

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY

KATEDRA MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE



**Exprese rekombinantního katepsinu C – trávicí exopeptidázy
klíštěte *Ixodes ricinus***

PETR FRANTA

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Zdeněk Franta

2009

Bakalářská práce

Franta P., 2009: Expres rekombinantního katepsinu C – trávicí exopeptidázy klíštěte *Ixodes ricinus*. [Expression of recombinant Cathepsin C – the digestive exopeptidase of the tick *Ixodes ricinus*, Bachelor thesis, in Czech] – 33 p, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: Proteases play indispensable roles in the biology of parasitic organisms, including immunoevasion, excystment, and cell and tissue invasion. In the tick *Ixodes ricinus*, cysteine and aspartic proteases are crucial for digestion of hemoglobin and other blood proteins. This process provides nutrients for anabolic processes such as vitellogenesis and eggs production. Therefore, tick cysteine proteases could be relevant anti-tick vaccines targets. This thesis focuses on expression of recombinant Cathepsin C - the digestive exopeptidase from the gut of the hard tick *Ixodes ricinus* in bacterial system *Escherichia coli*.

Tato práce byla financována z grantu GAAVČR č. IAA600960910 (2009-12) a z Výzkumného centra LC06009.

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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 30. dubna 2009:

Poděkování:

Chci poděkovat panu Petru Kopáčkovi za odborné vedení mé práce v laboratoři. Dále bych chtěl poděkovat Zdeňkovi Frantovi za pečlivé vedení mé bakalářské práce, trpělivost a ochotu mi kdykoliv dát cenné rady. Dále děkuji Danovi za jeho pomoc ve Zdeňkově nepřítomnosti, Verče, Helče a ostatním lidem v naší laboratoři za vytvoření skvělé atmosféry pro práci. Mnohokrát děkuji svým rodičům za obrovskou podporu při studiu. Nemalý dík patří i mým přátelům a spolubydlícím za morální podporu, které se mi od nich dostává.

Obsah:

1. Úvod	4
1.1 <i>Ixodes ricinus</i> (klíště obecné)	4
1.2 Střevo klíšťat	4
1.3 Sání krve	6
1.4 Trávení klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	6
1.5 Proteázy	8
1.6 Cysteinové proteázy	9
1.7 Katepsin C (IrCC) klíštěte <i>I. ricinus</i>	11
2. Cíle práce	12
3. Materiál a metody	13
3.1 Navržení primerů a amplifikace genu (PCR)	13
3.2 Gelová elektroforéza	13
3.3 DNA klonování	13
3.4 Transformace do expresních buněk <i>E.coli</i> a pilotní exprese	14
3.5 SDS-PAGE (polyakrylamidová elektroforéza)	15
3.6 Izolace inkluzních tělísek	15
3.7 Purifikace proteinu	16
3.8 Renaturace proteinu	16
3.9 Příprava králičích polyklonálních protilátek	17
3.10 Izolace imunoglobulinové frakce z králičího séra	17
3.11 Purifikace specifických protilátek metodou afinitní chromatografie	17
3.12 Dynamika exprese katepsinu C ve střevě <i>I. ricinus</i>	19
4. Výsledky a diskuze	20
4.1 Amplifikace genu pro IrCC	20
4.2 Exprese rekombinantního IrCC	21
4.3 Příprava králičích polyklonálních protilátek a jejich purifikace	26
4.4 Dynamika exprese IrCC ve střevě <i>I. ricinus</i>	28
5. Literatura	31

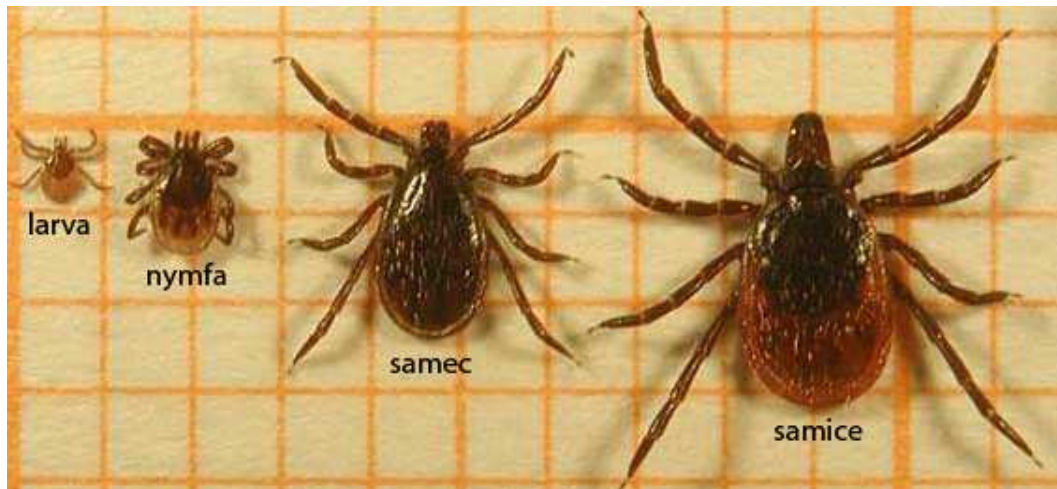
1. Úvod

1.1 *Ixodes ricinus* (klíště obecné)

Ixodes ricinus je krev sající roztoč z čeledi *Ixodidae*. Můžeme se s ním setkat v mírném pásmu Evropy a Asie, ale i v severní Africe. Klíště preferuje teplé vlhké biotopy, ideální jsou listnaté až smíšené lesy s dostatečným podrostem.

Klíště během svého životního cyklu, který trvá 2-3 roky, prochází čtyřmi vývojovými stádii (vajíčko, šestinohá larva, osminohá nymfa, imago) a každé stádium saje pouze jednou a na jiném hostiteli. Po nasátí následuje odpadnutí od hostitele, svlékání a metamorfóza v následující stádium (u larev a nymf), v případě oplodněné samice dochází po sání k naklazení velkého počtu vajíček a posléze k smrti.

Mezi nejzávažnější patogeny přenášené klíštětem *I. ricinus* patří spirochéta *Borrelia burgdorferi* sensu lato, způsobující lymeskou boreliózu, a virus klíšťové encefalitidy (Nutall, 1999).



Obr.č.1: Aktivní vývojová stádia klíštěte *I. ricinus*.

1.2 Střevo klíšťat

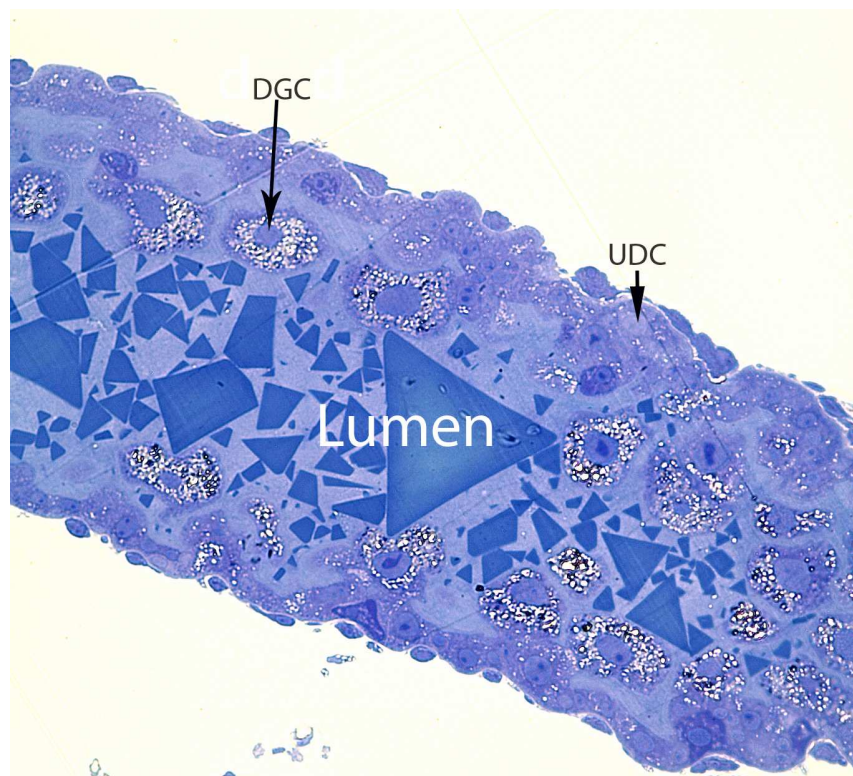
Střevo je největším orgánem klíštěte. Jeho hlavními úlohami v životě těchto členovců jsou skladování a trávení nasáté krve. Zároveň tvoří první rozhraní, kde dochází k interakci

vektor-patogen. Přenos těchto patogenů je úzce spjat se sáním krve (Horn et al., 2009). S výjimkou intralumenální hemolýzy probíhá degradace složek krve intracelulárně (tzv. heterofágie) (Balashov, 1972). Tento typ trávení je výjimečný oproti krev sajícímu hmyzu, kde k trávení dochází v lumen střeva.

