zpomalují proliferaci cytotoxických T-lymfocytů, což umožňuje dlouhodobé sání klíšťat s. s. (Kotsyfakis et al., 2006).

V této práci jsou prezentovány výsledky klonování a exprese IRcystatinu (cystatin z klíštěte *I. ricinus*). Byla zkoumána jeho inhibiční aktivita proti papainu (cysteinová proteáza příbuzná s lysozomálními cysteinovými proteázami z klíštěcího střeva). Byla pozorována závislost transkripce na tkáňové distribuci a pozitivní korelace transkripční aktivity s dobou sání. Navíc byly identifikovány další dva cystatiny v klíštěti *I. ricinus*.

2. Literární přehled

2.1. Klíštěcí střevo a trávení

V klíštěcím střevě dochází k intracelulárnímu trávení nasáté krve a do lumen střeva nejsou tedy sekretovány žádné trávicí enzymy. Klíšťata tráví v trávicích vakuolách epiteliálních střevních buněk a lumen střeva funguje jako zásobárna krve. Nepřítomnost trávicích enzymů v lumen střeva usnadňuje vývoj patogenů ve střevě. Klíštěcí střevo je důležitým místem vývoje patogenů a tvoří hlavní fyzickou bariéru mezi klíštětem a hostitelským obranným mechanizmem (Agyei et Runham, 1995). Trávicí ústrojí všech klíšťat je velmi podobné. Stává se z předního střeva (sající pharynx a oesophagus), středního střeva (ventrikulus s mnoha slepými výběžky – caeca) a zadního střeva (rectum). K trávení dochází jen ve středním střevě (Coons et Alberti, 1999).

Celé sání začíná upevněním klíštěte do hostitele pomocí chelicerát a ozubeného hypostomu. Klíšťata čeledi Ixodidae sají po dobu 5 – 15 dnů. Období sání je u těchto klíšťat rozděleno do tří fází:

1) „přípravná fáze k sání“ trvá první dva dny, kdy se samička zacementuje v místě sání;
2) „pomalá fáze sání“ trvá následných 4 – 8 dní, kdy samička pomalu zvětšuje svůj objem; v této fázi dochází k páření;
3) během „rychlé fáze sání“, tj. cca 24 hodin, samička zvětší svůj objem asi desetkrát a pak odpadává od hostitele;

Během přípravné fáze samička naruší krevní cévky hostitele, dojde k vylití krve a vytvoří se kalužka krve, z které saje, tzv. telmofágie. Proto bývají klíšťata nazývána „pool feeders“ (komáři sají přímo z cév, tzv. solenofágie). Střevní epitel klíštěcí samičky je celý potažen trávicími buňkami (Sonenshine, 1991). Střevní epitelové buňky se kromě trávení také účastní jiných fyziologických aktivit, jako je např. vitelogeneze (Sonnenshine, 1991). Klíšťata čeledi Ixodidae tráví krevní obsah pinocytózou, receptory zprostředkovanou endocytózu a fagocytózou (Coons et Alberti, 1999).

Krev poskytuje bohatý zdroj proteinů. Proteiny pronikají trávicím systémem beze změny jejich struktury a bez ztráty jejich funkce (Jeffers et Michael Roe, 2008). Nasáté IgG jsou schopny projít stěnou klíštěcí střevní stěny do hemocoelu beze ztráty funkce protilátky (Chinzei et Minoura, 1987). Proteiny jsou schopny se dostat přes trávicí stěnu a migrovat do slinných žláz (Valenzuela et al., 2002). Inhibitory proteáz by mohly být důležitými faktory ovlivňující tento přenos proteinů skrz trávicí systém (Jeffers et Michael Roe, 2008).

Trávením hemoglobinu se uvolňuje velké množství toxického hemu do trávicích buněk. Molekuly hemu jsou transportovány do specializovaných organel – hemozomů, kde vytváří

nekrystalické agregáty (Lara et al., 2003). Hematofágní hmyz naopak vytváří krystalickou strukturu, hemozoin (Oliveira et al., 1999). Pokud se v trávicí buňce nahromadí hemozomy, tato buňky se uvolní ze střevního epitelu do lumen střeva, kde jsou součástí fekálního materiálu. Zde mohou prasknout a uvolnit svůj obsah do lumen střeva (Coons et Alberti, 1999).

2.2. Klíštěcí imunita

Klíštěcí obranu proti patogenům vytváří, stejně jako u ostatních bezobratlých, nespecifická imunita. K identifikaci mikrobiálních patogenů jsou využívány většinou živočichů „Pattern recognition receptors“ (PRR) (Beck et Habicht, 1996). Několik PRR bylo popsáno u klíšťat: Dorin M (Kovář et al., 2000), OMFREP (Rego et al., 2005) a Omgalectin (Huang et al., 2007). Dorin M byl prvním identifikovaným a popsaným klíštěcím lektinem.

Lektiny jsou u klíšťat exprimovány v hemolymfě. Účastní se obranných reakcí klíštěte a přenosu patogenů (Grubhoffer et al., 2004). Lektiny se účastní imunitních reakcí konzervovanými metodami agregace patogenu a jeho opsonizace pro fagocytózu. Lektiny zřejmě hrají důležitou roli ve vstupu patogenu do slinných žláz, a tak mohou být důležitou molekulou ve slinných žlázách *I. ricinus* při přenosu virů TBE (tick borne encephalitis) nebo *Borrelia burgdorferi* (Grubhoffer et al., 2004).

Možnost určitého druhu klíštěte působit jako vektor záleží na schopnosti patogenu přežít ve střevě klíštěte, překonat střevní bariéru a dostat se do slinných žláz. U klíšťat se vyvinul silný imunologický arzenál k boji proti těmto patogenům. Ochranný systém vytváří, kromě fyzických a epiteliálních bariér, antimikrobiální peptidy (AMPs), reaktivní formy kyslíku (ROS) (Pereira et al., 2001) a enkapsulace (Eggenberger et al., 1990).

AMPs tvoří u bezobratlých hlavní obrannou linii proti patogenům. Několik skupin AMPs bylo izolováno u klíšťat:

Inhibitory proteáz

Cystatiny a serpiny, inhibitory cysteinových a serinových proteáz, inhibují proteázy nasátých patogenů. Ixodidin, inhibitor serinových proteáz, inhibuje růst *Escherichia coli* a *Micrococcus luteus* u klíštěte *Boophilus microplus* (Fogaça et al., 2006). α_2-makroglobulin je protein schopný inaktivovat široké spektrum proteáz v klíštěti *O. moubata* (Kopáček et al., 2000; Saravanan et al., 2003).

Lysozymy

Lysozym hydrolyzuje β-1,4-glykosidickou vazbu mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminem v peptidoglykanové buněčné stěně G^+ bakterií. Lysozym ve střevě samice klíštěte *O. moubata* (Kopáček et al., 1999) se silně exprimuje po nasátí (Grunclová et al., 2003). Ke zvýšené transkripci genu pro lysozym dochází po injikaci kultury *E. coli* do klíštěte *Dermacentor variabilis* (Simser et al., 2004). Lysozymy tak hrají důležitou roli v nespecifických imunitních odpovědích klíšťat s. l.

Defensiny

Defensiny se účastní imunitního systému celé řady organizmů. Defensiny jsou malé peptidy, 15–20 aa, se 6–8 cysteinovými zbytky. Většina defensinů perforuje buněčně stěny mikrobů. Tato perforace vede k úniku iontů a buněčné lýze. V hemolymfě a střevě klíštěte *O. moubata* byly popsány první klíštěcí defensiny. Exprese těchto defensinů je stimulována sáním (Nakajima et al., 2001; Nakajima et al., 2002). V čeledi Ixodidae jsou defensiny popsány u klíštěte *D. variabilis* (Johns, 2001). Po vystavení střeva přítomnosti různých bakterií překvapivě došlo ke zvýšení exprese defensinu pouze v hemolymfě a nikoli ve střevě klíštěte *D. variabilis* (Sonenshine et al., 2005). Ačkoli defensiny klíštěte *D. variabilis* samotné nejsou dostatečně účinné proti populaci *B. burgdorferi*, klíštěcí defensin spolu s lysozymem zabijí výrazně více *B. burgdorferi* (Johns et al., 2001). Defensiny byly popsány v klíštěti *I. ricinus* pouze ve střevní tkáni, kde je navíc jejich tanskripční aktivita silně indukována sáním (Rudenko et al., 2005). Geny pro defensin z *I. ricinus* mají intron/exonovou strukturu a navíc se tento defensin vyskytuje ve dvou izoformách (Rudenko et al., 2007).

Hemoglobinové fragmenty

Trávením krevního hemoglobinu vznikají peptidy s antimikrobiálním účinkem (Sonenshine et al., 2005). Hemoglobinové fragmenty ve střevě klíštěte *B. microplus* mají antifungální a antiG^+ aktivitu (Fogaça et al., 1999).

2.3. Slinné žlázy a přenos patogenů

U klíšťat se vyvinul důmyslný aparát, jak se během sání vyhnout hostitelskému imunitnímu systému, srážení krve, vasokonstrikci a indukci bolesti či svědění.

Derivát kyseliny arachidonové, prostacyclin (Ribeiro et al., 1988) a prostagladnin E_2 (Ribeiro et al., 1985), jsou vasodilatačními molekulami klíštěte *I. scapularis*.

Nejvíce prostudovaným antikoagulantem je klíštěcí protisrážlivý peptid (TAP), izolován ze slin *O. moubata* (Waxman et al., 1990). TAP je specifickým inhibitorem FXa. Faktor X, trombokináza, je endopeptidáza štěpící protrombin za vzniku aktivní molekuly trombinu. FXa je aktivní forma faktoru X (FX). FXa je také inhibováno molekulou Salp 14 izolované ze slin *I. scapularis* (Narasimhan et al., 2002).

Farmakologicky aktivní spektrum látek, které během sání uvolňuje klíště do hostitele, účinně a specificky ovlivňuje fyziologii hostitele v místě sání (Ribeiro, 1995). Tím je umožněn přenos patogenů, tzv. saliva-activated transmission (SAT). SAT je fenomén, který zvýhodňuje patogen při přenosu slinami. Poprvé byl tento jev pozorován u leishmánií, kdy *Leishmania major* je v přítomnosti lyzátu slinných žláz více infekční (Titus et Ribeiro, 1988). Sliny klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* zvyšují přenos Thogoto viru (Jones et al., 1989). Sliny klíštěte rodu *I. scapularis* inhibují funkci neutrofilů jako je degranulace, produkce ROS, aj. (Ribeiro et al., 1990).

B. burgdorferi je přenášena slinami během klíštěcího sání. V nenasátých nymfách a dospělcích *I. ricinus* jsou spirochéty přítomny ve střevě. Během sání putují do slinných žláz, ze kterých jsou slinami přeneseny do hostitele. Přenos spirochét do obratlovčího hostitele začne až po nějaké době po přisátí klíštěte *I. ricinus*. Efektivita přenosu roste s dobou sání (Kahl et al., 1998). *B. burgdorferi* je adaptována na přenos z členovce do savce preferenční genovou expresí. Borélie exprimují outer surface protein A (OspA) ve střevě klíštěte *I. scapularis*. Exprese genu OspA je pro *B. burgdorferi* životně důležitá k přežití v klíštěcím střevě. OspA deficientní spirochéty nejsou schopny přežít ve střevě klíštěte *I. scapularis* a nejsou schopny se navázat na klíštěcí střevo (Yang et al., 2004). Navázání spirochét na OspA receptor (TROSPA) v klíštěcím střevě je zásadní pro kolonizaci *B. burgdorferi* v *I. scapularis* (Pal et al., 2004). Gen pro OspB exprimovaný v *B. burgdorferi* je také zásadní pro adhezi spirochét na klíštěcí střevo a pro jejich přežití uvnitř klíštěte (Neelakanta et al., 2007). Snížení exprese OspA dovoluje spirochétám opustit klíštěcí střevo a indukuje expresi genu pro OspC (Schwan et Piesman, 2002).

