

**Přírodovědecká fakulta**  
**Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích**



**Identifikace a izolace genu kódujícího peroxiredoxin,  
detoxifikačního enzymu zapojeného do antioxidantivní  
obranu klíštěte *Ixodes ricinus***

Bakalářská práce

Jiří Havran

2009

vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD.  
Maryna Golovchenko, MSc.  
fakultní garant: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

## **Bakalářská práce**

Havran J., 2009: Identifikace a izolace genu kódujícího peroxiredoxin, detoxifikačního enzymu zapojeného do antioxidantní obrany klíštěte *Ixodes ricinus*. [Identification and isolation gene encoding peroxiredoxin, detoxification enzyme involved in antioxidant defense of hard tick *Ixodes ricinus*.]

Faculty of Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic., BSc. Thesis in Czech, 29 pp.

## **Annotation**

Antioxidant enzymes play an important role in protection against the oxygen radicals generating during aerobic metabolism, as well as in defense against host immune responses. Peroxiredoxin isolated from the hard tick *Ixodes ricinus* belongs to 1CysPrx group of peroxiredoxins. It is expressed in all stages of hard tick (larva, nymph and adult) and in all tissues examined. The full gene (EU373821) is 756 nt long and consists of 251 amino acids, encoding 27.94 kDa protein. This is the first report of isolation of detoxification enzyme (peroxiredoxin) involved in antioxidant defense of hard tick *Ixodes ricinus*.

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

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

V Českých Budějovicích dne: 9. 1. 2009

.....  
Jiří Havran

Rád bych poděkoval svým školitelkám, Nataše Rudenko a Maryně Golovchenko, za poskytnutí zajímavého tématu, cenné rady a pomoc při zpracování této diplomové práce. Děkuji také profesorovi Liborovi Grubhofferovi za možnost pracovat v laboratoři Molekulární biologie vektorů a parazitů. Janě Horáčkové, Tereze Chrudimské a Veronice Dorňákové patří mé díky za jejich pomoc u metodické části a za příjemnou atmosféru v laboratoři.

Svým rodičům bych chtěl poděkovat za jejich podporu a trpělivost při mém studiu.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>6</b>
1.1. Klíště obecné ( <i>Ixodes ricinus</i> ) .....	6
1.2. Interakce klíště – hostitel .....	7
1.3. Slinné žlázy a sliny .....	7
1.4. Oxidativní stres .....	9
1.5. Antioxidantní enzymy .....	9
1.6. Peroxiredoxin .....	10
<b>2. Cíl práce</b> .....	<b>12</b>
<b>3. Materiály a metodiky</b> .....	<b>13</b>
3.1. Použité chemikálie a kity .....	13
3.2. Izolace slinných žláz .....	15
3.3. Izolace RNA .....	15
3.4. Syntéza cDNA .....	15
3.5. PCR .....	15
3.6. Purifikace PCR produktu .....	16
3.7. Ligace PCR produktu do vektoru .....	16
3.8. Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> .....	16
3.9. Izolace plazmidu .....	17
3.10. Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu .....	17
3.11. Příprava rekombinantního proteinu (pilotní experiment) .....	17
3.12. Transformace bakteriálního kmene BL21 Star <sup>TM</sup> (DE3) .....	17
3.13. Expres rekombinantního proteinu (pilotní experiment) .....	17
3.14. Kontrola exprese rekombinantního proteinu .....	18
3.15. Western blotting .....	18
3.16. Imunodetekce rekombinantního proteinu.....	19
3.17. Nativní purifikace .....	19
3.18. Denaturační purifikace .....	19
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>20</b>
4.1. Izolace RNA .....	20
4.2. Syntéza ss cDNA a PCR .....	20
4.3. Expres genu pro peroxiredoxin v jednotlivých stádiích klíštěte <i>I. ricinus</i> .....	21
4.4. Expres genu pro peroxiredoxin v jednotlivých orgánech klíštěte <i>I. ricinus</i> .....	22

4.5. Příprava rekombinantního proteinu se signálním peptidem .....	23
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>26</b>
<b>6. Závěr .....</b>	<b>27</b>
<b>7. Literatura .....</b>	<b>28</b>

# 1. Úvod

## 1.1. Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) patří do řádu *Ixodida*, čeledi *Ixodidae* a podčeledi *Ixoninae*. *Ixodidae* a *Argasidae* jsou dva hlavní rody klíšťat. *Ixodidae* jsou nazývána “tvrdá klíšťata,, protože mají zkonatělý dorzální štítek a jsou nejvýznamnějším rodem z hlediska početnosti a lékařské důležitosti. *Argasidae* jsou nazývána “měkká klíšťata,, protože mají flexibilní kutikulu (1).

Klíště *Ixodes ricinus* je ektoparazit sající krev, který se vyskytuje od západní Evropy až po Írán, lze se s ním setkat i v severní Africe. Jeho biotopem jsou pastviny, louky, jehličnaté i listnaté lesy. Vyskytuje se hlavně v podrostu do 1.5 metru nad zemí. Výskyt klíšťat v této malé výšce je dán hlavně tím, že jsou citlivá na vlhkost prostředí. Relativní vlhkost je nejvyšší těsně nad zemí a směrem nahoru klesá. Larvy, které jsou nejvíce citlivé na vyschnutí, jsou přichyceny na vegetaci jen několik málo centimetrů nad zemí. Nymfy, které jsou odolnější na vyschnutí, jsou přichycena výše na vegetaci ([http://www.ecmost.cz/cd/data/zdravi/prirod\\_nakazy/kliste.htm](http://www.ecmost.cz/cd/data/zdravi/prirod_nakazy/kliste.htm)).