Střevní epitel klíšťat se skládá ze dvou základních typů buněk:

- a) Nediferenciované buňky (UDC)
- b) Diferenciované trávicí buňky (DGC)

UDC buňky fungují jako kmenové buňky, ze kterých se během počáteční fáze sání stávají DGC (Coons et al., 1986). DGC buňky jsou na lumenální straně pokryty mikrokly a obsahují velké množství endosomů a residuálních tělísek (hemosomů).



Obr.č.2: Řez střevem klíštěte *I. ricinus* ve čtvrtém dni sání. UDC – nediferenciované buňky, DGC – diferenciované trávicí buňky (Pěničková, 2009). Hemoglobin morčat ve střevě formuje krystalické agregáty.

1.3 Sání krve

Sání klíšťat čeledi *Ixodidae* trvá 3-15 dní v závislosti na stádiu a druhu (Balashov, 1972; Logan et al., 1989; Jingze et al., 2005) a dělí se na tři fáze:

- 1) Přípravná fáze
- 2) Pomalé sání
- 3) Rychlé sání

Během přípravné fáze (24-36 hodin) je příjem krve velmi malý a není zaznamenána trávicí aktivita. Následné pomalé sání (6-9 dní) se vyznačuje proliferací UDC buněk a růstem střevního epitelu. Krev je pomalu nasávána a kontinuálně trávena uvnitř trávicích buněk. Živiny jsou do buněk transportovány pinocytózou a receptory zprostředkovanou endocytózou. Během této fáze dochází k páření. Rychlé sání je iniciováno uvolněním spermatu do reprodukčního traktu samice. Za 12-36 hodin zvětší samice až stonásobně svou váhu nasátou krví, která je využita k vitelogenezi a tvorbě vajíček (Sonenshine, 1991).

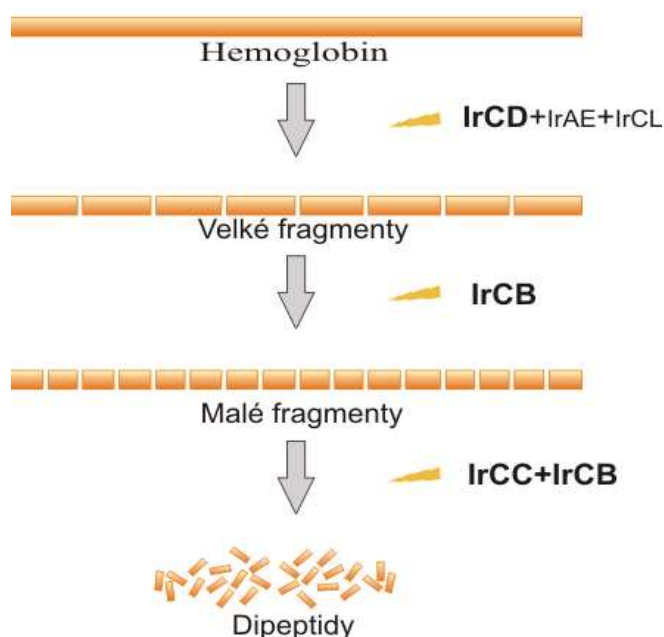
1.4 Trávení klíštěte *I. ricinus*

Sání a trávení krve jsou nezbytné aktivity klíštěte. Krev je bohatým zdrojem proteinů a živin pro všechny anaboličké procesy (Grandjean, 1984). Hlavními trávenými složkami krve jsou hemoglobin a albumin. Trávení hemoglobinu je u klíšťat, narozdíl od krev sajícího hmyzu, který využívá k proteolýze serinové proteázy, zprostředkováno souborem cysteinových a aspartátových proteáz.

V současné době je trávení hostitelských proteinů nejlépe popsáno u klíštěte *I. ricinus*, kde byly ve střevě identifikovány čtyři cysteinové proteázy (katepsin B, L, C, legumain) a jedna aspartátová proteáza (katepsin D) (Sojka et al., 2008). Identifikovaný systém proteáz je velmi podobný proteolytickým enzymům podléjícím se na trávení hostitelské krve u fylogeneticky vzdálených organismů jako jsou např. nematoda (Williamson et al., 2003), schistosomy (Caffrey et al., 2004) nebo malarický prvok *Plasmodium* (Rosenthal, 2004).

Trávení hemoglobinu

Degradace hemoglobinu probíhá neoptimálněji v kyselém prostředí (pH 3,5-4,5). Hemoglobin je nejprve naštěpen na velké fragmenty (8-11 kDa) katepsinem D podpořeným endopeptidázovými aktivitami legumainu a katepsinu L. V další fázi se uplatňuje endopeptidázová aktivita katepsinu B, který hydrolyzuje velké fragmenty na menší (3-5 kDa). Celý process je ukončen naštěpením malých fragmentů na dipeptidy pomocí katepsinu C (z N-konce) a katepsinu B (z C-konce) (Horn et al., 2009).



Obr.č.4: Schéma degradace hemoglobinu u klíštěte *I. ricinus*. (dle Horn et al., 2009)

Detoxifikace hemu

Jedním z problémů, se kterým se musí klíšťata a ostatní krev sající paraziti vypořádat, je fakt, že při trávení hemoglobinu vzniká obrovské množství hemu. Hem dokáže katalyzovat tvorbu kyslíkových radikálů (Lara et al., 2003) a navíc je schopen se asociovat s fosfolipidovými membránami a tím narušit jejich strukturu (Schmitt et al., 1993). Krev sající organismy si vyvinuly několik strategií, jak hem neutralizovat. Například *Schistosoma mansoni* se brání biokrytalizací hemu do nerozpustných agregátů nazývaných hemozoiny (Oliveira et al., 2000).

Klíšťata hem shlukují do nekystalických agregátů a poté ukládají do vezikul nazývaných hemosomy (Lara et al., 2003), popř. residuální tělíska (Sonenshine, 1991).

1.5 Proteázy

Proteolytické enzymy katalyzují štěpení peptidových vazeb v makromolekulárních proteinech a oligomerních peptidech. Proteázy byly identifikovány ve všech biologických systémech od virů až po obratlovce. Reprezentují jednu z největších funkčních tříd proteinů (Harris et Craik, 2000). Až dvě procenta všech exprimovaných genů v organismech zaujímají právě tyto enzymy (Sajid et McKerrow, 2002). Jejich velikosti se pohybují od 10 kDa velkých monomerů až po několik stovek kDa velkých multimerních komplexů.

Klasifikace proteáz

Existuje několik hledisek dělení proteáz. Podle místa, kde enzym štěpí substrát, dělíme proteázy na exopeptidázy (na N- nebo C- konci peptidu) nebo endopeptidázy (uvnitř peptidového řetězce). Z hlediska katalytického typu se dělí proteázy na čtyři hlavní (serinové, cysteinové, aspartátové, metaloproteázy) a dvě vedlejší (threoninové, glutamové) (<http://merops.sanger.ac.uk>). Ty se dále rozrůžňují do klanů (proteázy odvozené od společného předka) a do rodin (proteázy si podobné v dané skupině).

Proteázy parazitických organismů

Proteázy hrají mnoho klíčových rolí v biologii parazitů. Některé významné funkce jsou shrnuty v **Tab.č.1** (McKerrow et al., 2006).