Přítomnost protilátek anti-OspC v obratlovčím hostiteli snižuje schopnost migrace spirochét ze střeva klíštěte do slinných žláz (Gilmore et Piesman, 2000). *Borrelia afzelii* s potlačenou expresí OspC není schopna se rozšířit ve slinných žlázách *I. ricinus* (Fingerle et al., 2002). To potvrzuje funkci OspC umožňující migraci borélií ze střeva do slinných žláz klíštěte. Migraci borélií ze střeva do slinných žláz přežije méně než 5 % (Coleman et al., 1997). To ukazuje na silnou imunitní obranu klíštěte. Její mechanizmy nejsou zatím jasné.

Během sání klíštěte dojde odebráním vody a iontů k zakoncentrování nasáté krve. Voda a ionty putují do hemocoelu a do slinných žláz, kde tvoří základ pro tvorbu slin (Cupp, 1991). Až 70% vody a iontů je vráceno slinami zpět do hostitele (Bowman et Sauer, 2004). Průchodnosti vody do hemocoelu napomáhají aquaporiny popsány u klíštěte *D. variabilis* (Holmes et al., 2008). Slinné žlázy jsou tedy hlavním osmoregulačním orgánem klíšťat.

2.4. Chemická podstata cystatinů

Cystatiny jsou peptidické inhibitory cysteinových proteáz a dělí do tří rodin podle aminokyselinových sekvencí:

1. *stefiny:* neglykosylované, cca 11 kDa, bez signální sekvence, bez disulfidických můstků, intracelulární;
2. *cystatiny*: neglykosylované, 13 – 14 kDa, se signální sekvencí, dva disulfidické můstky na C-konci, sekretované;
3. *kininogeny:* glykosylované, 3 cystatinové domény, s disulfidickými můstky, sekretované;

2.5. Cystatiny v neklíštěcích organizmech

Cystatiny v rostlinách a obratlovcích

Cystatiny byly poprvé izolovány z bílku slepičího vajíčka. Tento kuřecí cystatin je detailně prozkoumán a slouží jako modelová molekula v rámci cystatinové superrodiny.

Cystatiny v rostlinách regulují zpracování proteinových molekul a účastní se obranných mechanizmů proti herbivornímu hmyzu a patogenům (Pernas et al., 1998). Cystatiny a cysteinové proteázy se účastní mechanizmů apoptózy v rostlině *Arabidopsis thaliana* (Belenghi et al., 2003).

Cystatiny v parazitech

Parazitická nematoda žijící v trávicím traktu nebo v tkáních hostitele jsou neustále vystavena kontaktu s imunitními mechanizmy hostitele. Jednou ze strategií jak se vypořádat s hostitelskou imunitou je sekrece imunomodulačních látek, jakými jsou například cystatiny. Cystatiny parazitů regulují jak endogenní, tělu vlastní, proteázy během svlékání a trávení, tak i exogenní, hostitelovy, imunologicky relevantní proteázy. Během koevoluce parazita a hostitele mohly cystatiny parazitů získat tuto druhotnou funkci imunomodulačních molekul. Identifikace adaptací cystatinů k parazitizmu byla pozorována porovnáním schopností inhibice cysteinových proteáz a imunologických vlastností mezi cystatiny volně žijícího *Caenorhabditis elegans* a

cystatinů z parazitů *Acanthocheilonema viteae* a *Onchocerca volvulus* (Schierack et al., 2003). V této práci byla prokázána schopnost inhibice cathepsinu B u parazitických i neparazitických cystatinů. Pouze u cystatinů parazitů byla pozorována výrazná schopnost snížit proliferaci mononukleárních buněk periferní krve (PBMC) a myších slezinných buněk. Zatímco cystatiny parazitů značně zvýšily produkci interleukinu 10, cystatiny *C. elegans* zvýšily produkci interleukinu-12 a interferonu-γ v lidských PBMC. Z těchto rozdílných schopností cystatinů regulovat hostitelský imunitní systém usuzuje Schierack et al. (2003), že parazitické cystatiny se v evoluci specificky diverzifikovaly k těmto imunomodulačním vlastnostem a odlišují se tedy od cystatinů z neparazitických živočichů.

Cystatiny se vyskytují i v parazitických protistech. Cruzipain (také znám jako cruzain) je cysteinová proteáza, která způsobuje hlavní proteolitickou aktivitu u *Trypanosoma cruzi* (McKerrow et al., 2006). Chagasin, inhibitor cysteinových proteáz z *T. cruzi*, snižuje proteolytickou aktivitu cruzipainu, která je zásadní pro diferenciaci parazita a jeho invaze do savčích buněk (Santos et al., 2005).

2.6. Klíštěcí cystatiny

Klíštěcí cystatiny hrají důležitou roli v regulaci trávení, obranných mechanizmů klíštěte a imunitního systému hostitele v místě sání. Cystatin identifikovaný v klíštěti *I. scapularis*, sialostatin L, snižuje specifickou imunitu hostitele snížením proliferace T lymfocytů. Sialostatin L je sekretován do slin klíštěte *I. scapularis*. Přítomnost sialostatinu L ve slinách klíštěte *I. scapularis* umožňuje inhibovat lidský cathepsin L (Kotsyfakis et al., 2006). Tyto výsledky nasvědčují schopnosti klíštěcích cystatinů inhibovat proteázy lidského fagolysozomu během zpracování antigenu. Dalším cystatinem z *I. scapularis* je sialostatin L2. Transkripce sialostatinů stoupá s dobou sání. Sialostatiny mají díky své schopnosti ovlivnit hostitelovu proteolytickou aktivitu v místě infestace zásadní vliv na úspěšnost sání klíštěte *I. scapularis* (Kotsyfakis et al., 2007).

U klíštěte *Amblyomma americanum* byla pomocí dsRNA potlačena exprese cystatinů ve střevě a slinných žlázách. To vedlo k výraznému snížení schopnosti klíšťat sát a k ovlivnění imunity hostitele. Opětovné vystavení králíka klíštěcímu sání po předchozím sání RNAi klíšťat vedlo ke snížené schopnosti sání (Karim et al., 2005). Také tyto výsledky ukazují schopnost klíštěcích cystatinů narušovat normální hostitelovu prezentaci antigenu.

Cystatin z klíštěte *Haemaphysalis longicornis* (Hlcyst-2) inhibuje růst kultury *Babesia bovis*. Exprese Hlcyst-2 je stimulována sáním a inokulací LPS (lipopolysacharid). Zvýšená exprese Hlcyst-2 je pozorována i u larev klíštěte *H. longicornis* nakažených prvokem *Babesia*

gibsoni (Zhou et al., 2006). Toto pozorování naznačuje přímou souvislost mezi klíštěcími cystatiny a nespecifickou imunitou klíštěte.

Cystatin z klíštěte *B. microplus* se exprimuje v tukovém tělese a ve vaječníkách. Ve vaječníkách se může účastnit regulace endogenní proteolýzy během embryogeneze tím, že zabraňuje předčasné degradaci vitelinu (Lima et al., 2006). Exprese Om-cystatinu 1 a Om-cystatinu 2 (cystatiny v *O. moubata*), roste s dobou sání. Gen pro Om-cystatin 1 je transkribován zejména ve střevě a Om-cystatin 2 ve střevě, slinných žlázách i vaječníkách (Grunclová et al., 2006). Om-cystatiny se podle výsledků této studie podílejí na procesech trávení a sání klíštěte *O. moubata*.

Sekvence cystatinu v *I. ricinus* byla zveřejněna pod přístupovým číslem AJ547803 (GenBank).

3. Materiál a metody

3.1. Klíšťata a pitva tkání

Samice *I. ricinus* byly krmeny na morčatech a chovány při teplotě 24^{o}C, vzdušné vlhkosti 96 % a fotoperiodě odpovídající 49^{o} severní šířky.

Vypreparované tkáně byly promývané ve fyziologické pufru-PBS (phosphate buffered saline) a následně přesunuty do roztoku RNAlater^{TM} nebo PBS.

3.2. Izolace totální RNA

Tkáně (střevo, slinné žlázy, vaječníky, malpighiho trubice a tracheje) samice klíštěte *I. ricinus* 5 dní po nasátí byly homogenizovány v mikrozkumavce pomocí plastového homogenizátoru v TRI Reagent^{TM} roztoku (Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 ml na 50 – 100 mg čerstvé tkáně. Homogenát byl centrifugován 16 000 g/10 min/4^{o}C. Supernatant obsahující RNA byl převeden do nové mikrozkumavky, kde byla izolace dále prováděna dle protokolu TRI Reagent^{TM}. Kvalita výsledné totální RNA byla ověřena elektroforeticky na TBE agarózovém gelu. Koncentrace RNA byla zjištěna z naměřené absorbance při λ = 260 nm.

3.3. Tvorba cDNA

RNA izolována z tkání *I. ricinus* byla přidána do jednotlivých reakcí tak, aby jejich finální koncentrace byla 0,2 μg/μl. cDNA byla syntetizována pomocí oligo $(dT)_{23}$ primerů kitu Enhanced Avian HS RT-PCR Kit (Sigma).

3.4. Amplifikace DNA (PCR)

Vybrané úseky DNA byly amplifikované pomocí PCR při teplotě annealingu t = 55^{o}C, pomocí Taq DNA polymerázy (Invitrogen). PCR produkty byly rozdělovány na 1% agarózovém gelu s EtBr při U = 100 V, t = 35 min.

3.5. Izolace genu pro cystatiny

Amplifikace byla provedena pomocí gen-specifických primerů pro IRcystatin (*I. ricinus*), sialostatinu L (*I. scapularis*) a sialostatin L2 (*I. scapularis*) (Tab. 1). Jako templát byly použity cDNA z tkání střev a slinných žláz samic klíštěte *I. ricinus* 5 dní po nasátí. PCR produkty byly izolovány z 1% agarózového gelu pomocí QIAquick® Gel Extraction Kit (250) (Qiagen).

Tab. 1. Primery použité pro amplifikaci cystatinů

inhibitor:	IRcystatin	sialostatin L	sialostatin L2
GenBank	AJ547803	AF483724	DQ066048
sense	5´-GGA CAG AAC CCG AGA TGA GTA TCG-3´	5´-CTT CGC TTT GGT CCT TCT G-3´	5´-GGA ACT CGC CCA CTA CGC TAC G-3´
antisense	5´-CAG ACG GCA GCC TTT GAG ACC-3´	5´-CAT TCC CAG AAA TAA AGG TT-3´	5´-CTT GCA GGT TCC GGT AAA TGA CA-3´

3.6. DNA klonování a sekvenace

PCR produkty byly zaklonovány do pCR® 2.1-TOPO® vektoru podle TOPO TA Cloning® manuálu (Invitrogen). Konstrukty byly transformovány heat shock metodou do One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Kolonie se správně zaklonovaným inzertem byly selektovány modro-bílým screeningem. Z vybraných kolonií byly izolovány plazmidy pomocí Plasmid Miniprep Spin Kit/250 (GENOMED). Inzerty byly sekvenovány v obou směrech pomocí M13 R a M13 F primerů.