Klíště *I. ricinus* má 4 vývojová stadia (vajíčko, larva, nymfa, dospělec), z nichž tři sají na třech různých hostitelích. Z vajíček se líhnou larvy s třemi páry nohou, které sají na menších savcích, ptácích, ale i na plazech. Po nasátí trvajícím 2 – 6 dní prodělávají přeměnu v nymfy s čtyřmi páry nohou, které sají na středně velkých savcích. Následuje poslední metamorfóza na dospělé, kteří sají na větších savcích. Každé ze třech vývojových stádií saje krev jen jednou a každé z nich může napadnout i člověka. Pro klíště *Ixodes ricinus* je obvyklý tříletý životní cyklus a je ukončen naklazením vajíček a smrtí (<http://www.cz-pes.cz/encyklopedie-detail.php?detail=49>).

Klíšťata představují významnou skupinu členovců, která přenáší nejrozmanitější patogeny (viry, bakterie, prvoky). Tyto patogeny se dostanou do klíštěte během sání na infikovaném hostiteli, většinou během stádia larvy. K nejznámějším infekcím přenášenými klíšťaty patří klíšťová encefalitida (TBE virus), lymská borelióza (způsobená spirochétami komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato), omská hemoragická horečka (OHM virus), skotská klíšťová encefalitida (LI virus), středomořská horečka (*Rickettsie conorii*), Q horečka (*Coxiella burnetii*) a další.

## 1.2. Interakce klíště - hostitel

Úspěšný příjem potravy je životně důležitý proces pro dokončení životního cyklu klíštěte. V místě sání dochází k poškození kůže, které vede k zánětlivé reakci (4) a možnému přesunu patogenů do hostitele.

Samotný proces sání může trvat i několik dní, což vede k tomu, že si hostitel může vytvořit specifickou imunitu, která se rozvíjí po opakovaném nebo dlouhodobém sání klíštěte (3). Stejně jako ostatní členovci i klíšťata mají dva typy imunitní odpovědi (5). První je buněčná odpověď, která zahrnuje enkapsulaci (6), nodulaci (5) a fagocytózu. Humorální odpověď je druhou částí imunitní reakce v klíšťatech, která zahrnuje proteiny představující molekulární faktory rozpoznání vlastní/cizího (vrozená imunita). Ty jsou zahrnuty v obranných reakcích nebo v rozpoznání patogenů, stejně jako efektorové molekuly s enzymatickou aktivitou (proteázy v kaskádě inaktivních enzymů, proteinových inhibitorů proteáz) (7, 8, 9). Součástí specifické imunity jsou T a B lymfocyty, ve kterých dochází ke vzniku paměťových buněk. Během sání klíště vpravuje do hostitele pomocí slin látky, které mají imunosupresivní, antikoagulační a vazodilatační aktivitu. V důsledku imunosuprese se snižuje rychlost prolyferace T i B lymfocytů. Doba klíštěcího sání má také důležitou roli na poklesu prolyferace. Naopak u nespecifické imunitní odpovědi, která zahrnuje makrofágy, NK buňky, granulocyty, žírné a dendritické buňky, proteiny akutní fáze, je reakce rychlá.

## 1.3. Slinné žlázy a sliny

Slinné žlázy jsou orgány, které syntetizují a sekretují bioaktivní látky spojené s procesem krmení. Slinné žlázy se také účastní přichycení na hostiteli, ochrany před dehydratací a navrácení nadměrného množství tekutin z krve zpět do hostitele (1).

Slinné žlázy klíšťat produkují sliny obsahující bioaktivní látky a farmakologicky aktivní molekuly, které jsou rozhodující při spojení s hostitelem a přenosu patogenů. Pracují tak, že interagují s hostitelskými procesy, které zahrnují koagulaci, imunitu a zánět (2). Faktory v slinných žlázách nebo ve slinách zahrnují cement pomáhající při přichycení na hostiteli, různé enzymy a inhibitory, histaminové agonisty a antagonisty, prostaglandiny, antihemostatické faktory a imunomodulační faktory (9).

## **Antikoagulanty**

Hemostatická odpověď umožňuje savcům kontrolovat krevní ztráty během cévního poškození. Krevní destičky adherují na makromolekulách na odkrytých subendoteliálních tkáních a hromadí se v místě poškození, zatímco lokální aktivace plasmatických koagulačních faktorů vede k vytváření krevní sraženiny tak, že vyztuží nahromaděné krevní destičky. Koagulační kaskáda začíná, když se odkrytý subendoteliální tkáňový faktor váže na aktivovaný faktor VII. Tento komplex aktivuje faktor X, který zprostředkovává utváření nepatrného množství trombinu, který aktivuje ostatní koagulační proteázy a další krevní destičky. Krmení klíštěte je bržděno hemostatickou odpovědí hostitele. Avšak sliny klíštěte obsahují široký výběr molekul, které působí proti koagulaci, krevnímu srážení a brání usazování krevních destiček (2). Klíštěcí sliny obsahují apyrázu, která inhibuje nahromadění krevních destiček hydrolýzou ATP a ADP na AMP a monofosfát. Prostaglandin I<sub>2</sub> zvýší koncentraci cAMP v krevních destičkách, inhibuje sekreci ADP a také inhibuje hromadění krevních destiček. To způsobí rozpuštění destiček, které se již nahromadily v místě poškození (1). Obvyklé antikoagulační prostředky heparin a warfarin (antagonista vitamínu K) mají nízký terapeutický index vyžadující časté sledování a přizpůsobení dávkování (2). Antikoagulanty TAP a ixolaris inhibují koagulaci faktoru Xa, serin proteináza katalyzuje vytváření trombinu, zatímco ornithodorin, americanin a ixin jsou specifické inhibitory trombinu (1). Další koagulační inhibitory ve slinách klíšťat jsou např. penthalaris, microphilin, savegnin, madanin, varieglin, klíštěcí antikoagulační peptidy (2).