Tab.č.1: Proteázy a jejich funkce v parazitech. Upraveno dle McKerrow et al. (2006)

Třída proteáz	Funkce u parazitů	Příklad parazita
Cysteinové	Invaze do tkání	<i>Schistosoma mansoni, Fasciola</i>
	Degradace živin	<i>Ixodidae, Plasmodium</i>
	Vyhnutí se imunitní odpovědi	<i>Trypanosoma cruzi</i>
Aspartátové	Degradace živin	<i>Ixodidae, Plasmodium</i>
Serinové	Antikoagulace	helminti
	Invaze do tkání	schistosomy
Metaloproteázy	Antikoagulace	helminti
	Invaze do tkání	larvy helmintů
	Degradace živin	<i>Plasmodium</i>

1.6 Cysteinové proteázy

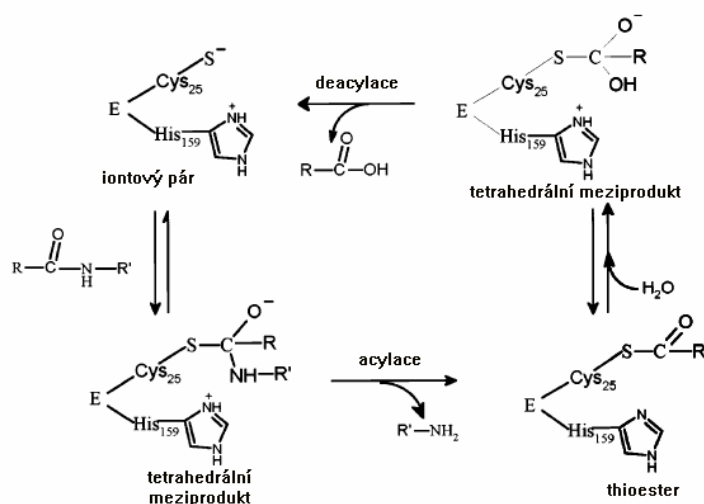
Cysteinové proteázy jsou intenzivně exprimovány ve všech organismech od rostlin po živočichy a byly dokonce identifikovány u virů a bakterií. Tyto enzymy plní mnoho specifických funkcí jako např. prezentace antigenu, degradace proteinů, aktivace proenzymů a zároveň jsou zodpovědné za mnohá onemocnění při jejich nedostatku (dysplázie kostí, Papillon-Lefevrův syndrom) nebo nadbytku (osteoporóza, atheroskleróza, rakovina) (Lecaille, 2002).

U parazitů se cysteinové proteázy uplatňují při invazi do tkání nebo buněk, degradaci hostitelských proteinů, excystaci atd. (Sajid et McKerrow, 2002). Z tohoto důvodu se o nich uvažuje jako o slibných kandidátech pro přípravu různých léčiv a vakcín.

Mechanismus katalýzy

Aktivní místo cysteinových proteáz je velmi konzervované a skládá se z nukleofilní thiolové skupiny cysteinu a imidazolového zbytku histidinu, který funguje jako donor protonu. Navíc jsou tyto zbytky aminokyselin často stabilizovány postranním řetězcem asparaginu.

Během hydrolyzy atakuje nukleofilní thiolová skupina karbonylový uhlík štěpené peptidické vazby a vzniká tetrahedrání meziprodukt, který se stabilizuje pomocí tzv. oxyanionové díry (Ménard, 1992). Meziprodukt se poté transformuje do enzym-substrátového thioesteru a zároveň dochází k acylaci a uvolnění C-koncové části substrátu. Při závěrečné deacylaci se hydrolyzuje vazba enzymu a N-koncové části proteinu a výsledkem je regenerovaný enzym a rozštěpený substrát (Lecaille, 2002).



Obr.č.3: Mechanismus katalýzy cysteinové proteázy. Převzato z Lecaille, 2002

1.7 Katepsin C (IrCC) klíštěte *I. ricinus*

Katepsin C (dipeptidyl peptidáza D) se řadí mezi cysteinové proteázy, klanu CA a rodiny C1 (Barret, 1998). Tato exopeptidáza je schopná odštěpovat dipeptidy z N-konce proteinu nebo oligopeptidu. Lidský katepsin C se vyskytuje ve formě tetrameru, přičemž každá podjednotka se skládá z pro-regionu, těžkého a lehkého řetězce (Dolenc et al., 1995; Cigić et al., 1998; Cigić et al., 2000). Podobná struktura se předpokládá i u *I. ricinus*. V *I. ricinus* byl IrCC detekován ve všech vývojových stádiích včetně vajíček. Z tkáňového profilu víme, že se IrCC nachází kromě střeva, kde se podílí na trávení, i ve slinných žlázách (Sojka et al., 2008). Úloha katepsinu C ve slinných žlázách není zatím přesně známá.

2. Cíle práce

Amplifikace a zaklonování IrCC do expresního vektoru, ověření sekvence.

Příprava rekombinantního katepsinu C klišťete *I. ricinus* v bakteriálním systému *E. coli*.

Příprava králíčích polyklonálních protilátek proti katepsinu C a jejich purifikace metodou afinitní chromatografie.

3. Materiál a metody

3.1 Navržení primerů a amplifikace genu (PCR)

Podle známé sekvence IrCC (GenBank: EU128750) byly navrženy gen-specifické primery (**Tab.č.2**) vhodné pro zaklonování do expresního vektoru. Jako templát pro amplifikaci byla použita cDNA ze střevní tkáně samic *I. ricinus* v 6. dni sání. PCR produkty byly izolovány z 1% agarózového gelu pomocí QIAquick[®] Gel Extraction Kitu (QIAGEN).

3.2 Gelová elektroforéza

Fragmenty DNA byly rozděleny na 1% agarózovém gelu ve stejnosměrném elektrickém poli (100 V) po dobu 30 min. Gel a elektrody byly ponořeny v TAE pufru (na 1 litr pufru – 4,84 g Tris, 2 ml 0,5M Na₂EDTA pH 8, 1,142 ml konc. kyseliny octové).

3.3 DNA klonování

PCR amplikony byly zaklonovány do pET 100/D-TOPO[®] vektoru podle návodu k Champion[™] pET Directional TOPO[®] kitu (Invitrogen). Konstrukty byly transformovány do One Shot TOPO TA Cloning[®] TOP10 chemicky kompetentních *E. coli* buněk (Invitrogen). Buňky byly vysety na plotny se selektivním antibiotikem (ampicilin 50μg/ml). Z vybraných kolonií byly připraveny miniprepy a izolovány plazmidy pomocí High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche).

Byla provedena kontrolní PCR reakce (primery viz. **Tab.č.2**) a pozitivní plazmidy byly sekvenovány v obou směrech za použití T7 a T7R primerů (Invitrogen) (**Tab.č.2**).

Plazmidy byly sekvenovány v laboratoři genomiky (Biologické centrum AVČR, v.v.i., České Budějovice) sekvenátorem Applied Biosystems 3130x1.

Tab.č.2: Použité primery.

Metoda	Primer	Sekvence
Amplifikace genu	CathC-pET100-S	5'- CAC CGA CAC CCC GTC CAA C -3'
	CathC-pET100-AS	5'- CGT TCA CGG GAT CGG -3'
Kontrolní PCR	CathC-RT1-S	5'- CCA CCC GGG ACC CCT ACA ACA CC -3'
	CathC-RT1-AS	5'- GGA AGC CGC CCT CGC AAC C -3'
Sekvenování	T7 Forward	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
	T7 Reverse	5'- TAG TAA TTG CTC AGC GGT GG -3'

3.4 Transformace do expresních buněk *E.coli* a pilotní exprese

Sekvenací ověřené konstrukty byly transformovány do BL21 Star™ (DE3) One shot® chemicky kompetentních *E. coli* buněk dle protokolu Champion™ pET Expression System (Invitrogen).