Vzorky DNA byly sekvenovány v laboratoři genomiky (Biologické cenrum AVČR, v.v.i., České Budějovice) pomocí sekvenátoru Applied Biosystems 3130xl (HITACHI).

3.7. Tkáňový profil transkripce

Pomocí PCR byly amplifikovány IRcystatiny z cDNA z jednotlivých tkání (střevo, slinné žlázy, vaječníky, malpighiho trubice a tracheje) samice klíštěte *I. ricinus* 5 dní po nasátí. PCR byla specifikována primery pro IRcystatin (Tab. 1) a jako templátová kontrola byla použita detekce mRNA transkriptu pro feritin (Kopáček et al., 2003).

3.8. Transkripční kinetika

Pro detekci transkripční kinetiky IRcystatinu byly využity mRNA ze střevní tkáně a ze slinných žláz z nenasátých, 1 den sajících, 3 dny sajících, 5 dnů sajících a 7 dní sajících samic klíštěte *I. ricinus*. Finální množství jednotlivých mRNA použitých pro přepis do cDNA bylo sjednoceno na m = 0,062 µg. RT-PCR byla provedena podle protokolu Enhanced Avian HS RT-PCR Kit (Sigma). PCR byla specifikována primery pro IRcystatin (Tab. 1) a jako templátová kontrola byla použita detekce mRNA transkriptu pro feritin (Kopáček et al., 2003).

3.9. Exprese rekombinantního IRcystatinu

K expresi rekombinantního cystatinu byl využit bakteriální expresní systém *E. coli* (Champion™ Directional Expression Kit, Invitrogen). Fúzní cystatin s 6His-tag na N-konci byl připraven pomocí expresního vektoru pET100. Inzert byl připraven pomocí primerů pro IRcystatin: sense: 5´-CAC CCC CGG GAT CTG GAG GAG GCA C-3´ a antisense (Tab. 1). Jako templát byla použita střevní cDNA částečně nasátých samic klíštěte *I. ricinus*. Expresní konstrukt byl transformován do buněk TOP10 (Invitrogen) a sekvenován pomocí

sekvenovacích primerů T7 a T7 Reverse. Takto ověřený konstrukt byl transformován do buněk *E. coli* BL21 Star™ (DE3) One Shot® Chemically Competent *E. coli*. Exprese byla provedena dle protokolu Champion™ pET Expression System. Po 0,5mM (finální koncentrace) IPTG indukci byla kultura inkubována po dobu 6 h, při 200 rpm, 37°C. Bakteriální kultura byla stočena při 3500 rpm/15 min/4°C a pelet skladován při −20°C.

3.10. Izolace inkluzních tělísek z bakteriální kultury

Bakteriální pelet byl rozpuštěn v Pufru 1 (Tab. 2), sonikován na ledě po dobu 4×45 s a centrifugován při 13 000 rpm/10 min/4°C. Pelet byl rozpuštěn v Pufru 2 (Tab. 2). Vzniklá suspenze byla sonikována na ledě 3×30 s a následně centrifugována při 13 000 rpm/10 min/4°C. Přečištění pomocí Pufru 2 bylo jednou opakováno. Výsledný pelet byl rozpuštěn v Pufru 3 (Tab. 2) při pokojové teplotě a následně centrifugován při 13 000 rpm/25 min/4°C. Supernatant byl filtrován skrz 0,22µm filtr Millex®GP (Millipore).

Tab. 2. Složení izolačních pufrů

Pufr 1	Pufr 2	Pufr 3
20mM Tris-Cl	20mM Tris-Cl 2M močovina 0,5M Nacl 10mM imidazol 2% Triton® X-100	20mM Tris-Cl 6M guanidin hydrochlorid 10mM imidazol 1mM merkaptoetanol (βME)
pH = 8	pH = 8	pH = 8

3.11. Purifikace proteinu

Fúzní protein s 6His-tag byl purifikován z rozpuštěných inkluzních tělísek na Ni^{2+} chelátové koloně v přítomnosti 8M močoviny. V druhém purifikačním postupu byla v prvních dvou pufrech 8M močovina nahrazena 6M guanidin hydrochloridem (GuHCl) (Tab. 3).

Tab. 3. Složení purifikačních pufrů

Pufr 1	Pufr 2	Pufr 3	Pufr 4
8M močovina (6 M GuHCl) 20mM NaH_2PO_4 0,5M NaCl	8M močovina (6 M GuHCl) 20mM NaH_2PO_4 0,5M NaCl	8M močovina 20mM NaH_2PO_4 0,5M NaCl	8M močovina 20mM NaH_2PO_4 0,5M NaCl 0,5M imidazol
pH = 7,9	pH = 6	pH = 5,3	pH = 7,8

Průběh chromatografie byl monitorován spektrofotometricky při λ = 280 nm. V přítomnosti 6M GuHCl byl průběh chromatografie monitorován pomocí dot blot analýzy na

nitrocelulózové membráně (NC) (Biometra®). Na NC membránu bylo naneseno 5 µl z každé frakce. Membrána s nanesenými vzorky se 2×1 min propláchla v odbarvovacím roztoku (10 % kys. octová, 25 % metanol, 65 % voda) a poté byla barvena amidočerní po dobu 3 min a následně vložena na 2 min do odbarvovacího roztoku. Vybrané frakce z obou postupů purifikace byly ověřeny pomocí SDS-PAGE na gradientovém polyakrylamidovém gelu (4% – 17,5%), při U = 100 – 200 V, v přítomnosti elektroforetického pufru: 25mM Tris, 192mM glycin, 0,1% SDS.

3.12. Refolding

Postupná renaturace probíhala pomocí dialýzy v jednotlivých dialyzačních roztocích (Tab. 4), které byly střídány v 12h intervalech. Dialýza byla prováděna přes dialyzační střevo VISKING® (Serva).

Tab. 4. Složení dialyzačních roztoků

1. dialyzační roztok	2. dialyzační roztok	3. dialyzační roztok	4. dialyzační roztok
4M močovina 0,4M L-Arginin 0,15M NaCl 20mM βME	2M močovina 0,4M L-Arginin 0,15M NaCl 20mM βME	Ø 0,4M L-Arginin 0,15M NaCl 20mM βME	20mM Tris-Cl
pH = 7,5 V = 0,5 l	pH = 7,5 V = 0,5 l	pH = 7,5 V = 0,5 l	pH = 7,5 V = 2 l

3.13. Příprava primárních protilátek a western blot

Polyklonální sérum bylo získáno opakovanou imunizací králíka purifikovaným rekombinantním IRcystatinem (Kopáček et al., 2003).

Proteiny homogenátu střevní tkáně částečně nasátých samic *I. ricinus*, homogenizovaných slinných žláz a rekombinantní IRcystatin byly rozděleny pomocí redukční SDS-PAGE. Rozdělené proteiny byly přeneseny pomocí elektrického proudu na NC membránu. Antigeny byly detekovány anti-IRcyst primárními protilátkami a jako sekundární protilátky byly využity SwAR/Px (Sevapharma a.s.). Výsledek byl vizualizován v 0,1M Tris-Cl (pH = 7,5) pomocí 0,6% 3, 3´-diaminobenzidinu a 3% H_2O_2.

3.14. Měření inhibiční aktivity

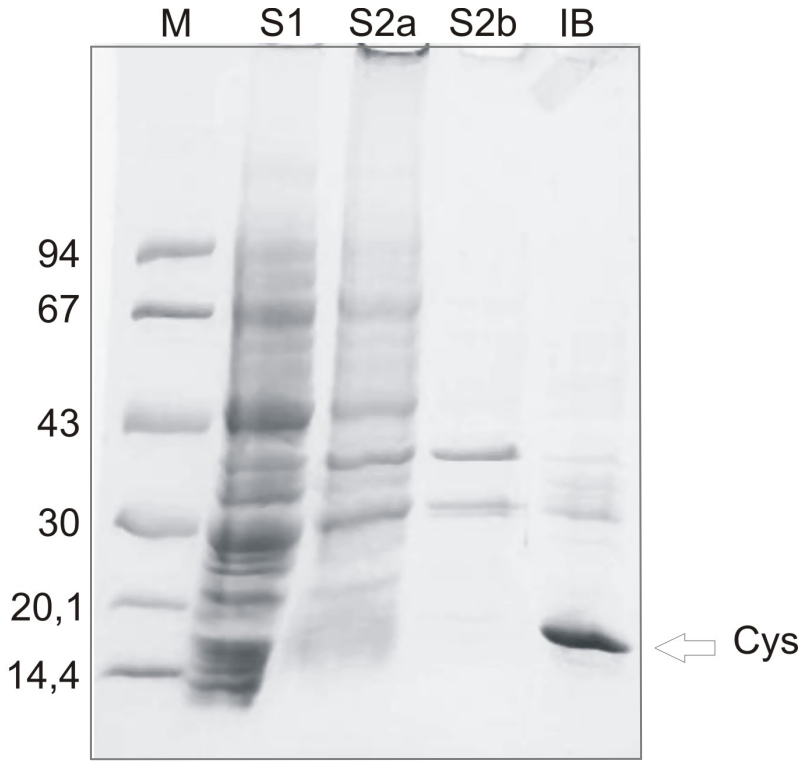
Inhibiční schopnost cystatinu byla stanovena fluorometricky proti proteolytické aktivitě papainu (Sigma, P-4762). Jako substrát byl využit syntetický peptid Z-Phe-Arg-7-amino-4-metylkumarin (Z-F-R-AMC). Proteolytická aktivita byla měřena uvolněním fluorescentní značky AMC ze Z-F-R-AMC. Reakce byla prováděna v černých plochých 96 jamkových

destičkách za použití Infinite M200 fluorimetru (TECAN) s excitačním světlem λ = 360 nm a emisním světlem λ = 465 nm. Reakce byla prováděna v reakčním pufru (pH = 5,5): 21,6 ml 0,1M kyselina citronová, 28,4 ml 0,2M Na_2HPO_4, 2,5mM dithiotreitol (DTT) a doplněno H_2O do 100 ml. 50 µl IRcystatinu o koncentraci 62 µg/ml bylo vyředěno dvojkovou řadou v reakčním pufru. K sériově ředěnému IRcystatinu bylo přidáno 50 µl papainu o koncentraci 0,1 µg/ml a byly inkubovány 10 min při pokojové teplotě. Hydrolýza byla odstartována přidáním 50 µl 10µM fluorescenčního substrátu (ředěn v dimetylsulfoxidu). Pro kontrolu byl cystatin nahrazen stejným objemem reakčního pufru. V negativní kontrole byl nahrazen enzym a inhibitor stejným objemem reakčního pufru.