## **Imunosupresory**

Důležitou částí vrozeného obranného systému je kaskáda komplementu. Aktivace komplementu vede k opsonizaci, formování membránového útočného komplexu a aktivaci antigen prezentujících buněk. Ty prezentují antigeny T lymfocytům, které při aktivaci hrají hlavní roli v buněčné imunitní odpovědi v místě infekce nebo asistují při aktivaci B lymfocytů pro tvorbu antigen specifické humorální odpovědi. Klíšťata, narážející na tuto bariéru, mají vyvinutý mechanismus, který je chrání před hostitelskou imunitní odpovědí. Sliny klíšťat obsahují molekuly, které specificky inhibují aktivaci komplementu. Slibný inhibitor komplementu je OMCI z klíštěte *O. moubata*. OMCI inhibuje aktivaci komplementárního faktoru 5 (C5) zasahováním do C5 konvertázy. Buněčný inhibiční protein B (BIP) klíštěte *I. ricinus*



potlačuje proliferaci myších B lymfocytů. B lymfocyty jsou neschopné adekvátně reagovat na antigeny *Borrelia burgdorferi* v přítomnosti BIP, což značí, že *B. burgdorferi* by mohla mít užitek z BIP-zprostředkující potlačení B lymfocytů. Salp15 z klíštěte *I. scapularis* je krměním indukovaný protein, který inhibuje aktivaci T lymfocytů. Salp15 se specificky váže na CD4 molekulu, což způsobí inhibici T buněčné receptor-zprostředkované signalizace vedoucí k snížení produkce interleukinu 2 a poruch proliferace T lymfocytů (2).

#### 1.4. Oxidativní stres

Buňky rostoucí aerobně jsou vystaveny ROS (reactive oxygen species), které se vytváří při metabolismu. ROS zahrnuje peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ), hydroxylový radikál (OH) a peroxidový anion ( $O_2^-$ ), který může poškozovat proteiny, lipidy a DNA (11). Oxidativní stres nastává, když buněčné obranné mechanismy jsou neschopné vyrovnat se ROS. Proti účinkům ROS si organismy vytvářejí specifické antioxidantní enzymy.

U hemocytů z klíštěte *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* byla ukázána produkce ROS při fagocytóze (12). Produkce ROS u hemocytů byla pozorována také při invazi vosího parazitoida *Leptopilina boulardi* v *Drosophila melanogaster* (13). Silná indukce cytochromu c při expresi oxidázy ve střevu, slinných žlázách a hemolymfě u *Ixodes ricinus* mohou být nepřímo související s produkcí ROS po procesu krmení. Kyslík je redukován na vodu cytochromem c oxidázou v konečné reakci u mitochondriálního dýchacího řetězce. Významný podíl na přeměně kyslíku na ROS mají komplexy I a III (14). Spíše než přímé poškození produkcí ROS, zvýšení cytochromu c oxidázy může být ukazatel navýšení počtu mitochondrií v hemolymfě. To může být v důsledku zvýšení počtu hemocytů přítomných v hemolymfě u *I. ricinus* po infekci *B. burgdorferi* (15) nebo počtem mitochondrií na hemocyt. Alternativně to může odrážet biochemickou aktivitu jednotlivých mitochondrií po infekci. Zvýšení počtu mitochondrií přítomných v hemolymfě může vysvětlit zvětšení ROS pozorované u *B. boophilus* a *D. melanogaster* po infekci patogenem.

#### 1.5. Antioxidantní enzymy

Přírodní antioxidantní enzymy vytvářené u parazitujících organismů poskytují důležitou obranu proti kyslíkovým radikálům, které se vytvářejí během aerobního metabolismu, a také obranu proti hostitelské imunitní odpovědi. Organismy mají

vyvinut soubor obranných systémů ke zmírnění poškozujících účinků při ROS, které je vytvářeno během aerobního metabolismu. Tento systém zahrnuje antioxidantní enzymy, jako jsou superoxid dismutáza, glutathione peroxidáza, cataláza, thioredoxin reduktáza, heme oxygenáza a glutathione reduktáza. Tyto proteiny hrají nejdůležitější roli při detoxifikaci oxidantních sloučenin. Parazité narážejí na ROS vytvářené hostitelskými imunitními buňkami během doby, kdy jsou v interakci s jejich hostitelem. Zde mohou hrát antioxidantní enzymy dvojitou roli v ochraně parazita proti vnitřnímu i vnějšímu ROS poškození (16).

## 1.6. Peroxiredoxin

Peroxiredoxin patří do široké skupiny thiol-specifických antioxidantních enzymů (17), které hrají důležitou roli v ochraně proti kyslíkovým radikálům. Antioxidantní aktivita peroxiredoxinu je v důsledku redukce peroxidu vodíku s thioredoxinem přímým vodíkovým donorem. Členové peroxiredoxinové rodiny mohou být rozděleni do dvou skupin podle přítomnosti jednoho nebo dvou vysoce uchovaných cysteinových zbytků (16).