Pilotní exprese

K buňkám bylo přidáno 250 µl S.O.C. média (2% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 10mM glukóza) a byly inkubovány 30 min na třepačce při 37°C a 200 otáčkách (rpm). Transformační reakce byla poté přidána do 10 ml LB média (1% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 1% NaCl, voda) s ampicilinem o koncentraci 50 µg/ml a byla inkubována za stejných podmínek přes noc. Z narostlé kultury bylo odebráno 500 µl a inokulováno do nových 10 ml LB média. Kultura se nechala narůst na OD₆₀₀ = 0,8 a poté byla rozdělena na dvě kultury po 5 ml, jedna byla indukována Isopropyl-β-Dithiogalaktopyranosidem (IPTG) o konečné koncentraci 0,5 mM a z kultury bylo odebráno 500 µl (exprese v čase t = 0 h), druhá zůstala neindukována jako negativní kontrola. Obě kultury se inkubovaly 6 hodin na třepačce při 37°C a 200 rpm a v 1,5 hodinových intervalech bylo odebíráno 500 µl kultury (exprese v časech t = 1,5 h; 3 h; 4,5 h; 6 h). Odebrané vzorky byly stočeny v mikrocentrifuze 1 minutu při 13 000 rpm. Pelet byl resuspendován v lyzačním pufru (50mM K₂HPO₄, 400mM NaCl, 100mM KCl, 10% glycerol, 0,5% Triton X-100, 10mM imidazol, pH 7,8) a poté zmrazen v tekutém dusíku a opět rozmrazen při 42°C. Tento krok byl opakován ještě dvakrát a lyzované buňky byly znovu stočeny. Takto byly získány dvě frakce

proteinů, nerozpustné proteiny (pelet) a rozpustné (supernatant). Obě frakce byly rozděleny na gradientovém (5-17%) polyakrylamidovém gelu pomocí SDS-PAGE.

Po pilotní expresi byla provedena i vlastní exprese proteinu. Do 1 litru LB média s 1% glukózou bylo přidáno 10 ml předem připravené kultury.

V přítomnosti glukózy dochází k zablokování lac operonu, exprese rekombinantního proteinu je velmi malá a buňky se množí.

Po dosažení OD_{600} 0,5-0,8 byla kultura centrifugována při 3500 g / 10 min, resuspendována v 1 litru LB média bez glukózy a indukována IPTG o konečné koncentraci 0,5mM.

3.5 SDS-PAGE (polyakrylamidová elektroforéza)

Polyakrylamidová elektroforéza probíhá ve stejnosměrném elektrickém poli ($U = 100-200$ V) v elektroforetickém pufru (25mM Tris, 192mM glycin, 0,1% SDS). Vzorky byly ředěny v redukcujícím vzorkovém pufru (do 10 ml – 1,25 ml 0,5M NaCl, 1 ml glycerolu, 0,4 ml merkaptóetanolu, 0,01 g bromfenolové modři, 0,2 g SDS, doplnit do 10 ml vodou) s dithiotreitem v poměru 4:1. Před vlastní elektroforézou byly vzorky denaturovány varem. Vzorky byly poté nanášeny na gradientový polyakrylamidový gel (5-17%) spolu s markerem molekulových hmotností LMW (GE Healthcare). Po skončení elektroforézy byly gely barveny v Coomassie brilliant blue.

3.6 Izolace inkluzních tělísek

Bakteriální pelet byl resuspendován v resuspendačním pufru (20mM Tris-Cl, pH 8), sonikován po dobu 1 minuty a poté stočen při 10 000 g / 10 min / 4°C. Pelet byl dále resuspendován v izolačním pufru (2M močovina, 20mM Tris-Cl, 0,5M NaCl, 10mM imidazol, 1mM 2-merkaptóetanol, 2% Triton X-100, pH 8), sonikován 1 minutu a centrifugován 10 minut při 10 000 g a 4°C. Tento krok byl proveden celkem třikrát. V posledním kroku byl pelet resuspendován v solubilizačním pufru (6M guanidin hydrochlorid, 20mM Tris-Cl, 0,5M NaCl,

5mM imidazol, 1mM 2-merkaptoetanol, pH 8) a byl míchán na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě přes noc. Rozpuštěný pelet byl centrifugován při 10 000 g / 15 min / 4°C a supernatant byl filtrován přes 0,22 µm filtr Millex®GP (Millipore).

3.7 Purifikace proteinu

Fúzní protein s His-tagem na N-konci byl purifikován z rozpuštěných inkluzních tělísek na chelatační koloně s navázanými Ni²⁺ ionty. Jako sorbent byla použita chelatační sefaróza (GE Healthcare). Kolona byla ekvilibrována pufrem A (8M močovina, 0,5M NaCl, 50mM Tris, pH 8,5). Protein byl eluován lineárním gradientem 0,5M imidazolu v pufru B (8M močovina, 0,5M imidazol, 0,5M NaCl, 50mM Tris, pH 8,5). Průběh purifikace byl monitorován spektrofotometricky při $\lambda = 280\text{nm}$ a vybrané frakce byly ověřeny metodou SDS-PAGE.

3.8 Renaturace proteinu

Z 12 ml purifikovaného proteinu byly odebrány 3 ml a vyředěny pufrem A na konečný objem 10 ml o koncentraci 250 µg/ml. Protein byl dialyzován v několika roztocích (**Tab.č.3**), které byly obměňovány každých 12 hodin. K dialýze bylo použito dialyzační střevo VISKING® (Serva) o průměru 16 mm. Mezi čtvrtým a pátým roztokem bylo dialyzační střevo vyměněno za nové.

Tab.č.3: Složení dialyzačních roztoků při renaturaci rekombinantního proteinu

1. roztok	2. roztok	3. roztok	4. roztok	5. roztok
4M močovina 150mM NaCl 50mM Tris-Cl 20% Glycerol 20mM merkaptetanol	2M močovina 150mM NaCl 50mM Tris-Cl 20% Glycerol 20mM merkaptetanol	1M močovina 150mM NaCl 50mM Tris-Cl 20% Glycerol 20mM merkaptetanol	150mM NaCl 50mM Tris-Cl 20% Glycerol 20mM merkaptetanol	150mM NaCl 50mM Tris-Cl
V= 0,5 l, pH 8,5	V= 0,5 l, pH 8,5	V= 0,5 l, pH 8,5	V= 0,5 l, pH 8,5	V=0,5 l, pH 8,5

3.9 Příprava králičích polyklonálních protilátek

150 µg renaturovaného proteinu bylo smícháno s 500 µl nekompletního Freundova adjuvans na finální objem 1 ml a bylo subkutánně injikováno do králíka. Imunizace byla opakována čtyřikrát v 10-14ti denních intervalech. Krev byla odebrána deset dní po poslední injikaci (dle Kopáček et al., 2003). Krev se nechala stát přes noc při 4°C a poté bylo centrifugací odděleno sérum.

3.10 Izolace imunoglobulinové frakce z králičího séra

10 ml králičího séra bylo smícháno s 20 ml 50mM Na-acetátového pufru (pH 5,2). Za stálého míchání na magnetickém míchadle se v 3 minutových intervalech přidávaly dávky kyseliny kaprylové (celkem 10 dávek po 75 µl). Po 90 minutách míchání byla suspenze centrifugována 10 min při 5000 g, supernatant byl filtrován přes filtrační papír a dialyzován přes noc proti 2 litrům 5mM Na₂HPO₄ při 4°C.

3.11 Purifikace specifických protilátek metodou afinitní chromatografie

Příprava fúzního proteinu k navázání na kolonu

Fúzní katepsin C byl postupnou dialýzou (roztoky viz **Tab.č.4**) převeden z pufru A do vazebného pufru (0,5M NaCl, 100mM NaHCO₃, pH 8,3).

Tab.č.4: Složení dialyzačních roztoků pro vazbu rekombinantního proteinu na afinitní kolonu

1. roztok	2. roztok	3. roztok	4. roztok	5. roztok
4M močovina 150mM NaCl 100mM NaHCO ₃ 20% Glycerol 20mM merkaptóetanol	2M močovina 0,5M NaCl 100mM NaHCO ₃ 20% Glycerol 20mM merkaptóetanol	1M močovina 0,5M NaCl 100mM NaHCO ₃ 20% Glycerol 20mM merkaptóetanol	0,5M močovina 0,5M NaCl 100mM NaHCO ₃ 20% Glycerol 20mM merkaptóetanol	0,5M NaCl 100mM NaHCO ₃
V= 0,5 l, pH 8,3	V= 0,5 l, pH 8,3	V= 0,5 l, pH 8,3	V= 0,5 l, pH 8,3	V= 0,5 l, pH 8,3

Příprava afinitní kolony

0,5 g CNBr-aktivované sefarózy 4B (GE Healthcare) bylo suspendováno v 20 ml 1mM HCl a mícháno plastovou lžičkou 30 min. Nabobtnalá sefaróza byla přenesena do nálevky s fritou a promývána 15 minut roztokem 1mM HCl a poté resuspendována ve vazebném pufru (0,5M NaCl, 100mM NaHCO₃, pH 8,3). Následně se k resuspendované sefaróze přidalo 2,5 mg rekombinantního katepsinu C. Směs se nechala 2 hodiny míchat na rotačním inkubátoru za laboratorní teploty a poté se centrifugovala 10 min při 40 g. Pro obsazení volných aktivovaných CNBr míst bylo k peletu přidáno 10 ml blokovacího pufru (0,2M Glycin, pH 8) a inkubace probíhala 16 hodin při 4°C. Supernatant byl odebrán Pasteurovou pipetou a pelet byl v nálevce s fritou celkem pětkrát střídavě promýván vazebným pufrům a octanovým pufrům (0,5M NaCl, 0,1M octan amonný, pH 4). Nakonec byla sefaróza resuspendována ve sterilním PBS pufru (phosphate buffered saline) a přenesena do kolony, ve které tvořila stacionární fázi.