4. Výsledky

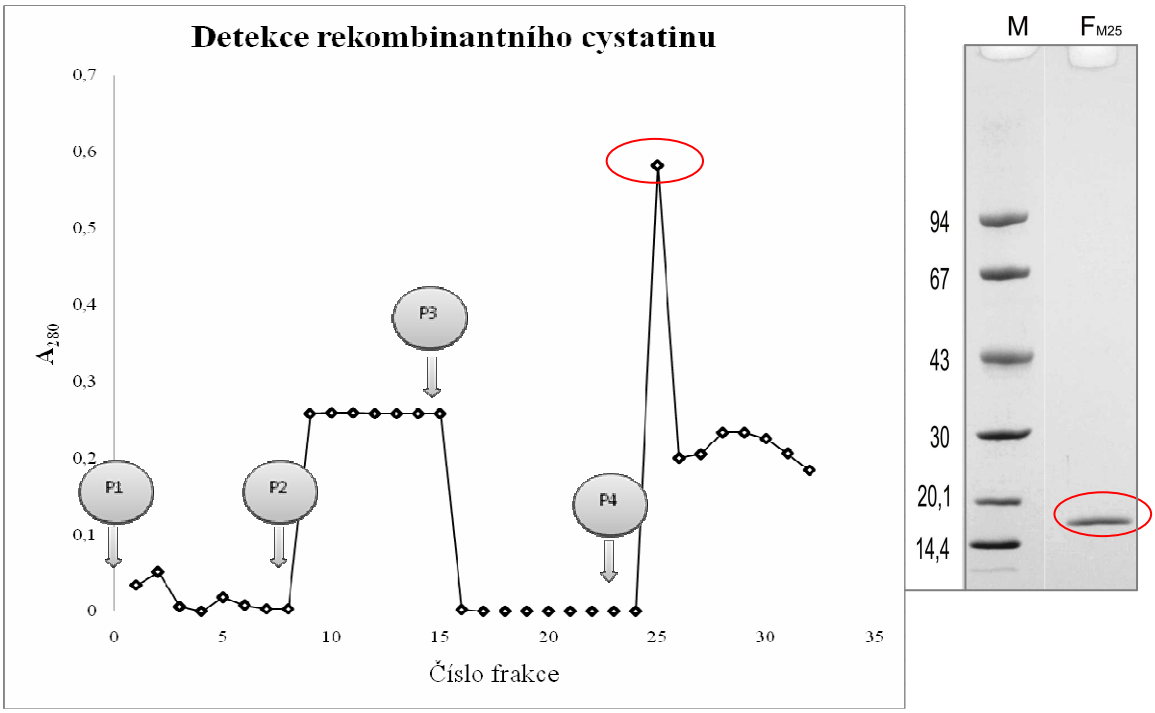
4.1. Optimalizace podmínek exprese rekombinantního IRcystatinu

Rekombinantní IRcystain byl exprimován v bakteriálním systému *E. coli*. Bylo využito expresního systému do cytoplazmy *E. coli*. V prvním kroku byly izolovány rozpustné cytoplazmatické proteiny. V přítomnosti detergentu Triton® X-100 a 2M močoviny byly ve dvou krocích izolovány membránové proteiny. Z výsledného peletu byla izolována nerozpustná inkluzní tělíska (Obr. 1), která byla rozpuštěna v 6M GuHCl.



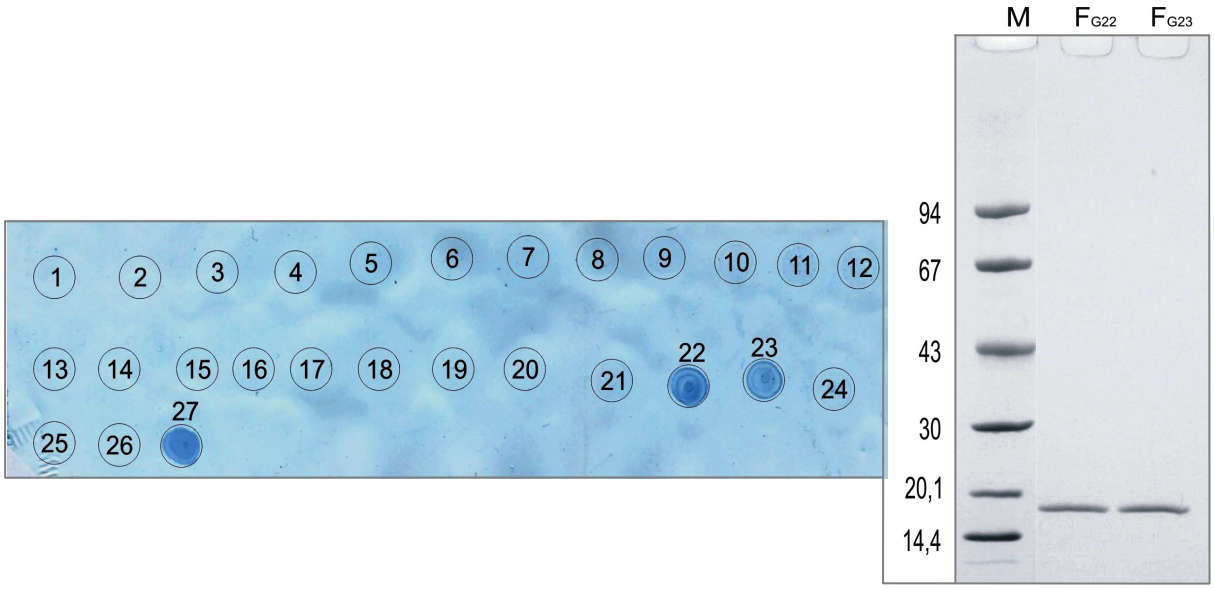
Obr. 1. SDS-PAGE jednotlivých izolačních frakcí
Agregace nadměrně exprimovaného IRcystatinu do inkluzních tělisek. Hodnoty molekulové hmotnosti markeru (M) jsou uvedeny v kDa. S1 – cytoplazmatické proteiny, S2a & S2b – membránové proteiny, IB – inkluzní tělíska. Molekulová hmotnost IRcystatinu (Cys) s 6His-tag je 15,9 kDa (protein calculator v3.3);

Rozpuštěná inkluzní tělíska byla purifikována chelátovou chromatografií využívající afinity 6His-tagu k Ni^{2+}. IRcystatin purifikovaný v přítomnosti 8M močoviny byl detekován spektrofotometricky (Obr. 2). Pro detekci IRcystatinu purifikovaného v 6M GuHCl nebylo možné použít spektrofotometrický monitoring kvůli jeho absorpci světla o vlnové délce λ = 280 nm, a proto byl průběh chromatografie monitorován pomocí dot blot analýzy (Obr. 3). Vybrané frakce z obou chromatografií byly ověřeny pomocí SDS-PAGE (Obr. 2 a 3).



Obr. 2. Rekonstrukce chromatogramu purifikace v 8M močovině

Průběh grafu ukazuje hodnoty absorbance při λ = 280 nm v závislosti na koncentraci proteinů v dané frakci. P1–P4 ukazují v jaké době (frakci) byly zavedeny dané pufry (Tab. 3). Po aplikaci P4, obsahující imidazol, byl rekombinantní cystatin uvolněn z afinitní kolony a frakce byla ověřena pomocí SDS-PAGE (IRcystatin označen červenou elipsou):M – marker, F_{M25} – frakce číslo 25 obsahující rekombinantní IRcystatin;

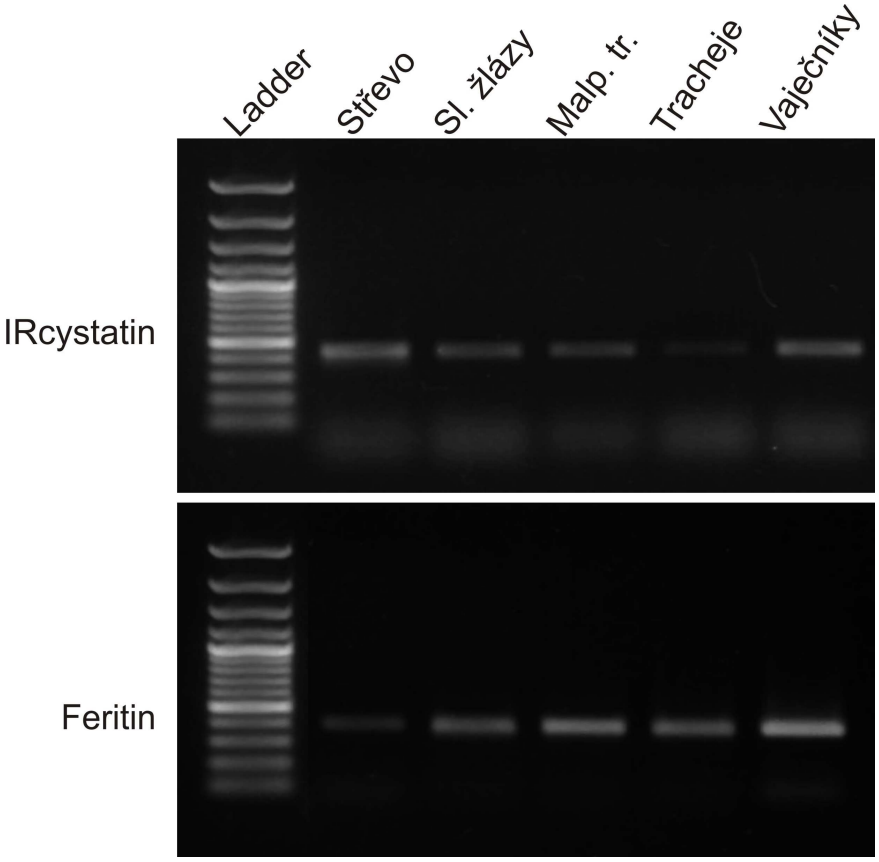


Obr. 3. Monitoring purifikace v 6M GuHCl

Na NC membránu byly naneseny jednotlivé frakce z purifikace pomocí 6M GuHCl. Po nanesení vzorků byla membrána obarvena amidočerní. Pozice 1–26: chromatografické frakce, pozice 27: startovní materiál (kontrola). Frakce 22 a 23 obsahují purifikovaný IRcystatin, ověřeno pomocí SDS-PAGE: M – marker, F_{G22} – frakce číslo 22, F_{G23} – frakce číslo 23;

4.2. Tkáňový profil transkripce

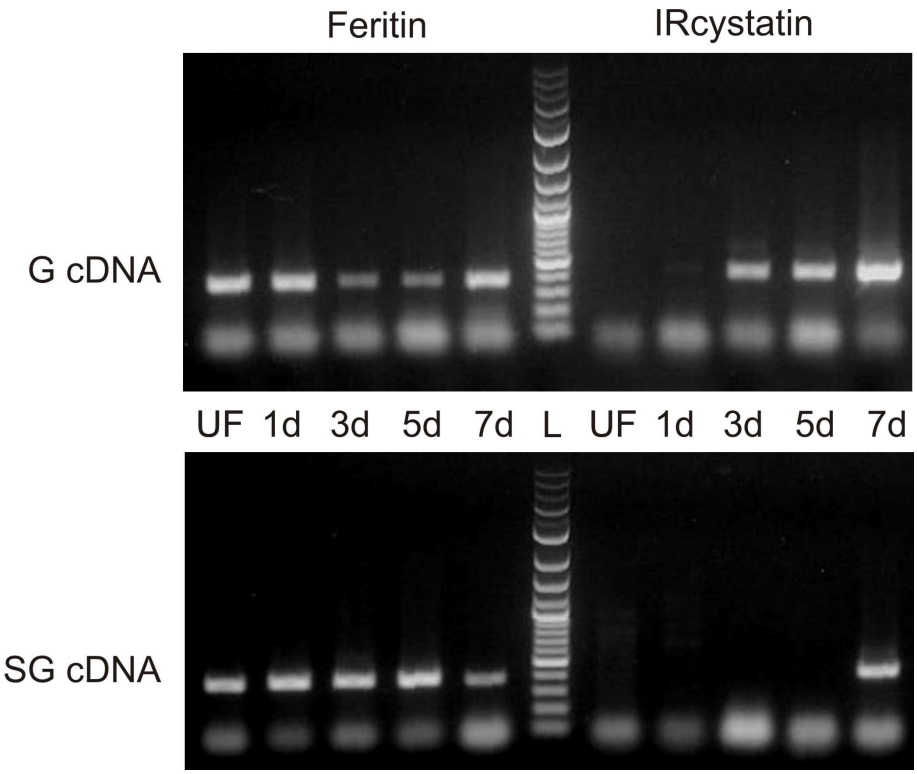
Ke zjištění tkáňového profilu bylo použito RT-PCR (Obr. 4). K transkripci IRcystatinu dochází ve střevě, slinných žlázách, malpighiho trubicích, trachejích a vaječníkách klíštěte *I. ricinus*. Jako templáty pro amplifikaci IRcystatinu byly použity cDNA z jednotlivých tkání klíštěte *I. ricinus*.