1CysPrx skupina je skupina peroxiredoxinů, která obsahuje jeden uchovaný cystein, který slouží jako peroxidatický cystein. Jsou to homodimerické, thiol-specifické antioxidantní (TSA) proteiny, které prokazují ochrannou roli v buňkách pomocí redukce a detoxifikace peroxidu vodíku, peroxynitritu a organických vodíkových peroxidů. Oxidační enzym je štěpen externí malou molekulou nebo proteinem, které souží jako redukční činidla, jako je thioredoxin nebo glutaredoxin. Tato skupina peroxiredoxinů se objevuje jak u živočichů tak u rostlin.

Typická 2CysPrx skupina má stejnou redukční ochrannou aktivitu v buňkách jako 1CysPrx skupina. Je zde využita jedinečná mezimolekulová redukční aktivita disulfidického centra. Při reakci s peroxidem je jeho peroxidový cystein oxidován doprostřed sulfenické kyseliny, která je rozštěpena díky vazbě s cysteinem z další podjednotky homodimeru. Tato mezimolekulová vazba je poté štěpena thioredoxinem nebo tryparedoxinem.

Atypická 2CysPrx typ V a II skupina (HsPrxV) obsahuje homodimerické peroxidázy, exprimované a nalezené v mitochondriích, peroxizómech a cytosolu. HsPrxV má důležitou antioxidantní roli, stejně jako roli v kontrole signální transdukce. HsPrxV je schopen rozštěpit tento meziprodukt vytvořením mezimolekulové disulfidické vazby s jeho C-terminálním cysteinem, který může být poté redukován TRX. Avšak tento štěpený cystein není uchovaný u ostatních členů této skupiny.

Atypická 2-cys peroxiredoxinová skupina, TRX dependentní thiol peroxiáza (TPx) je bakteriální periplasmatická peroxidáza, která se liší od ostatních peroxiredoxinů v tom, že vykazuje substrátovou specifitu směrem k alkylu hydroperoxidu přes peroxid vodíku. TPx je schopen štěpit tento meziprodukt vytvořením mezimolekulové disulfidické vazby se zachovaným C-terminálním cysteinem, který může být poté redukován thioredoxinem.

Atypická 2-cys peroxiredoxinová skupina typu Q a bakterioferritin comigratory protein (BCP) skupina. BCP vykazuje substrátovou selektivitu směrem k mastné kyselině hydroperoxidu radši, než k peroxidu vodíku nebo alkylu peroxidu. BCP obsahuje peroxidatický cystein, ale zdá se, že nemá štěpící cystein. BCP existuje jako monomer (18, 19, 20).

Dodnes byl peroxiredoxin izolován a klonován z různých organismů, u kterých se předpokládá, že u nich má Prx fyziologickou důležitost. U savců byl Prx identifikován v různých orgánech a buňkách např. v mozku či u makrofágů. U endoparazitů byl Prx pozorován jako nejdůležitější detoxifikační enzym pro jejich přežití. Produkce a použití antioxidantních enzymů není dobře probádáno u ektoparazitů zahrnující klíšťata. Z klíštěte *Haemaphysalis longicornis* byl izolován peroxiredoxin HlPrx. HlPrx je peroxiredoxin skupiny 1-Cys, který je sekretován ze slinných žláz jako hlavní antioxidantní enzym během normálního životního cyklu i během sání na hostiteli. Exprese thioredoxin peroxidázy je silně indukována ve slinných žlázách a slabě ve střevu po krmení u klíštěte *Haemaphysalis longicornis* (21).

## 2. Cíl práce

- Literární studie k problematice oxidativního stresu a antioxidantivní obraně.
- Literární studie role antioxidantivních enzymů a jejich zapojení do obrany proti kyslíkovým radikálům vytvářejících se během aerobního metabolismu, a také obranu proti hostitelské imunitní odpovědi.
- Po krmení klíšťat na hostiteli purifikovat totální RNA a syntetizovat cDNA klíštěte, obohacenou o geny kódující proteiny indukované krmením.
- Na základě známých sekvencí peroxiredoxinů navrhnout PCR primery pro amplifikaci a následnou izolaci genu kódující peroxiredoxin *Ixodes ricinus*, detoxifikační enzym zapojený do antioxidantivní obrany klíštěte.
- Zaklonovat gen kódující peroxiredoxin klíštěte *Ixodes ricinus* do bakteriálního expresního vektoru. Provést pilotní indukci peroxiredoxinu.
- Interpretace výsledků.

### 3. Materiály a metodiky

#### 3.1. Použité chemikálie

Název roztoku	Složení
10x TBE pufr	dd H <sub>2</sub> O, 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA, 0.89 M kyselina boritá, 0.89 M Tris-HCl
1x TBE pufr	10x TBE pufr 10x zředěný v dd H <sub>2</sub> O
50x TAE pufr	200 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA
1x TAE pufr	50x TAE pufr 50x zředěný v dd H <sub>2</sub> O
EtBr	Ethidium bromide 10 mg/ml
Agaróza I	1% agaróza pro DNA ELFO v 1x TAE pufru
Agaróza II	1.2% agaróza pro RNA ELFO v 1x TBE pufru
RNA Ladder	
6x Loading dye (RNA)	0.25% (w/v) bromphenol blue, 0.25% (w/v) xylene cyanol, 30% (w/v) glycerol, 1.2% SDS, 60 mM sodium phosphate, 500x SYBR Green; pH 6.8
DNA Ladder plus 1000bp	
5x Loading dye (DNA)	20% Ficoll, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mg/ml Orange G, 500x SYBR Green
dd H <sub>2</sub> O	Destilovaná deionizovaná voda