Afinitní chromatografie

Kolona byla ekvilibrována sterilním PBS pufrům a na kolonu byla nanášena izolovaná Ig frakce při průtoku 0,1 ml/min. Aparatura byla znovu ekvilibrována sterilním PBS pufrům do dosažení základní linie. Protilátky byly eluovány kyselým pufrům (0,2M glycin, 0,15M NaCl, pH 2,2). Průběh chromatografie byl monitorován spektrofotometricky při $\lambda = 280$ nm. Vybrané frakce byly zneutralizovány roztokem 1M Trisu. Přítomnost protilátek ve vybraných frakcích byla ověřena pomocí Dot blot analýzy na nitrocelulóзовé membráně (NC) (Biometra®). Na NC membránu byla nanášena různá ředění rekombinantního katepsinu C, který byl detekován primárními protilátkami v jednotlivých frakcích. Jako sekundární protilátky byly použity SwAR/Px (Sevapharma a.s.). Výsledek byl vizualizován v 0,1M Tris-Cl (pH 7,5) pomocí DAB barvení (0,6% 3,3'-diaminobenzidinu) a 0,03% peroxidu vodíku.

3.12 Dynamika exprese Katepsinu C ve střevě *I. ricinus*

Příprava střevních homogenátů

Vypitvaná střeva samic klíštěte byla vyprána v PBS pufru a následně zhomogenizována v 1,5 ml mikrozkuvkách v přítomnosti 5x SDS-PAGE vzorkového pufru a dithiotreitolu, povařena a stočena při 15 000 rpm / 5 min. Supernatant byl skladován v -80°C.

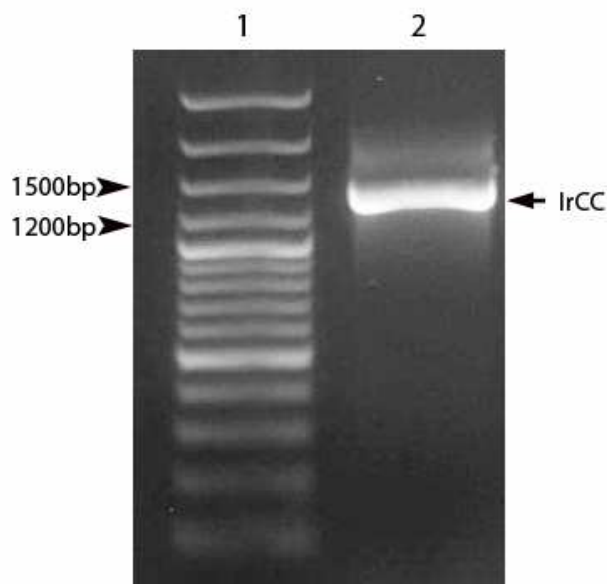
Western blot

Proteiny homogenátu střevní tkáně samic v různém čase sání byly rozděleny pomocí SDS-PAGE. Po ukončení elektroforézy byl gel s membránou a filtračními papíry ekvilibrován v blotovacím pufru (25mM Tris, 192mM glycin, 0,02% SDS) s metanolem. Proteiny byly přenášeny na Polyvinyliden-fluoridovou membránu (PVDF) (Millipore) po dobu 90 min za konstantního proudu 200 mA. Po ukončení přenosu byla kontrolní část membrány obarvena v Coomasie brilliant blue. Membrána byla následně inkubována 60 min v 5% roztoku mléka za účelem vyblokování nespecifických míst. Po promytí v PBS-Tweenu byla přidána 100x naředěná purifikovaná primární anti-IrCC protilátka. Jako sekundární protilátka byla využita 1000x naředěná SwAR/Px protilátka (Sevapharma a.s.). Western blot byl vyvolán v 0,1M Tris-Cl pomocí DAB barvení a 0,03% peroxidu vodíku.

4. Výsledky a diskuze

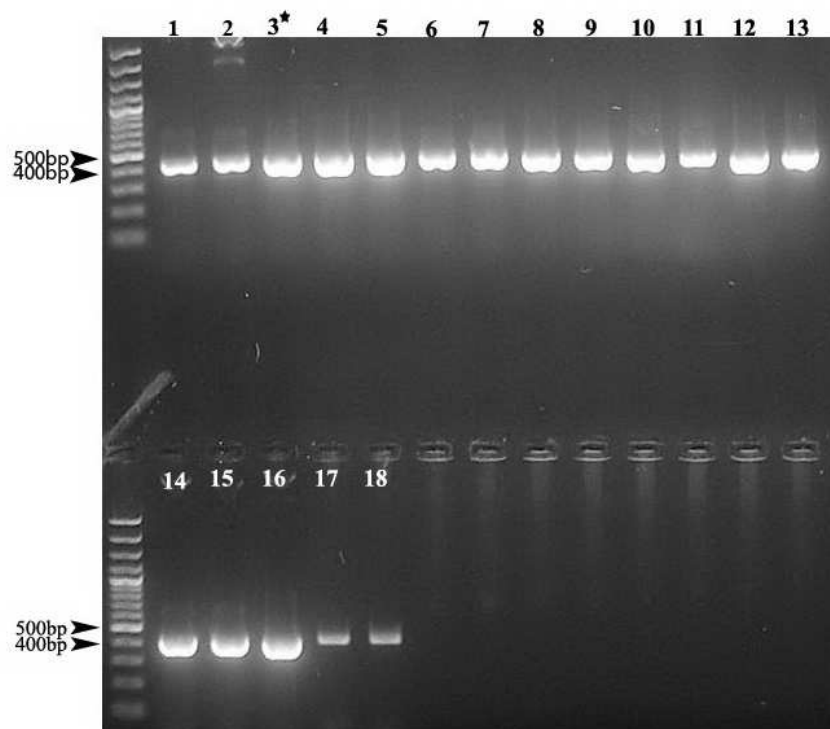
4.1 Amplifikace genu pro IrCC

Gen pro IrCC byl amplifikován ze střevní cDNA klíštěte *Ixodes ricinus* pomocí specifických primerů (**Tab.č.2**). Primery byly navrženy tak, aby zahrnovaly pouze translatovanou oblast bez signálního peptidu. Z tohoto důvodu je PCR amplikon kratší (přibližně 1350bp), než je udávaná velikost IrCC cDNA (Sojka et al. 2008).



Obr.č.4: Amplifikace genu pro IrCC. 1 – DNA ladder (GENE RULER™ 100bp DNA Ladder PLUS), 2 - IrCC

Získaný produkt byl následně přečištěn, zaklonován do expresního vektoru (pET 100/D-TOPO®) a transformován do kompetentních One Shot® Top 10 buněk. Tento expresní vektor neumožňuje modrobílou selekci, proto je nutné ověřit pozitivní klony pomocí PCR reakce. Použité primery jsou uvedeny v **Tab.č.2**. Očekávaná velikost amplikonu byla 447bp (**Obr.č.5**).