Obr. 4. RT-PCR analýza tkáňového profilu transkripce genu pro cystatin
mRNA IRcystatinu je přítomna ve všech uvedených tkáních. mRNA byla detekována pomocí reverzní transkripce. Ladder – 100 bp marker; feritin slouží jako templátová kontrola;

4.3. Sáním indukovaná transkripce IRcystatinu

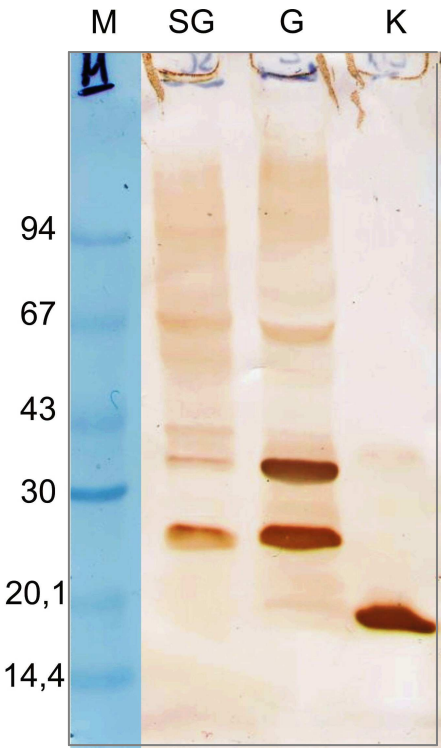
Pomocí RT-PCR specifikované primery pro IRcystatin (Tab. 1) byla detekována přítomnost mRNA transkriptu pro IRcystatin v závislosti na době sání (Obr. 5). Transkripční aktivita IRcystatinu ve střevě klíštěte *I. ricinus* začíná po prvním dni sání a dále stoupá s dobou sání. K transkripci IRcystatinu ve slinných žlázách klíštěte *I. ricinus* dochází sedmý den sání. U nenasátých klíšťat nebyl IRcystatin přítomen ani ve střevní tkáni, ani ve slinných žlázách.



Obr. 5. Kinetika transkripce IRcystatinu během sání
L – 100 bp marker, UF – nenasátá klíšťata, 1d – jeden den sání, 3d – tři dny sání, 5d – pět dní sání, 7d – sedm dní sání; G cDNA – střevní cDNA z dané doby sání, SG cDNA – cDNA slinných žláz z dané doby sání; feritin slouží jako templátová kontrola;

4.4. Tkáňový expresní profil

Na homogenátu slinných žláz a střev ze samic klíštěte *I. ricinus* pět dní po nasátí se nepodařilo pomocí western blot analýzy detekovat tkáňový IRcystatin s očekávanou molekulovou hmotností (Obr. 6). Vysoká afinita protilátek byla pozorována ve slinných žlázách, a hlavně ve střevní tkáni, k proteinu o molekulové hmotnosti 26 kDa a 36 kDa. Pro kontrolu byl použit rekombinantní IRcystatin, který má molekulovou hmotnost 15, 9 kDa (včetně 6His-tag).

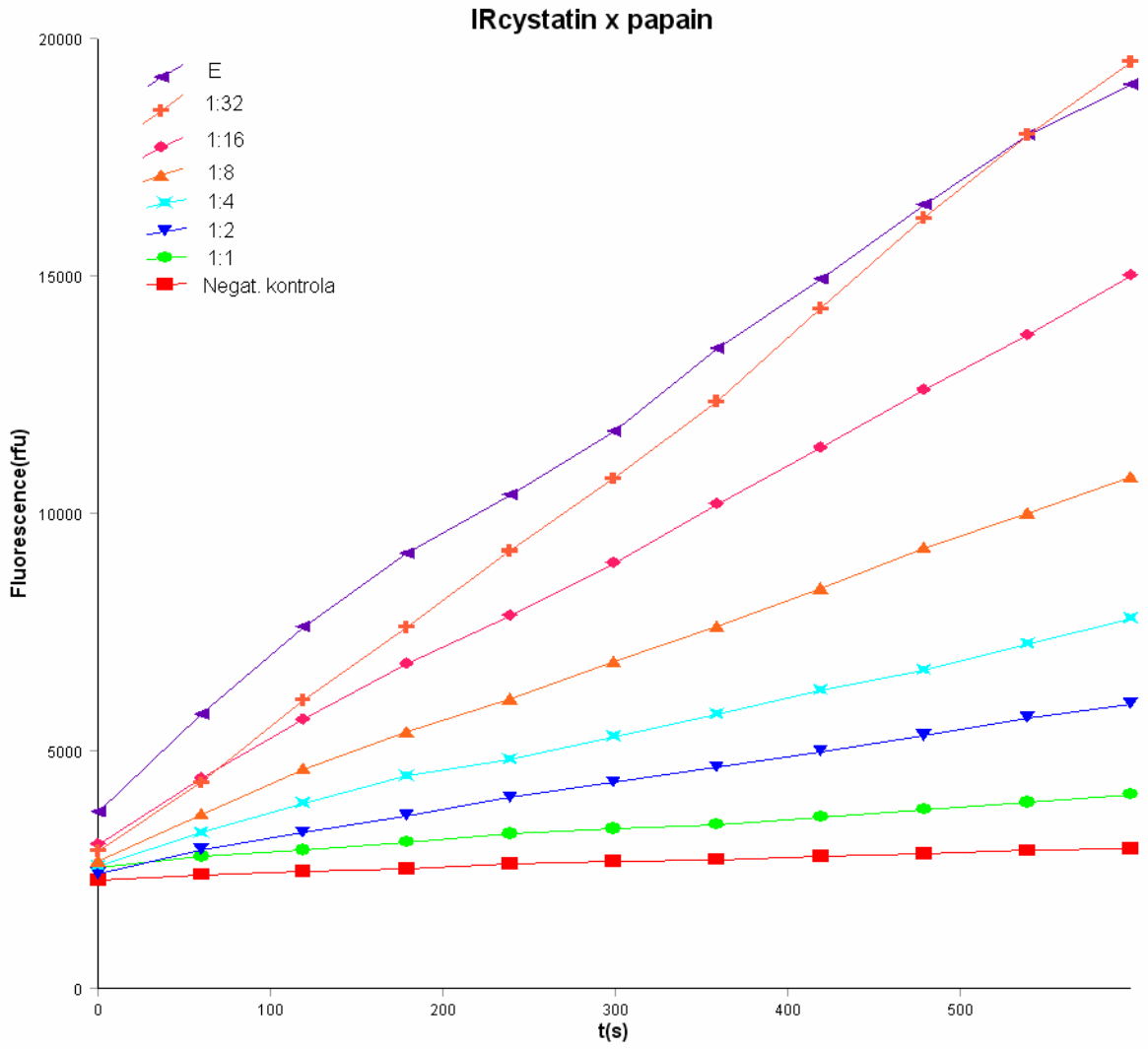


Obr. 6. Lokalizace exprese IRcystatinu pomocí western blot analýzy
Imunodetekce rekombinantního IRcystatinu, 26 kDa a 36 kDa proteinů. M – marker (amidočerň); SG – slinné žlázy; G – střevo; K – rekombinatní IRcystatin;

4.5. Důkaz inhibiční aktivity IRcystatinu proti papainu

Inhibiční schopnost cystatinu byla ověřena proti rostlinnému papainu v časovém úseku deseti minut (Obr. 7). Cysteinové proteázy papainového typu jsou nejpočetnějšími mezi cysteinovými proteázami. Tato rodina se skládá z papainu a dalších příbuzných rostlinných proteáz a lysozomálních cathepsinů B, H, L, C a K (Berti et Storer, 1995).

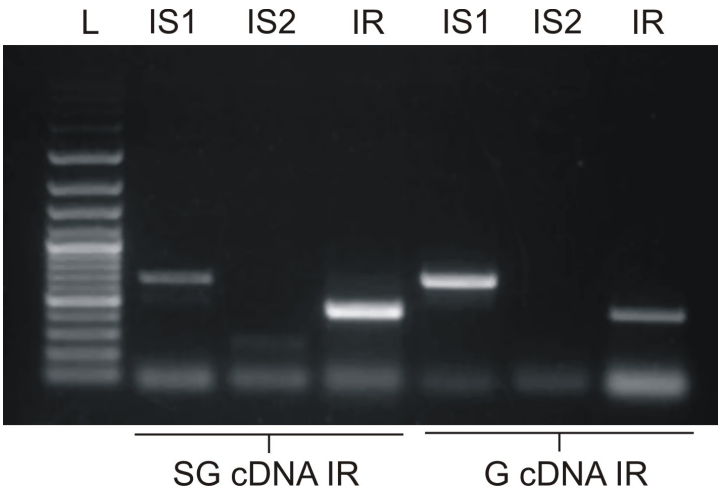
Na obrázku 7 je ukázáno, že IRcystatin je schopen do určité míry inhibovat katalytickou funkci papainu. Jeho inhibiční schopnost je přímo úměrná koncentraci. Pro ekvimolární interakci inhibitoru a enzymu je potřeba o 2 – 3 řády vyšší koncentrace inhibitoru než enzymu. To naznačuje, že je jen část cystatinových molekul je správně renaturována.



Obr. 7. Inhibiční aktivita rekombinantního IRcystatinu
Měření proteolytické aktivity papainu v závislosti na koncentraci cystatinu. Katalytická aktivita papainu byla měřena pomocí odštěpení fluorogenní značky (7-amino-4-metylkumarin) ze syntetického peptidu Z-F-R-7-amino-4-metylkumarin. E – papain a substrát v reakčním pufru; poměry koncentrací jsou ve formě I:E (koncentrace papainu je ve všech reakčních směsích stejná); Negat. kontrola – reakční pufr se substrátem.