#### Média pro kultivaci bakterií

Název roztoku	Složení
SOC médium	2% bacto-trypton, 0.5% bacto-yeast extract, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM Mg SO <sub>4</sub> , 20 mM glukóza, pH 7.0; sterilní
LB médium	1% bacto-trypton, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.0; sterilní
LB agar	1.5% bacto-agar v LB médiu
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactoside (zásobní roztok: 1 M)
Antibiotika	Ampicilin (zásobní roztok: 50 mg/ml H <sub>2</sub> O)

#### Použité soupravy (Kity)

Použitá metoda	Název
Expres rekombinantního proteinu	Champion <sup>TM</sup> pET Directional TOPO <sup>®</sup> Expression Kits (Invitrogen) plazmid pET100/D-TOPO <sup>®</sup> (Invitrogen)
Sekvence DNA	Využití služeb servisní laboratoři v Biol. Centru
Klonování PCR produktů pro sekvenaci	TOPO TA cloning (Invitrogen) plazmid pCR <sup>®</sup> 4 TOPO <sup>®</sup> (Invitrogen)
Izolace plazmidu	QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
Čištění PCR produktu z gelu	QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

## SDS-PAGE

Název roztoku	Složení
30% AA	Acrylamid a bisacrylamid (37.5:1)
gelový pufr	Pro zaostřovací gel (0.5 M Tris – HCl, pH 6.8) Pro separační gel (1.5 M Tris - HCl, pH 8.8)
10% SDS	Laurylsulfát sodný
10% APS	Amonium persulfát
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamine
10x ELFO pufr	250 mM Tris-HCl, 1.92 mM glycin, 1% SDS
5x Vzorový pufr	250 mM Tris-HCl (pH 6.8), 500 mM dithiothreitol, 10% SDS, 0.2% bromophenol blue, 50% glycerol
Barvicí roztok	PageBlue <sup>TM</sup> (MBI Fermentas)

## Western blotting

Blotovací pufr	150 mM glycin, 25 mM Tris-Base, 20% methanol
----------------	--

## Hybridizace

1x TBS	10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7.5
1x TBST	20 mM Tris-Cl, 500 mM NaCl, 0.05% Tween, pH 7.5
Blokovací pufr	3% BSA v 1x TBS
Protilátky	Ni-NTA conjugate: TBST, ředění 1:1000
10x Tris-saline	9% NaCl v 1M Tris-Cl, pH 8.0
HRP roztok	18 mg 4 chloro-1-naftol, 6 ml methanolu, 24 ml 1x Tris-saline, 60 µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

## Purifikace proteinů při nativních podmínkách

Lyzační pufr	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0
Promývací pufr	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0
Eluční pufr	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0

## Purifikace proteinů při denaturační podmínkách

Lyzační pufr	7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1% dithiotreitol, H <sub>2</sub> O
Promývací roztok I	8 M urea, 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM TRIS, pH 8.0
Promývací roztok II	4 M urea, 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM TRIS, pH 6.0
Promývací roztok III	2 M urea, 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM TRIS, pH 5.3
Promývací roztok IV	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM TRIS, pH 4.0
Eluční pufr	500 mM imidazol, pH 8.0

### 3.2. Izolace slinných žláz

Slinné žlázy byly izolovány ze samic klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*), která sála na morčatech 7 dní. Slinné žlázy byly zmraženy v roztoku Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen).

### 3.3. Izolace RNA

Slinné žlázy byly homogenizovány v roztoku Trizol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen) v poměru 1 ml roztoku na 100 mg tkáně a centrifugované při 12000x g/10 min/4°C. Supernatant obsahující RNA byl přenesen do nové mikrokumavky. Další postup byl prováděn dle pokynů výrobce (Invitrogen, Trizol<sup>®</sup> reagent). Koncentrace byla stanovena na spektrofotometru při vlnové délce 260 nm. Kontrola RNA byla prováděna elektroforézou v 1.2% agarózovém gelu. RNA byla zmražena na -70 °C.

### 3.4. Syntéza cDNA

Syntéza jednovláknové cDNA byla provedena za použití eAMV RT enzymu, Oligo (-dT)<sub>18</sub> primeru a 1 µg celkové RNA jako templát. Celkový objem reakce byl 20 µl. Následující postup byl prováděn dle pokynů výrobce (Enhanced Avian HS RT-PCR-100 kir, Sigma). Kontrola cDNA byla prováděna elektroforézou v 1% agarózovém gelu.

### 3.5. PCR

Amplifikace požadovaného genu byla provedena na jednovláknové cDNA za pomoci gen-specifických primerů. Amplifikační reakce probíhala v 0.2 ml tenkostěnné zkumavce v přístroji Mastercycler (Eppendorf).

Příprava reakční směsi:

5x kompl. pufr	4 µl
DNTPs	1.6 µl
Tag polymerasa (5 jednotek/µl)	0.2 µl
Primer-forward	1 µl
Primer-reverse	1 µl
cDNA	100 ng
dd H <sub>2</sub> O	do 20 µl

### Použité specifické primery:

372B5F1: 5' - ATG GCG TCC CTA AGG AGT TCG – 3'

372C1R1: 5' - TCG TTC CAC CTG CTC GAG ATC – 3'

PCR byla prováděna na cycleru v tomto programu:

	teplota	čas
	95 °C	2 min
30 cyklů	95 °C	30 sek
	48 °C	30 sek
	72 °C	1 min
	72 °C	20 min

Výsledky reakce byly ověřeny elektroforézou na 1% agarózovém gelu v 1x TAE pufriu.