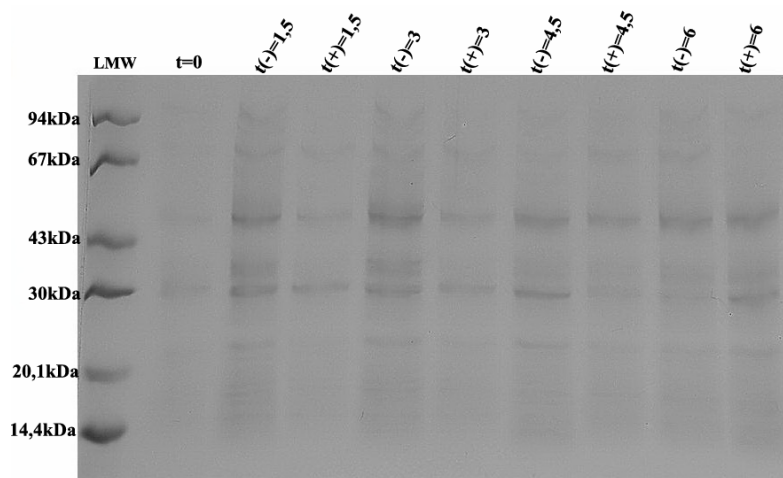
Obr.č.5: Plazmidová kontrolní PCR. Plazmidy 1-16 byly sekvenovány z 5' konce (primer T7). Sekvence čtyř z nich byly vyhodnoceny jako pozitivní, a proto byly sekvenovány i z 3' konce (T7R primer). Z těchto čtyř byl vybrán plazmid (označen hvězdičkou) vhodný pro transformaci do expresních buněk.

4.2 Expese rekombinantního IrCC

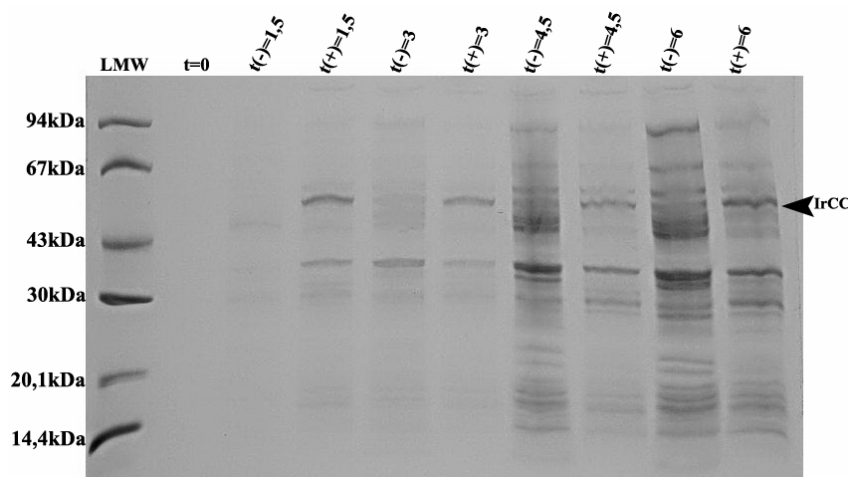
Sekvenací ověřený plazmid byl transformován do BL21 Star™ (DE3) One shot® chemicky kompetentních *E. coli* buněk.

Pilotní expese

Před vlastní expresí byla provedena pilotní expese, abychom zjistili, zda se rekombinantní protein akumuluje v rozpustné (**Obr.č.6**) nebo nerozpustné (**Obr.č.7**) frakci proteinů.

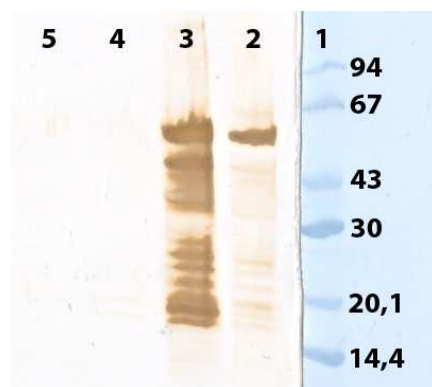


Obr.č.6: SDS-PAGE rozpustné frakce proteinů z pilotní exprese IrCC. t = 0 – exprese v čase 0h; (-) = neindukovaná kultura; (+) = kultura indukovaná IPTG; časy jsou uvedeny v hodinách.



Obr.č.7: SDS-PAGE nerozpustné frakce proteinů z pilotní exprese IrCC. t = 0 – exprese v čase 0h; (-) = neindukovaná kultura; (+) = kultura indukovaná IPTG; časy jsou uvedeny v hodinách.

Protein odpovídající velikosti rekombinantního IrCC byl na gradientovém polyakrylamidovém gelu detekován v nerozpustné frakci u indukovaných buněk (**Obr.č.7**), nicméně nebyla pozorována jeho zvýšená exprese s časem po indukci. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli ověřit přítomnost IrCC metodou Western blotu (**Obr.č.8**). K detekci byly použity 2000x naředěné myší monoklonální protilátky proti His-tagu (SIGMA) na N-konci proteinu.



Obr.č.8: Detekce IrCC pomocí anti His-tagových protilátek. 1 – LMW; 2 – nerozp. frakce neindukovaných buněk v čase $t = 6h$; 3 – nerozp. frakce indukovaných buněk v čase $t = 6h$; 4 – rozp. frakce indukovaných buněk v čase $t = 6h$; 5 – rozp. frakce neindukovaných buněk v čase $t = 6h$.

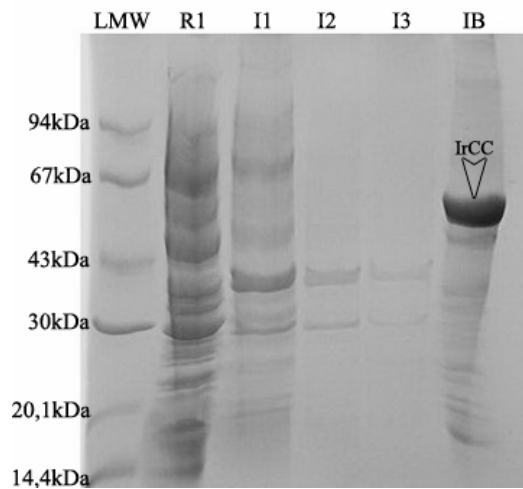
Western blot nám potvrdil přítomnost IrCC v nerozpustné frakci proteinů. Nízká míra exprese rekombinantu byla pozorována i v neindukované nerozpustné frakci. U obou nerozpustných frakcí byly detekovány bandy o menší velikosti než je teoretická velikost IrCC. Podle odlišné intenzity těchto bandů u indukované a neindukované frakce je zřejmé, že se jedná o fragmenty degradované rekombinantního IrCC. Ty nejspíš vznikly působením proteolytického aparátu *E. coli*, protože podle výsledků Dahla et al. (2001) u lidského katepsinu C není tento enzym schopen autokatalýzy.

Expresa IrCC

Expresa IrCC byla prováděna v 1 litru LB média s 1% glukózou. Po indukci a inkubaci byla kultura rozaliquotována po 200 ml a jednotlivé alikvoty byly centrifugovány při 4500 g / 10 min. Pelety byly skladovány při -20°C .

Izolace inkluzních tělísek

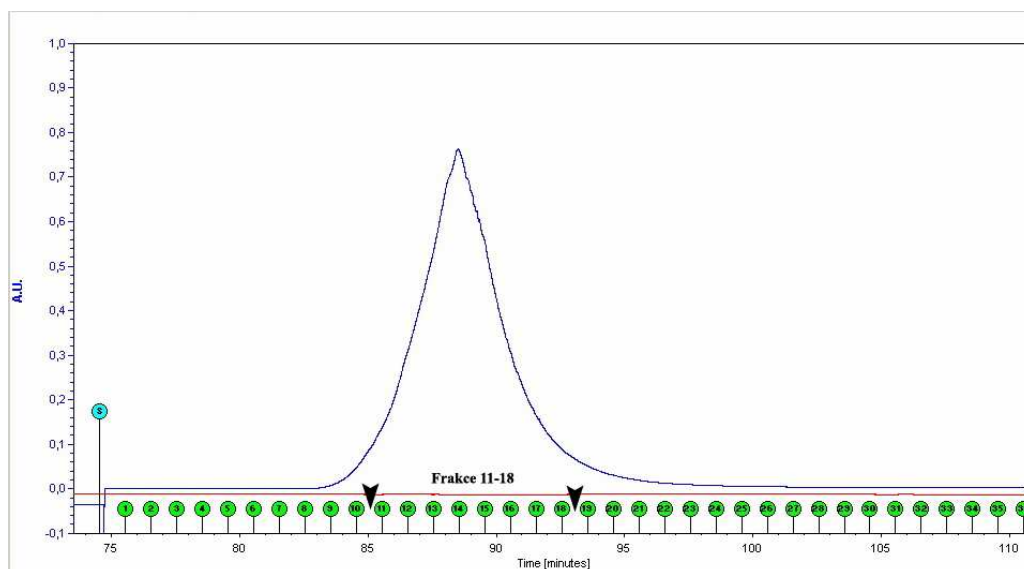
Pelet buněk z 200 ml kultury byl rozmrazen a resuspendován. V prvním kroku byly odmyty rozpustné cytoplazmatické proteiny. V přítomnosti detergentu (Triton X-100) a močoviny byly ve třech krocích postupně odstraněny membránové proteiny. Inkluzní tělíška z výsledného peletu se běžně rozpouštějí v 6M guanidin hydrochloridu za laboratorní teploty na magnetickém míchadle 2-3 hodiny. Osvědčilo se nám nechat pelet míchat přes noc. Výsledkem je větší výtěžek proteinu. (**Obr.č.9**)