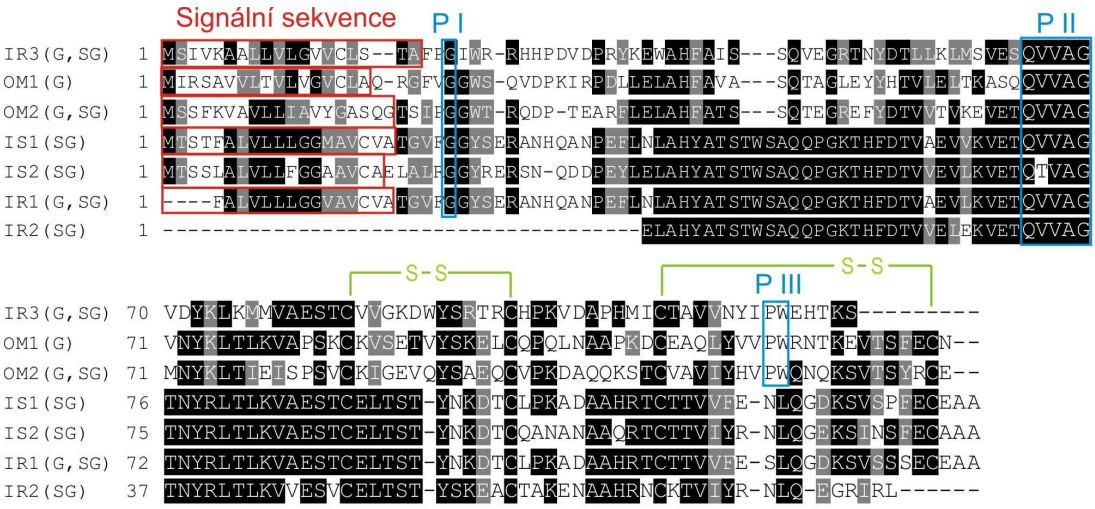
4.6. Identifikace, lokalizace a sekvenace dvou dalších cystatinů z *I. ricinus*

Pomocí PCR s primery navrženými podle cystatinů z klíštěte *I. scapularis*, sialostatin L a sialostatin L2,(Tab. 1) byly v cDNA slinných žláz klíštěte *I. ricinus* identifikovány dva další možné cystatiny. Cystatin detekovaný IS1 primery se vyskytuje i ve střevní cDNA klíštěte *I. ricinus* (Obr. 8).



Obr. 8. Detekce tří cystatinů v cDNA klíštěte *I. ricinus*
L – 100 bp marker; IS1 – primery pro sialostatin L, IS2 – primery pro sialostatin L2, IR – primery pro IRcystatin; SG cDNA IR – cDNA ze slinných žláz klíštěte *I. ricinus*, G cDNA IR – cDNA ze střeva klíštěte *I. ricinus*;

Sekvenací PCR produktů byly určeny zřejmě jako homologní geny sialostatinu L (IS1) a sialostatinu L2 (IS2) v klíštěti *I. ricinus*. Číslování názvů cystatinů bylo zachováno tak, jak je u klíštěte *I. scapularis* (Kotsyfakis et al., 2007). Porovnání parciálních nukleotidových sekvencí cystatinu 1 z *I. scapularis* a *I. ricinus* vykazuje shodu 99 % (Obr. 10). Sekvence cystatinu 2 z *I. scapularis* a *I. ricinus* je shodná z 82 % (Obr. 11). Cystatin z klíštěte *I. ricinus* (GenBank AJ547803), doposud nazývaný jako IRcystatin, je pojmenován cystatin 3. U všech tří cystatinů z klíštěte *I. ricinus* jsou zachovány domény vázající papain (Obr. 9).



Obr. 9. Porovnání aminokyselinové sekvence klíštěcích cystatinů
Částečné sekvence nově identifikovaných cystatinů klíštěte *I. ricinus*, IR1 a IR2, byly porovnány (ClustalW) se známými sekvencemi cystatinů klíšťat *I. ricinus*, IR3 (GenBank AJ547803), *I. scapularis*, IS1 (GenBank AF483724) a IS2 (GenBank DQ066048) a *O. moubata* OM1 (GenBank AY521024) a OM2 (GenBank AY547735). Pravděpodobné místo odštěpení signální sekvence bylo určeno programem SignalP 3.0. P I–III jsou konzervované sekvence proteinů cystatinové superrodiny umožňující interakce s cysteinovými proteázami, tzv. papain-binding domains (Hof et al., 1997). Naznačeny jsou disulfidické můstky;

Cystatin 1

A)

```
IR1  1    CTTCGCTTTGGTCCTTCTGCTCGGCGGCGTGGCAGTCTGTGTCGCCACGGGAGTTTTCGG  60
          ||||||||||||||||||||||||||||■|||||||||||||||||||||||||||||||
IS1  1    CTTCGCTTTGGTCCTTCTGCTCGGCGGCATGGCAGTCTGTGTCGCCACGGGAGTTTTCGG  60

IR1  61   AGGCTACAGCGAGAGGGCGAACCACCAAGCCAACCCGGAGTTTCTGAACCTGGCTCACTA  120
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IS1  61   AGGCTACAGCGAGAGGGCGAACCACCAAGCCAACCCGGAGTTTCTGAACCTGGCTCACTA  120

IR1  121  CGCGACTTCGACTTGGTCCGCTCAGCAGCCCGGCAAAACTCACTTCGACACCGTAGCTGA  180
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IS1  121  CGCGACTTCGACTTGGTCCGCTCAGCAGCCCGGCAAAACTCACTTCGACACCGTAGCTGA  180

IR1  181  GGTGCTCAAAGTAGAGACGCAGGTTGTTGCTGGAACCAACTACAGACTGACGCTCAAGGT  240
          ||||■||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IS1  181  GGTGGTCAAAGTAGAGACGCAGGTTGTTGCTGGAACCAACTACAGACTGACGCTCAAGGT  240

IR1  241  CGCAGAGTCGACCTGCGAACTCACGTCCACGTACAACAAGGACACCTGCCTACCCAAAGC  300
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IS1  241  CGCAGAGTCGACCTGCGAACTCACGTCCACGTACAACAAGGACACCTGCCTACCCAAAGC  300

IR1  301  AGACGCGGCGCACAGGACTTGCACGACTGTCGTTTTCGAGAGCCTGCAGGGAGACAAGTC  360
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||■|||||||||||||||
IS1  301  AGACGCGGCGCACAGGACTTGCACGACTGTCGTTTTCGAGAACCTGCAGGGAGACAAGTC  360

IR1  361  CGTCAGCTCCTCCGAGTGTGAAGCCGCATAGAAGTCCAGCTGTCTTATTGACCCTCCATT  420
          |||||||■|||■|||||||||||||||||||||||||||||||■|||||||||||||||
IS1  361  CGTCAGCCCCTTCGAGTGTGAAGCCGCATAGAAGTCCAGCTGTC-TATTGACCCTCCATT  419

IR1  421  GTTTGTCACGTGATGATTGCATCGTCTTCGATTGCTTCTCGTTGCTTTCTGTCTCGTCCT  480
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IS1  420  GTTTGTCACGTGATGATTGCATCGTCTTCGATTGCTTCTCGTTGCTTTCTGTCTCGTCCT  479

IR1  481  CTTGGGGCGAACTTATTTTGTCATTCGTGACAATATGACACGTATACGGGCTCAATCGTC  540
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IS1  480  CTTGGGGCGAACTTATTTTGTCATTCGTGACAATATGACACGTATACGGGCTCAATCGTC  539

IR1  541  TTCTAGACGAGAAGAGGTGTTTGTTGTGGCCTGGTCGCGTTTTTTTAGCAGCCTTAACGA  600
          ||||||||■|||||■|■|■||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IS1  540  TTCTAGACAAGAAGGGTTTTTTGTTGTGGCCTGGTCGCGTTTTTTTAGCAGCCTTAACGA  599

IR1  601  CTTCGGTCGAACATGTTTTGCAAGGGTGGAGGTGCAAATAAACCTTTATTTCTGGGAATG  660
          |||■||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
IS1  600  CTTTGGTCGAACATGTTTTGCAAGGGTGGAGGTGCAAATAAACCTTTATTTCTGGGAATG  659
```

B)

Obr. 10. Porovnání nukleotidových sekvencí dvou cystatinů IR1 a IS1

A) Porovnání parciálních nukleotidových sekvencí homologních cystatinů z *I. ricinus* a *I. scapularis*. Nesouhlas v sekvenci – černé kostky, červeně – primery, modře – domény vázající papain I a II;

B) Zobrazení zatím známé sekvence IR1; červeně – primery, modře – domény vázající papain I a II s jejich přepisem do aminokyselinové sekvence, A a AS – sense a antisense primer;

Cystatin 2

A)

```
IR2  1    GAACTCGCCCACTACGCTACGTCCACTTGGTCCGCCCAGCAGCCAGGCAAAACCCACTTC  60
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||■|||||||■|||||■||■||||||
IS2  1    GAACTCGCCCACTACGCTACGTCCACTTGGTCCGCTCAGCAGCCCGGCAAGACTCACTTC  60

IR2  61   GACACCGTAGTAGAACTGGAGAAGGTCGAGACTCAGGTTGTTGCAGGAACCAACTATAGA  120
          ||||||||||■|||■||■■|||■|||||■||■|||■■■|||||■||■||||||||■|||
IS2  61   GACACCGTAGTCGAAGTGCTGAAAGTCGAAACGCAGACGGTTGCTGGCACCAACTACAGA  120

IR2  121  CTGACGCTCAAGGTTGTTGARTCCGTCTGCGAACTCACATCCACGTACTCCAAGGAGGCC  180
          ||||||||■|||||■|■■||■|||■■|||■||||||||■|||||■|||■■■|||||■■||
IS2  121  CTGACGCTTAAGGTGGCCGAGTCCACCTGTGAACTCACGTCCACCTACAATAAGGACACC  180

IR2  181  TGCACAGCCAAAGAAAATGCAGCACACAGGAACTGCAAAACTGTCATTTACCGGAACCTG  240
          |||■■||||||■|■|||||||■||■||■||||■■||||■■|||||||||||||||||||
IS2  181  TGCCAAGCCAATGCAAATGCGGCGCAGAGGACTTGCACGACTGTCATTTACCGGAACCTG  240

IR2  241  CAAG  244
          ||||
IS2  241  CAAG  244
```

B)

Obr. 11. Porovnání nukleotidových sekvencí dvou cystatinů IR2 a IS2

A) Porovnání parciálních nukleotidových sekvencí homologních cystatinů z *I. ricinus* a *I. scapularis*. Nesouhlas v sekvenci – černé kostky, červeně – primery, modře – domény vázající papain I a II;

B) Zobrazení zatím známé sekvence IR2; červeně – primery, modře – doména vázající papain II s jejím přepisem do aminokyselinové sekvence, A a AS – sense a antisense primer;

5. Diskuze

Sekvence cystatinu 3 klíštěte *I. ricinus* byla zveřejněna pod přístupovým číslem AJ547803 (GenBank). Cystatiny parazitů byly poprvé popsány u parazitických nematod *O. volvulus* a *A. viteae* (Schierack et al., 2003). Funkci cystatinů v klíšťatech jako první popsal Karim et al. (2005). Oba výše zmínění autoři připisují cystatinům parazitických organizmů schopnost potlačit imunitní systém hostitele. Tyto výsledky vyvolaly zájem o cystatinové molekuly v parazitech a zejména v klíšťatech. Cystatiny byly do dnešní doby popsány v pěti klíštěcích druzích: *A. americanum* (Karim et al., 2005), *I. scapularis* (Kotsyfakis et al., 2006; Kotsyfakis et al., 2007), *B. microplus* (Lima et al., 2006), *H. longicornis* (Zhou et al., 2006) a *O. moubata* (Grunclová et al., 2006).

Vlastnosti cystatinů v klíštěti *I. ricinus*, hlavním vektorem lymské boreliózy v Evropě, nebyly dosud publikovány. Hlavní cílem této práce bylo optimalizovat postup pro přípravu aktivního cystatinu z *I. ricinus*, aby tato molekula mohla být podrobena funkčním analýzám zejména ve střevní tkáni a slinných žlázách.