### 3.6. Purifikace PCR produktu

PCR produkt byl purifikován z gelu pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) podle protokolu výrobce. DNA byla eluována 30 µl dd H<sub>2</sub>O a pomocí spektrofotometru byla změřena její koncentrace.

### 3.7. Ligace PCR produktu do vektoru

Očištěný PCR produkt byl dle pokynů výrobce (Invitrogen) ligován do vektoru pCR<sup>®</sup> 4 TOPO<sup>®</sup>. Pro ligační reakci byly použity 4 µl PCR produktu, 1 µl salt solution a 1 µl vektoru.

### 3.8. Transformace kompetentních buněk *E. coli*

Dva µl ligační směsi byly přidány k 50 µl kompetentních buněk (TOP10). Následující postup byl prováděn podle protokolu od výrobce (Invitrogen). Po transformaci byly kompetentní buňky vysety na Petriho misky obsahující LB agar/ampicilin a inkubovány přes noc při 37°C. Plazmid byl purifikován z jedné narostlé kolonie.



### **3.9. Izolace plazmidu**

Z narostlých kultur byly izolovány plazmidy za použití kitu QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) dle návodu od výrobce ([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)) a plazmidová DNA byla eluována z kolony 30 µl dd H<sub>2</sub>O.

### **3.10. Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu**

Přítomnost genu byla ověřena PCR reakcí rekombinantního plazmidu s použitím vektor-specifických primerů M13-forward/ M13-reverse a sekvenováním. Před přípravou sekvenční reakce byla změřena koncentrace DNA na spektrofotometru.

### **3.11. Příprava rekombinantního proteinu (pilotní experiment)**

Rekombinantní proteiny byly připraveny v bakteriálním expresním systému za použití Champion<sup>TM</sup> pET Directional TOPO<sup>®</sup> Expression Kit (Invitrogen). PCR se speciálně upravenými primery pro expresní systém (k 5'konci forward primeru byl přidán CACC fragment pro správnou orientaci produktu ve vektoru, 3'konec reverse primeru obsahoval stop kodon) byla provedena na templátu plazmid pCR<sup>®</sup>4TOPO<sup>®</sup> obsahující celý gen. PCR produkty byly následně klonovány do expresního systému. Správný čtecí rámec byl ověřen sekvenováním.

### **3.12. Transformace bakteriálního kmene BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3)**

Transformace expresních kompetentních buněk byla provedena rekombinantním expresním vektorem obsahující inzert ve správném čtecím rámci. Ke kompetentním buňkám BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3), po rozmražení, byl přidán 1 µl ligační směsi. Následný postup byl prováděn dle návodu od výrobce (Invitrogen).

### **3.13. Expese rekombinantního proteinu (pilotní experiment)**

Kultura buněk po transformaci byla naředěna LB médiem s ampicilinem (50 µg/ml) v poměru 1:20. Objem směsi byl 10.5 ml. Po inkubaci při 37 °C trvající 4 hodiny byl odebrán nulový (kontrolní) vzorek o objemu 500 µl a ke směsi bylo přidáno IPTG o konečné koncentraci v kultuře 1mM pro indukci exprese. Expese probíhala 4 hodiny a každou hodinu bylo odebráno 500 µl vzorku. Vzorek byl následně centrifugován 5000x g/4 °C /15 min a zmražen.

### 3.14. Kontrola exprese rekombinantního proteinu

Expres proteinu byla ověřena SDS-PAGE. Byl připraven 17% separační gel a 4% zaostřovací gel pro vyrovnání pohybu vzorku před vstupem do separační části. SDS-PAGE probíhala na aparatuře Hoefer SE 250 při napětí 130 V v E pufru.

Před nanesením vzorků na gel byl buněčný pelet resuspendován v 50  $\mu$ l TE pufru. 20  $\mu$ l vzorku bylo smícháno s 5x koncentrovaným vzorkovým pufrům (obsahující DTT), povařeno při 100°C/10 min, inkubováno krátce na ledu, stočeno a nanášeno na gel.

Elektroforéza byla ukončena v okamžiku, kdy bromfenolová modř dosáhla spodního okraje gelu. Poté byl gel přenesen do barvy PageBlue<sup>TM</sup> (Fermentas) a ponechán přes noc na třepačce. Následující den byl gel odbarven v destilované vodě.

Složení gelu:

Separací gel (17%)	objem(ml)	Zaostřovací gel (4%)	objem(ml)
Destilovaná deionizovaná voda	2.975	Destilovaná deionizovaná voda	1.590
40% Akrylamid/ Bis-akrylamid	4.375	40% Akrylamid/ Bis-akrylamid	0.250
1.5 M Tris-HCl, ph 8.8	2.500	0.5 M Tris-HCl, ph 6.8	0.630
10% SDS	0.100	10% SDS	0.250
10% APS	0.050	10% APS	0.125
TEMED	0.005	TEMED	0.002

### 3.15. Western blotting

Vzorky rozdělené na SDS-PAGE byly přeneseny na PVDF membránu (Millipore) technikou Western-blotting (Towbin *et al.* 1979). Po sestavení blotovacího sendviče a aktivování membrány (30s v methanolu) probíhal přenos proteinů za stálého proudu 250 mA po dobu 2.5 hodin na blotovací aparatuře (Idea Scientific Company – USA).

### **3.16. Imunodetekce rekombinantního proteinu**

K zjištění přítomnosti rekombinantního proteinu ve vzorcích byla provedena imunodetekce histidinové kotvy na N-konci Ni-NTA HRP konjugátem (Qiagen).