Obr.č.9: SDS-PAGE izolovaných frakcí. Agregace overexprimovaného IrCC do inkluzních tělísek. LMW – marker; R1 – cytoplazmatické proteiny; I1, I2, I3 – membránové proteiny; IB – inkluzní tělíska. Teoretická hmotnost IrCC s His-tagem je 52,8 kDa.

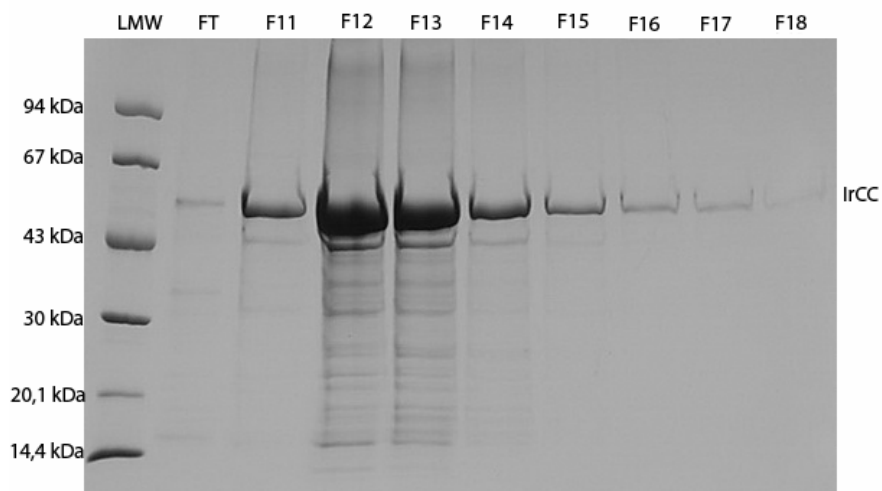
Purifikace IrCC

Rozpuštěná inkluzní tělíska byla dále purifikována chelatační chromatografií za přítomnosti 8M močoviny. Chelatační chromatografie využívá afinity 6xHis-tagu k Ni^{2+} iontům navázaným na sefáráze. IrCC byl detekován spektrofotometricky a chromatogram z eluce proteinu je na **Obr.č.10.**



Obr.č.10: Záznam eluce IrCC z chelatační kolony. Tyrkysové kolečko - počátek eluce; zelená kolečka – jednotlivé frakce; šipky ohraničují frakce, které byly určeny jako pozitivní. Osa y znázorňuje absorbanci při $\lambda=280\text{nm}$.

Rekombinantní protein byl eluován gradientem 0,5M imidazolu. Prvotní nárůst absorbance byl zaznamenán při 0,125M koncentraci imidazolu. Vybrané frakce byly ověřeny pomocí SDS-PAGE (**Obr.č.11**).



Obr.č.11: Ověření přítomnosti rekombinantního IrCC po purifikaci na Ni²⁺ chelatační koloně. LMW – marker, FT – „flowthrough“ (proteiny, které se na kolonu nenačly a protekly), F11-18 – frakce vybrané na základě chromatogramu (**Obr.č.10**)

Ověřené frakce (F11-F18) byly slity dohromady a byla změřena výsledná koncentrace na přístroji Qubit™ (Invitrogen). Purifikací IrCC z 200 ml kultury bylo získáno 12 ml rekombinantního proteinu o koncentraci 800 µg/ml, tedy téměř 10 mg čistého rekombinantního IrCC. Z 1 litru kultury by se tedy dalo teoreticky připravit až 50 mg čistého rekombinantního proteinu. Overexpresí v *E. coli* se tedy dá vyrobit dostatek rekombinantního proteinu pro další analýzy, jako je například získání krystalické struktury katepsinu C.

4.3 Příprava králičích polyklonálních protilátek a jejich purifikace

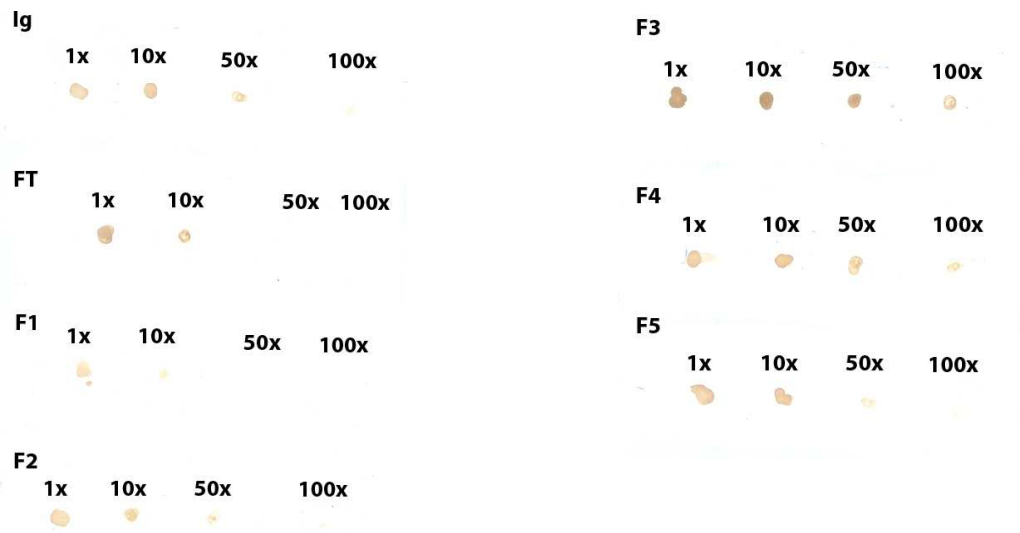
Před vlastní imunizací bylo 2,5 mg rekombinantního zrenaturovaného proteinu převedeno do pufru s 50mM Trisem a 150mM NaCl o pH 8,5. Renaturace zvyšuje specifitu protilátek tím, že na rekombinantním proteinu vzniknou epitopy, které mohou být shodné s epitopy na nativním proteinu.

Polyklonální sérum bylo získáno opakovanou imunizací králíka purifikovaným rekombinantním IrCC podle zavedeného imunizačního protokolu (Kopáček et al., 2003).

Z výsledků imunolokalizací katepsinu B1 a L v tkáňových řezech víme, že králičí polyklonální protilátky vykazují vysokou nescifickou vazbu protilátek (Pěničková, 2009), která se dá výrazně snížit purifikací polyklonálních protilátek. Ta probíhá ve dvou krocích.

V prvním kroku byla ze séra izolována imunoglobulinová frakce metodou kyselého selektivního srážení. Tzv. balastní (nežádoucí) proteiny se denaturují a srážejí změnou pH séra do kyselé oblasti, zatímco imunoglobuliny se v kyselém prostředí pouze inaktivují, ale k denuraci a precipitaci nedochází (Raweerith et. Ratanabanangkoon, 2003). Po převedení do neutrálního pH se jejich aktivita regeneruje.