Optimalizace podmínek pro připravení aktivního cystatinu 3

Heterologní exprese rekombinantních proteinů do cytoplazmy *E. coli* často vede k tvorbě nerozpustných inkluzních tělísek. Získání aktivní formy proteinu vyžaduje rozpuštění proteinových molekul agregovaných v inkluzních tělískách pomocí denaturačních činidel, v našem případě 6M GuHCl, a následnou postupnou renaturaci (refolding). Podmínky refoldingu byly optimalizovány metodou pokusu a omylu tak, aby došlo k největšímu výtěžku renaturovaného proteinu. Důležité sloučeniny pro úspěšný refolding cystatinu 3 jsou 0,4M L-Arginin a 20mM β-merkaptoetanol. L-Arginin zabraňuje agregaci proteinů (Arakawa et Tsumoto, 2003) a β-merkaptoetanol je silné redukční činidlo umožňující redukci nesprávně zoxidovaných disulfidických můstků.

Tkáňový profil transkripce

Cystatin 3 se, podobně jako Om-cystatin 2 (Grunclová et al., 2006), transkribuje v několika různých tkáních. Transkripční aktivita je pravděpodobně nejvyšší ve střevě, naopak nejmenší v trachejích. Cystatin 3, přítomný ve střevě, má zřejmě ochranou funkci před endogenními proteázami uvolněných z prasklých trávicích buněk v lumen střeva, popř. ochrannou funkci před hostitelskými proteázami nasátými spolu s krví.

Indukce transkripce IRcystatinu sáním

Během přípravné fáze sání (24 – 36 hodin) dochází k malému nebo nedochází k žádnému trávení. Od následné pomalé fáze začíná intracelulární trávení nasáté krve (Sonnenshine, 1991). S postupem trávení nasáté krve během pomalé fáze se zvyšuje transkripční aktivita cystatinu 3.

Toto pozorování jasně prokazuje přímou souvislost cystatinu 3 a klíštěcího trávení. Sáním indukovanou transkripci cystatinu ve střevní tkáni klíštěte *H. longicornis* pozoroval i Zhou et al. (2006).

Hlavní funkce cystatinů ve střevě samic *I. ricinus* je zřejmě ochrana vlastní tkáně před endogenními proteázami uvolněnými do lumen střeva při lýze trávicích buněk. Cystatin 3 se vzhledem k pozdní transkripci ve slinných žlázách zřejmě neúčastní imunomodulačních mechanizmů v hostiteli. Imunomodulační vlastnosti naopak mají cystatiny v klíštěti *I. scapularis* (Kotsyfakis et al., 2006).

Tkáňový expresní profil

Western blot analýza cystatinu 3 přinesla zajímavé, ale těžko interpretovatelné výsledky. Výrazné reakce protilátek s tkáňovými proteiny byly pozorovány v neočekávaných oblastech molekulových hmotností. Rekombinantní cystatin 3 byl detekován v očekávané oblasti 15,9 kDa. Na možnou tvorbu cystatinových dimerů ukazuje výrazný a opakovaně pozorovaný 26 kDa produkt ve střevní tkáni i ve slinných žlázách klíštěte *I. ricinus*. Tkáňový IRcystatin, bez signální sekvence a bez 6His-tag, má molekulová hmotnost jen 13 kDa (protein calculator v3.3). Výsledná očekávaná velikost 26 kDa možného homodimeru se přesně shoduje s výsledky western blot analýzy. Není však jasné, jakými interakcemi by byl homodimer tvořen.

Druhým možným vysvětlením výsledku této western blot analýzy je možná silná zkřížená reakce anti-IRcyst protilátek s jinými proteiny v tkáních klíštěte. Za tohoto předpokladu by byl cystatin 3 v tkáních pouze v minoritních koncentracích.

Inhibiční aktivita cystatinu

Krystalizace kuřecího cystatinu objasnila interakce mezi konzervovanými motivy cystatinu a papainu (Bode et al., 1988). Výrazná sekvenční shoda mezi klíštěcím a kuřecím cystatinem v konzervovaných doménách vysvětluje schopnost cystatinu 3 inhibovat proteolytickou aktivitu papainu. Schopnost cystatinu 3 inhibovat katalytickou aktivitu papainu také dokazuje možnost inhibice cysteinových proteáz papainové rodiny v klíštěti. Ve střevě klíštěte *I. ricinus* se transkribuje z této rodiny cathepsin B, L a C (Sojka et al., 2008). Cystatin 3 zřejmě chrání vlastní tkáň před těmito proteázami.

Klíštěcí samičí střevní epitel funguje také jako druhotný zdroj vitelogeninu (Sonenshine, 1991). Vysoká vitelogeneze je nezbytným pochodem klíšťat umožňující jejich značnou ovipozici. Cathepsin L a C se transkribuje ve vaječnících i vajíčkách klíštěte *I. ricinus*, což naznačuje možnou roli cathepsinů v tvorbě a vývoji vajíček. Klíštěcí cystatiny tak mohou být regulačním článkem těchto pochodů.

Všechny tři cystatiny z *I. ricinus* se transkribují ve slinných žlázách. Cystatin 1 a cystatin 2 z klíštěte *I. ricinus* jsou zřejmě, díky značné shodě se sialostatiny, schopné inhibice lidských cysteinových proteáz papainového typu účastnících se fagolysozomálních zpracování antigenu, což může být důležitým mechanizmem klíštěte, jak se vyhnout imunitnímu systému hostitele po několikadenní dobu sání (Kotsyfakis et al., 2007).

Cystatiny z klíštěte *I. ricinus* mohou hrát důležitou roli v regulaci endogenních proteáz ve střevní tkáni. Jejich inhibiční schopnosti můžou sloužit jako ochranný systém před poškozením vlastní střevní tkáně. Cystatiny sekretované ze slinných žláz mají zřejmě hlavní funkci v regulaci exogenních, hostitelských, proteáz účastnících se imunitních odpovědí. Cystatiny ve vaječníkách mohou přispívat k mechanizmům chránící vajíčka před předčasným zráním. Cystatiny tedy mohou ovlivňovat schopnost trávení a sání a zároveň regulovat vlastní ochranu a reprodukci.

Sekvenace cystatinů z *I. ricinus*

Cystatiny obsahují tři části (moduly), které jsou v těsném kontaktu s aktivním místem papainu (Machleidt et al., 1989). Na N-konci aminokyselinové sekvence sialostatinu L je prvním pravděpodobným místem interakce konzervovaný glycin, P I (Kotsyfakis et al., 2006), který se ale u ostatních organizmů vyskytuje v jiném kontextu okolních aminokyselin: kuřecí cystatin (Machleidt et al., 1989), lidský cystatin (Hof et al., 1997), aj. Druhý cystatinový modul sloužící k interakci s papainem je první vlásenková smyčka obsahující konsensus sekvence QVVAG konzervovaný téměř ve všech členech cystatinové superrodiny, P II (Machleidt et al., 1989). Třetím místem interakce je druhá vlásenková smyčka obsahující konzervovaný tryptofan v kontextu PW, P III (Bode et al., 1988). Některé cystatiny mají navíc SND doménu k interakci s legumainem (aspartátová proteáza) (Schierack et al., 2003).

V nově identifikovaných cystatinech klíštěte *I. ricinus* jsou zachovány první dva moduly k vazbě s papainem, PI a PII. V blízkosti C-konce se formují disulfidické můstky, které jsou typické pro sekretované cystatiny (Vray et al., 2002). Absence třetího modulu u sialostatinu L způsobuje sníženou afinitu ke cathepsinu B a H (Björk et al., 1996). Björk et al. (1996) usuzuje, že tato doména přispívá k interakci cystatinů se všemi cysteinovými proteázami papainové rodiny tím, že udržuje inhibitor navázaný na enzym po vytvoření komplexu enzym-inhibitor. Cystatin 1 a cystatin 2 mohou mít díky absenci P III a vysoké sekvenční shodě se sialostatiny také nižší inhibiční aktivitu proti cysteinovým proteázám v klíštěti *I. ricinus*.

U žádného ze zkoumaných cystatinů *I. ricinus* nebyl nalezen SND motiv k interakci s proteázami legumainového typu. Tyto proteázy se účastní zpracování antigenu pro MHC II prezentaci (Manoury et al., 1998). Cystatiny z klíštěte *I. ricinus* tedy pravděpodobně

neovlivňují hostitelovu MHC II prezentaci antigenu. Toto tvrzení je v souladu s pozorováním Grunclové et al. (2006), že žádné klíštěcí cystatiny nejsou schopny inhibovat legumainové proteázy.

Výrazné delece a substituce mezi pozicemi 44 až 90 (dle IR3) a lokalizace transkripce jednotlivých cystatinů ukazují na jejich možné kastování do dvou funkčních skupin. Střevní cystatiny IR3, OM1 a OM2 se zřejmě účastní pochodů při regulaci endogenních proteáz ve střevě klíštěte a tím brání klíštěcí střevní tkáň. Cystatiny ze slinných žláz IR1, IR2, IS1, IS2 vytváří druhou funkční skupinu. Tyto cystatiny mají odlišnou primární strukturu oproti střevním cystatinům a zřejmě se podílejí na regulaci exogenních proteáz, a tím umožňují úspěšné sání klíštěte.

Závěrem – byly optimalizovány podmínky pro přípravu aktivního cystatinu 3. Aktivita enzymu byla ověřena proti rostlinnému papainu. Tkáňový profil transkripce ukazuje, že cystatin 3 se kromě funkcí očekávaných ve střevě a slinných žlázách bude účastnit i pochodů ve vaječníkách, trachejích a malpighiho trubicích. Cystatiny ve střevní tkáni jsou zřejmě primárně namířeny proti endogenním proteázám. Naproti tomu, cystatiny ze slinných žláz jsou pravděpodobně určeny k inhibici exogenních proteáz. Transkripce cystatinu 3 je indukována sáním a jeho transkripční aktivita roste s dobou sání. Byly objeveny další dva cystatiny v klíštěti *I. ricinus*, cystatin 1 a cystatin 2. Tyto cystatiny budou plně dosekvenovány, popř. exprimovány, aby mohly být využity k funkčním analýzám, zejména v oblasti imunomodulačních schopností proti exogenním proteázám. Schopnostmi klíštěcích cystatinů ovlivnit imunitu hostitele v místě sání se zabývá grant: Imunomodulační vlastnosti klíštěcích cystatinů (KJB 500960702), řešitel Jiří Salát, Ph.D. Naším dalším cílem bude zjistit funkci cystatinu 3 *in vivo* při sání samic klíštěte *I. ricinus*.

7. Literatura

Agyei, A.D., Runham, N.V., 1995. Studies on the morphological changes in the midguts of two ixodid tick species *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. Int. J. Parasitol. 25, 55–62.

Arakawa, T., Tsumoto, K., 2003. The effects of arginine on refolding of aggregated proteins: not facilitate refolding, but suppress aggregation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 304, 148–152.

Beck, G., Habicht, G.S., 1996. Immunity and the Invertebrates. Sci. Am. 275, 60–66.

Belenghi, B., Acconcia, F., Trovato, M., Perazzolli, M., Bocedi, A., Polticelli, F., Ascenzi, P., Delledonne, M., 2003. AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. Eur. J. Biochem. 270, 2593–2604.

Berti, P.J., Storer, A.C., 1995. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. J. Mol. Biol. 246, 273–283.

Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J., Kos, J., Turk, V., 1988. The 2.0 A° X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. EMBO J. 7, 2593–2599.

Björk, I., Brieditis, I., Raub-Segall, E., Pol, E., Håkansson, K., Abrahamson, M., 1996. The importance of the second hairpin loop of cystatin C for proteinase binding. Characterization of the interaction of Trp-106 variants of the inhibitor with cysteine proteinases. Biochemistry 35, 10720–10726.