Po přenesení proteinů na membránu technikou Western-blotting byla membrána 2x promyta v roztoku TBS po dobu 10 minut, blokována v blokovacím roztoku 1 hodinu a promyta 3x v roztoku TBST po dobu 10 minut. Následně byla 1 hodinu inkubována s Ni-NTA HRP konjugátem a promyta 3x v roztoku TBST po dobu 10 minut. Pro vizualizaci rekombinantních proteinů byla membrána dána do roztoku HRP, kde probíhala chromogenní reakce.

### **3.17. Nativní purifikace**

Buněčný pelet byl resuspendován v 4 ml lyzačního pufru. K lyzátu byl přidán lysozym (1 mg/ml) a následovala inkubace na ledu 30 minut. Lyzát byl sonikován na ledu 6x 10 sekund (Bandelin Sonoplus), centrifugován 10 000x g/4 °C /20 min. Do kolony obsahující 1 ml Ni-NTA agarózy (Qiagen) byly přidány 4 ml lyzátu. Kolona byla inkubována 5 hodin při 4°C na rotační třepačce. Po odebrání frakce „flow-through“ byla kolona 3x promyta 4 ml promývacího pufru a pokaždé byl odebrán vzorek. Nakonec byly proteiny eluovány 4x 0.5 ml elučního pufru. Jednotlivé frakce byly kontrolovány na SDS-PAGE.

### **3.18. Denaturační purifikace**

Buněčný pelet byl resuspendován v 5 ml denaturačního lyzačního pufru (7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1% dithiotreitol). Následně byl lyzát sonikován na ledu 6x 10 sekund (Bandelin Sonoplus), 1 hodinu třepán při 20 °C a centrifugován 12 000x g/4 °C /10 min. Supernatant byl přepipetován do nové zkumavky a bylo přidáno 9 objemů acetonu, aby se proteiny vysrážely. Vysrážené proteiny byly stočeny, aceton byl odsán a proteiny byly resuspendovány denaturačním lyzačním pufrem. Resuspendované proteiny by přeneseny do dialyzačního střívka (SPECTRA/POR 4, Sigma). Proteiny byly dialyzovány přes noc v 1x PBS. Další den byl lyzát dán do kolony obsahující 1 ml Ni-NTA agarózy (Qiagen) a následovala inkubace na rotační třepačce 5 hodin při 20 °C. Po odebrání frakce „flow-through“ byl lyzát promýván promývacími roztoky I-IV, vždy byl odebrán vzorek. Protein byl eluován 0.3 ml elučního pufru. Jednotlivé frakce byly kontrolovány na SDS-PAGE.

## 4. Výsledky

### 4.1. Izolace RNA

Celková RNA byla izolována ze slinných žláz sedm dní sajících neinfikovaných klíšťat *Ixodes ricinus*. Koncentrace RNA byla změřena na spektrofotometru (2566 µg/ml). Kontrola kvality RNA provedená elektroforézou v 1.2% agarózovém gelu ukázala, že RNA byla intaktní a vhodná pro syntézu cDNA.

### 4.2. Syntéza ss cDNA a PCR

Jendovláknová cDNA byla syntetizována z totální RNA a pomocí metody PCR za použití specifických primerů byl amplifikován celý gen pro peroxiredoxin. Velikost genu je 756 bp. Sekvence genu pro peroxiredoxin *I. ricinus* byla odeslána do Gene Bank (EU373821).



Obr.1 PCR produkt se specifickými primery:

M – marker pro DNA

PCR produkt(cDNA jako templát)–  
velikost 756 bp

- – negativní kontrola

Gen byl zaklonován do vektoru pCR<sup>®</sup> 4 TOPO<sup>®</sup> a po transformaci byly náhodně vybrány kolonie, ze kterých byl izolován plazmid. Přítomnost inzertu v plazmidu byla ověřena metodou PCR s primery M13-Forw a M13-Rev. Plasmidy, obsahující inzert, byly osekvenovány. Sekvence byly určeny dvakrát v obou směrech. Všechny sekvence byly analyzovány pomocí programu EditSeq a DNASTAR (DNASTAR, United Kingdom). K vyhledání homologie byl použit program BLAST z NCBI (Bethesda, MD). Největší homologie (97%) byla prokázána u peroxiredoxinu z *I. scapularis*. Peroxiredoxin *I. ricinus* se skládá z 251 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost je 27 947.08 Da. Z 251 aminokyselin je 26 silně basických (K,R), 30 silně acidických (D,E), 96 hydrofóbních (A,I,L,F,W,V) a 58 polárních (N,C,Q,S,T,Y). Náboj při pH 7.0 je negativní. Isoelektrický bod je 6.227.