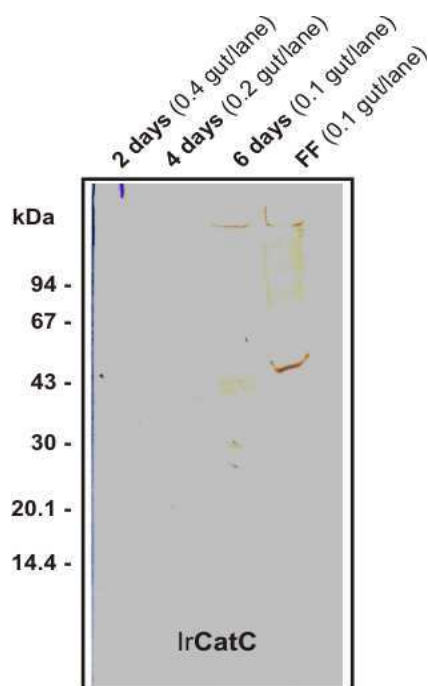
Ve druhé fázi byl refoldovaný rekombinantní protein navázán na aktivovanou sefarózu a byl použit jako stacionární fáze pro purifikaci specifických protilátek proti katepsinu C metodou afinitní chromatografie. Jako eluční roztok byl použit kyselý glycinový pufr. Průběh byl monitorován spektrometricky při $\lambda = 280\text{nm}$. Frakce byly jímány po 2,5 ml a poté byly zneutralizovány pomocí 1M Trisu. Přítomnost protilátek v jednotlivých frakcích byla ověřena metodou Dot blot (**Obr.č.12**). Výtěžek protilátek byl 50 g/ml ve finálním objemu 10 ml.



Obr.č.12: Ověření kvality protilátek v jednotlivých frakcích po afinitní chromatografii na IrCC-sefaróze metodou Dot blot. Ig – Ig frakce protilátek, která byla nanesena na kolonu; FT – protilátky, které se nenavázaly na kolonu; F1-F5 – jednotlivé frakce po eluci z kolony. Číselná hodnota s písmenem x vyjadřuje ředění rekombinantního proteinu naneseného na membránu.

4.4 Dynamika exprese IrCC ve střevě *I. ricinus*

Metodou Western blot pomocí purifikovaných protilátek se zjišťovalo, v jaké fázi sání dochází k expresi IrCC ve střevě klíštěte *I. ricinus*. Pro pokus byly použity střevní homogenáty samic klíštěte v různém dni sání (2., 4., 6. den sání a plně nasáté).



Obr.č.13: Dynamika exprese IrCC ve střevě samic *I. ricinus*. Profil exprese IrCC ve střevě 2., 4., 6. den sání a u plně nasatých samic. Údaj v závorce udává množství homogenátu naneseného na gel.

Podle Sojka et al. (2008) je teoretická hmotnost proenzymu IrCC přibližně 49 kDa. Horn et al. (2009) zjistil pomocí aktivní próby FY01, že proenzym je proteolyticky štěpen a že aktivní katepsin C má hmotnost kolem 25 kDa. V žádné fázi sání nebyl detekován protein odpovídající velikosti aktivního enzymu (**Obr.č.13**). Jedním z důvodů může být ztráta epitopu pro primární protilátky po odštěpení pro-domény. U lidského katepsinu C Dahl et al. (2001) dokázal, že proenzym katepsinu C je aktivován proteolytickou aktivitou katepsinu L. U *I. ricinus* se dá předpokládat stejný mechanismus. Důvodem, proč se IrCC vyskytuje u plně nasatých samic pouze ve formě proenzymu je, že katepsin L, potřebný pro aktivaci proenzymu, se exprimuje ve 4. - 6. dni sání a u plně nasatých samic míra jeho exprese ve střevě výrazně klesá.

Závěr

Byl zaklonován gen pro katepsin C do pET 100 vektoru. Byl připraven rekombinantní katepsin C v expresním systému *E.coli*. Pomocí rekombinantního proteinu byly získány králičí polyklonální protilátky a následně purifikovány. Byla určena dynamika exprese katepsinu C ve střevě klíštěte *I. ricinus*.

5. Literatura

- Balashov, Yu.S., 1972. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) – vectors of disease of man and animals (English translation). Misc. Publ. Entomol. Soc. Amer. 8, 163-376.
- Barret, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F., 1998. Handbook of Proteolytic Enzymes, Eds., Academic Press, London.
- Caffrey, J.C., McKerrow, J.H., Salter, J.P., Sajid, M., 2004. Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. Trends Parasitol. 20, 241-248.
- Cigić, B., Križaj, I., Kralj, B., Turk, V., Pain, R.H., 1998. Stoichiometry and heterogeneity of the pro-region chain of tetrameric human cathepsin C. Biochim. Biophys. Acta 1382, 143-150.
- Cigić, B., Dahl, S.W., Pain, R.H., 2000. The residual pro-part of cathepsin C fulfills the criteria required for an intramolecular chaperone in folding and stabilizing the human proenzyme. Biochemistry 39, 12382-12390.
- Coons, L.B., Rosell-Davis, R., Tarnowski, B.I., 1986. Bloodmeal digestion in ticks. In: Sauer, J.R., Hair, J.A., Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks. Ellis Horwood, Chichester, 248-279.
- Dahl, S.W., Halkier, T., Lauritzen, C., Dolenc, I., Pedersen, J., Turk, V., Turk, B., 2001. Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not autocatalytic processing. Biochemistry 40, 1671-1678.
- Dolenc, I., Turk, B., Pungercic, G., Ritonja, A., Turk, V., 1995. Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C. J. Biol. Chem. 270, 21626-21631
- Grandjean, O., Ibid, I., 1984. Biochemical changes in the midgut lumen and ultrastructure of the midgut cell related to intracellular digestion. Acarologia 25, 147-165.
- Harris, J.L., Craik, C.H. S., 2000. Proteases: The tip of the iceberg. Cell 101(2). 136-137.
- Horn, M., Nussbaumerová, M., Šanda, M., Kovářová, Z., Srba, J., Franta, Z., Sojka, D., Bogyo, M., Caffre, C.R., Kopáček, P., Mareš, M., 2009. Hemoglobin proteolysis in blood-feeding ticks: mapping of multienzyme pathway by functional proteomics. Chemistry&Biology, *zasláno*.

- Jingze, L., Zhanniu, L., Yan, Z., Xiaolong, Y., Zhihua, G., 2005. Biology of *Dermacentor silvarum* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology* 36, 131-138.
- 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.
- Lara, F.A., Lins, U., Paiva-Silva, G., Almeida, I.C., Braga, C.M., Miguens, F.C., Oliveira, P.L., Dansa-Petreski, 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.
- Lecaille, F., Kaleta, J., Brömme, D., 2002. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and recent developments in inhibitors design. *Chem. Rev.* 102, 4459-4488
- Logan, T.M., Linthicum, K.J., Kondig, J.P., Bailey, C.L., 1989. Biology of *Hyalomma impeltatum* (Acari: Ixodidae) in laboratory conditions. *J. Med. Entomol.* 26, 479-483.
- McKerrow, J.H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., Sajid, M., 2006. Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1, 497-536.
- Ménard, R., Storer, A.C., 1992. Oxyanion hole interactions in serine and cysteine proteases. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373, 393-400.
- Nutall, P.A., 1999. Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zentralbl. Bakteriologie* 289, 492-505.
- Oliveira, M.F., d'Ávila, J.C.P., Torres, C.R., Braga, C.M.S., Tempone, A.J., Rumjanek, F.D., Silva, J.R., Dansa-Petreski, M., Oliveira, M.A., Souza, W., Oliveira, P.L., Ferreira, S.T., 2000. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 217-221.

Pěničková, H., 2009. [Peptidases in digestive cells in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus* – localization and function, Mgr. thesis, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, 40pp.] (in Czech, Unpublished).

Raweerith, R., Ratanabanangkoon, K., 2003. Fractionation of equine antivenom using caprylic acid precipitation in combination with cationic ion-exchange chromatography. *J. Immunol. Methods* 282, 63-72.

Rosenthal, P.J., 2004. Cysteine proteases of malaria parasites. *Int. J. Parasitol.* 34, 1489-1499.

Sajid, M., McKerrow, J.H., 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 1-21.

Schmitt, T.H., Frezzatti, W.A., Schreier, S., 1993. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 96-103.

Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Hajdušek, O., Caffrey, C.R., Mares, 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 New York: Oxford university Press

Williamson, A.L., Brindley, P.J., Knox, D.P., Hotez, P.J., Loukas, A., 2003. Digestive proteases of blood-feeding nematodes. *Trends Parasitol.* 19, 417-423.