Bowman, A.S., Sauer, J.R., 2004. Tick salivary glands: function, physiology and future. Parasitology 129 Suppl., 67–81.

Coleman, J.L., Gebbia, J.A., Piesman, J., Degen, J.L., Bugge, T.H., Benach, J.L., 1997. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. Cell 89, 1111–1119.

Coons, L.B., Alberti, G., 1999. Microscopic Anatomy of Invertebrates. Wilie-Liss, New York.

Cupp, E.W., 1991. Biology of ticks. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 21, 1–26.

Eggenberger, L.R., Lamoreaux, W.J., Coons, L.B., 1990. Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. Exp. Appl. Acarol. 9, 279–287.

Fingerle, V., Rauser, S., Hammer, B., Kahl, O., Heimerl, C., Schulte-Spechtel, U., Gern, L., Wilske, B., 2002. Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. J. Clin. Microbiol. 40, 1456–1463.

Fogaça, A.C., da Silva, P.I. Jr., Miranda, M.T., Bianchi, A.G., Miranda, A., Ribolla, P.E., Daffre, S., 1999. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. J. Biol. Chem. 274, 25330–25334.

Fogaça, A.C., Almeida, I.C., Eberlin, M.N., Tanaka, A.S., Bulet, P., Daffre, S., 2006. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. Peptides 27, 667–674.

Gilmore, R.D. Jr., Piesman, J., 2000. Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC-immunized mice. Infect. Immun. 68, 411–414.

Grubhoffer, L., Kovář, V., Rudenko, N., 2004. Tick lectins: structural and functional properties. Parasitology. 129 Suppl, 113–125.

Grunclová, L., Fouquier, H., Hypša, V., Kopáček, P., 2003. Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. Dev. Comp. Immunol. 27, 651–660.

Grunclová, L., Horn, M., Vancová, M., Sojka, D., Franta, Z., Mareš, M., Kopáček, P., 2006. Two secreted cystatins of the soft tick *Ornithodoros moubata*: differential expression pattern and inhibitory specificity. Biol. Chem. 387, 1635–1644.

van't Hof, W., Blankenvoorde, M.F., Veerman, E.C., Amerongen, A.V., 1997. The salivary lipocalin von Ebner's gland protein is a cysteine proteinase inhibitor. J. Biol. Chem. 272, 1837–1841.

Holmes, S.P., Li, D., Ceraul, S.M., Azad, A.F., 2008. An aquaporin-like protein from the ovaries and gut of American dog tick (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 45, 68–74.

Huang, X., Tsuji, N., Miyoshi, T., Nakamura-Tsuruta, S., Hirabayashi, J., Fujisaki, K., 2007. Molecular characterization and oligosaccharide-binding properties of a galectin from the argasid tick *Ornithodoros moubata*. Glycobiology 17, 313–323.

Chinzei, Y., Minoura, H., 1987. Host immunoglobulin G titre and antibody activity in haemolymph of the tick, *Ornithodoros moubata*. Med. Vet. Entomol. 1, 409–416.

Jeffers, L.A., Michael Roe, R., 2008. The movement of proteins across the insect and tick digestive system. J. Ins. Physiol. 54, 319–332.

Johns, R., Sonenshine, D.E., Hynes, W.L., 2001. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. Insect Biochem. Mol. Biol. 31, 857–865.

Jones, L.D., Hodgson, E., Nuttall, P.A., 1989. Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. J. Gen. Virol. 70, 1895–1898.

Kahl, O., Janetzki-Mittmann, C., Gray, J.S., Jonas, R., Stein, J., de Boer, R., 1998. Risk of infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato for a host in relation to the duration of nymphal *Ixodes ricinus* feeding and the method of tick removal. Zentralbl. Bakteriol. 287, 41–52.

Karim, S., Miller, N.J., Valenzuela, J., Sauer, J.R., Mather, T.N., 2005. RNAi-mediated gene silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood feeding. Biochem. Biophys. Res. Commun. 334, 1336–1342.

Kopáček, P., Weise, C., Götz, P., 1995. The prophenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme. Insect Biochem. Mol. Biol. 25, 1081–1091.

Kopáček, P., Vogt, R., Jindrák, L., Weise, C., Šafařík, I., 1999. Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. Insect Biochem. Mol. Biol. 29, 989–997.

Kopáček, P., Weise, C., Saravanan, T., Vítová, K., Grubhoffer, L., 2000. Characterisation of an α_2-macroglobulin-like glycoprotein isolated from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. Eur. J. Biochem. 267, 465–475.

Kopáček, P., Ždychová, J., Yoshiga, T., Weise, C., Rudenko, N., Law, J.H., 2003. Molecular cloning, expression and isolation of ferritins from two tick species—*Ornithodoros moubata* and *Ixodes ricinus*. Insect Biochem. Mol. Biol. 33, 103–113.

Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Francischetti, I.M., Mather, T.N., Andersen, J.F., Ribeiro, J.M., 2006. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. J. Biol. Chem. 281, 26298–26307.

Kotsyfakis, M., Karim, S., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M., 2007. Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. J. Biol. Chem. 282, 29256–29263.

Kovář, V., Kopáček, P., Grubhoffer, L., 2000. Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 195–205.

Lara, F.A., Lins, U., Paiva-Silva, G., Almeida, I.C., Braga, C.M., Miguens, F.C., Oliveira, P.L., Dansa-Petretski, M., 2003. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. J. Exp. Biol. 206, 1707–1715.

Lima, C.A., Sasaki, S.D., Tanaka, A.S., 2006. Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized for the first time from the tick *Boophilus microplus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 347, 44–50.

Machleidt, W., Thiele, U., Laber, B., Assfalg-Machleidt, I., Esterl, A., Wiegand, G., Kos, J., Turk, V., Bode, W., 1989. Mechanism of inhibition of papain by chicken egg white cystatin. Inhibition constants of N-terminally truncated forms and cyanogen bromide fragments of the inhibitor. FEBS Lett. 243, 234–238.

Manoury, B., Hewitt, E.W., Morrice, N., Dando, P.M., Barrett, A.J., Watts, C., 1998. An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation. Nature 396, 695–699.

McKerrow, J.H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., Sajid, M., 2006. Proteases in parasitic diseases. Annu Rev Pathol 1, 497–536.

Nakajima, Y., van der Goes van Naters-Yasui, A., Taylor, D., Yamakawa, M., 2001. Two isoformes of member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). Insect Biochem. Mol. Biol. 31, 747–751.

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

Narasimhan, S., Koski, R.A., Beaulieu, B., Anderson, J.F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., Cappello, M., Fikrig, E., 2002. A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. Insect Mol. Biol. 11, 641–650.

Neelakanta, G., Li, X., Pal, U., Liu, X., Beck, D.S., DePonte, K., Fish, D., Kantor, F.S., Fikrig, E., 2007. Outer surface protein B is critical for *Borrelia burgdorferi* adherence and survival within Ixodes ticks. PLoS Pathog. 3, e33.

Oliveira, M.F., Silva, J.R., Dansa-Petretski, M., de Souza, W., Lins, U., Braga, C. M., Masuda, H., Oliveira, P.L., 1999. Haem detoxification by an insect. Nature 400, 517–518.

Pal, U., Li, X., Wang, T., Montgomery, R.R., Ramamoorthi, N., Desilva, A.M., Bao, F., Yang, X., Pypaert, M., Pradhan, D., Kantor, F.S., Telford, S., Anderson, J.F., Fikrig, E., 2004. TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. Cell 119, 457–468.

Pereira, L.S., Oliveira, P.L., Barja-Fidalgo, C., Daffre, S., 2001. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. Exp. Parasitol. 99, 66–72.

Pernas, M., Sanchez Monge, R., Gomez, L., Salcedo, G., 1998. A chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from closely related pests. Plant Mol. Biol. 38, 1235–1242.

Rego, R.O., Hajdušek, O., Kovář, V., Kopáček, P., Grubhoffer, L., Hypša, V., 2005. Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*. Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 991–1004.

Ribeiro, J.M., Makoul, G.T., Levine, J., Robinson, D.R., Spielman, A., 1985. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. J. Exp. Med. 161, 332–344.

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

Ribeiro, J.M., Weis, J.J., Telford, S.R. 3rd., 1990. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. Exp. Parasitol. 70, 382–388.

Ribeiro, J.M., 1995. How ticks make a living. Parasitol. Today 11, 91–93.

Rudenko, N., Golovchenko, M., Edwards, M.J., Grubhoffer, L., 2005. Differential expression of Ixodes ricinus tick genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection. J. Med. Entomol. 42, 36–41.

Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., 2007. Gene organization of a novel defensin of Ixodes ricinus: first annotation of an intron/exon structure in a hard tick defensin gene and first evidence of the occurrence of two isoforms of one member of the arthropod defensin family. Insect Mol. Biol. 16, 501–507.

Santos, C.C., Sant'anna, C., Terres, A., Cunha-e-Silva, N.L., Scharfstein, J., de A Lima, A.P., 2005. Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. J. Cell. Sci. 118, 901–915.

Saravanan, T., Weise, C., Sojka, D., Kopáček, P., 2003. Molecular cloning, structure and bait region splice variants of alpha2-macroglobulin from the soft tick *Ornithodoros moubata*. Insect Biochem. Mol. Biol. 33, 841–851.

Schierack, P., Lucius, R., Sonnenburg, B., Schilling, K., Hartmann, S., 2003. Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. Infect. Immun. 71, 2422–2429.

Schwan, T.G., Piesman, J., 2002. Vector interactions and molecular adaptations of Lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. Emerg. Infect. Dis. 8, 115–121.

Simser, J.A., Macaluso, K.R., Mulenga, A., Azad, A.F., 2004. Immune-responsive lysozymes from hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* and an embryonic cell line of the Rocky Mountain wood tick, *D. andersoni*. Insect Biochem. Mol. Biol. 34, 1235–1246.

Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Hajdušek, O., Caffrey, C.R., Mareš, M., Kopáček, P., 2008. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. Parasit Vectors 1, 7.

Sonenshine, D.E., 1991. Biology of Ticks, vol. 1. Oxford university Press, New York.

Sonenshine, D.E., Hynes, W.L., Ceraul, S.M., Mitchell, R., Benzine, T., 2005. Host blood proteins and peptides in the midgut of the tick *Dermacentor variabilis* contribute to bacterial control. Exp. Appl. Acarol. 36, 207–23.

Titus, R.G., Ribeiro, J.M., 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance Leishmania infectivity. Science 239, 1306–1308.

Valenzuela, J.G., Francischetti, I.M., Pham, V.M., Garfield, M.K., Mather, T.N., Ribeiro, J.M., 2002. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. J. Exp. Biol. 205, 2843–2864.

Vray, B., Hartmann, S., Hoebeke, J., 2002. Immunomodulatory properties of cystatins. Cell. Mol. Life Sci. 59, 1503–1512.

Waxman, L., Smith, D.E., Arcuri, K.E., Vlasuk, G.P., 1990. Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. Science 248, 593–596. Erratum: 1990. Science 248, 1473.

Yang, X.F., Pal, U., Alani, S.M., Fikrig, E., Norgard, M.V., 2004. Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete. J. Exp. Med. 199, 641–648.

Zhou, J., Ueda, M., Umemiya, R., Battsetseq, B., Boldbaatar, D., Xuan, X., Fujisaki, K., 2006. A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 527–35.