Místo odštěpení signální sekvence bylo určeno mezi 27(L) a 28(E) aminokyselinou pomocí programu SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

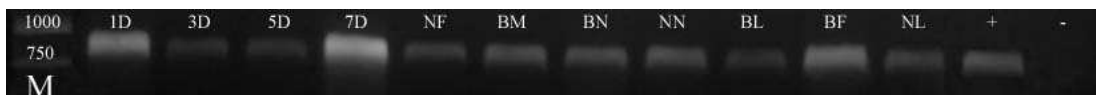
1	ATGGCGTCCCTAAGGAGTTCGGCAGTCTGTTTTCTAGCTATTCTTTTCACTGTAAT
1	M A S L R S S A V C F L A I L F T V I
57	TAAC TTATTTAGTACCGTCAGTTTGGAGGAAGCATGCCATTCGTTTGGGGGAGGT
20	N L F S T V S L E E A C H S F G G G
112	CAGGTCTACCCACAAGAATTTACCAAAGCTTCGGGGCACAACATTCCTGGAGCA
38	Q V Y P Q E F T K A S G H N I H W S
167	AGGCTCAGATCTCTAAACCTGCTCCCGACTTCACGGGCACCGCCGTGGTGGATGG
57	K A Q I S K P A P D F T G T A V V D G
222	AGAGTTCAAAGAGTTCAAGCTATCTGATTTTAAAGGAAAATACCTGGTGTTTTTC
75	E F K E F K L S D F K G K Y L V F F
277	TTCTACCCCTTGGACTTCACATTTGTTTGTCCAACCTGAGATCATAGCCTTCAGCGA
93	F Y P L D F T F V C P T E I I A F S D
333	CCGTGTGAAGGAGTTCAAGGCACTCAATGCTGAAGTGATTGCGTGCTCAGTCGAT
112	R V K E F K A L N A E V I A C S V D
388	TCTCCATTTACGCACCTTGCATGGATTAACACCCCAAGGAAGCAAGGAGGACTGG
131	S P F T H L A W I N T P R K Q G G L
442	GTCCAATCAAGATCCCCCTGTTGTCTGACCTTACACACCAGATCTCGAAGGATTA
149	G P I K I P L L S D L T H Q I S K D Y
498	CGGTGTCTACCTCGAAGATTTGGGACATTCCTCAGAGGACTGTTTCATCATCGAC
167	G V Y L E D L G H S L R G L F I I D
553	GACAAGGGCAAGCTGCGTCAGATCACCATGAACGACCTGCCCGTGGGCCGCTCA
186	D K G K L R Q I T M N D L P V G R S
606	GTGGACGAGACCCTCCGCCTGGTCCAGGCATTCCAGTACACGGACAAGCACGGT
204	V D E T L R L V Q A F Q Y T D K H G
658	GAAGTGTGTCCAGCCGGCTGGAAGCCAGGGGGCGACACGATCATCCCGAATCCA
222	E V C P A G W K P G G D T I I P N P
712	GAGGACAAGCTCAAGTACTTCAGCAAGGTGGACGAGCTCTAG
240	E D K L K Y F S K V D E L

Obr. 2 Nukleotidová a přeložená proteinová sekvence genu pro peroxiredoxin.

### 4.3. Exprese genu pro peroxiredoxin v jednotlivých stádiích klíštěte *I.*

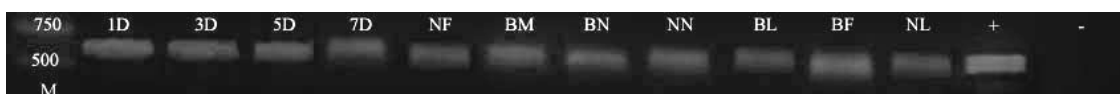
#### *ricinus*

K určení exprese genu pro peroxiredoxin byla izolována RNA ze tří vývojových stádií klíštěte *I. ricinus* (larva, nymfa, dospělec). Z RNA byla syntetizována cDNA. Před PCR reakcí byla konečná koncentrace cDNA u jednotlivých vzorků dovedena na stejnou hodnotu. Výsledky ukázaly, že gen pro peroxiredoxin se exprimuje ve všech vývojových stádiích klíštěte. Největší míra exprese se prokázala u 7 dní sající samice.



Obr. 3 Expresa genu pro peroxiredoxin u jednotlivých stádií klíštěte *I. ricinus*

1D – 1 den nasátá samice	3D – 3 dny nasátá samice	5D – 5 dní nasátá samice
7D – 7 dní nasátá samice	NF – nenasátá samice	BM – nasátý samec
BN – nasátá nymfa	NN – nenasátá nymfa	BL – nasátá larva
BF – plně nasátá samice	NL – nenasátá larva	M – marker
+ – pozitivní kontrola	- – negativní kontrola	



Obr. 4 Expresa genu pro ferritin za použití specifických primerů *Feritin-Forw* a *Feritin-Rew*, jako pozitivní kontrola exprese peroxiredoxinu v klíštěti *I. ricinus*.

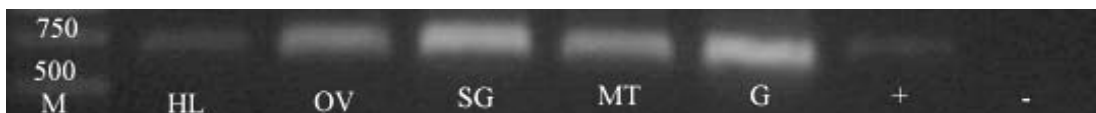
#### 4.4. Expresa genu pro peroxiredoxin v jednotlivých tkáních klíštěte *I. ricinus*

K určení exprese genu pro peroxiredoxin byla získána RNA ze slinných žláz, střeva, malpighické trubice, hemolymfy a ovárií plně nasáté samice. Po syntéze cDNA a dovedení její koncentrace na stejnou hodnotu byla provedena PCR reakce za použití gen-specifických primerů. Bylo prokázáno, že se peroxiredoxin exprimuje ve všech analyzovaných tkáních, ale největší úroveň exprese byla zaznamenána ve slinných žlázách a ve střevě klíštěte *I. ricinus*. Nejnižší úroveň exprese byla prokázána v hemolymfě klíštěte.



Obr. 5 Expresa genu pro peroxiredoxin u jednotlivých tkání klíštěte *I. ricinus*

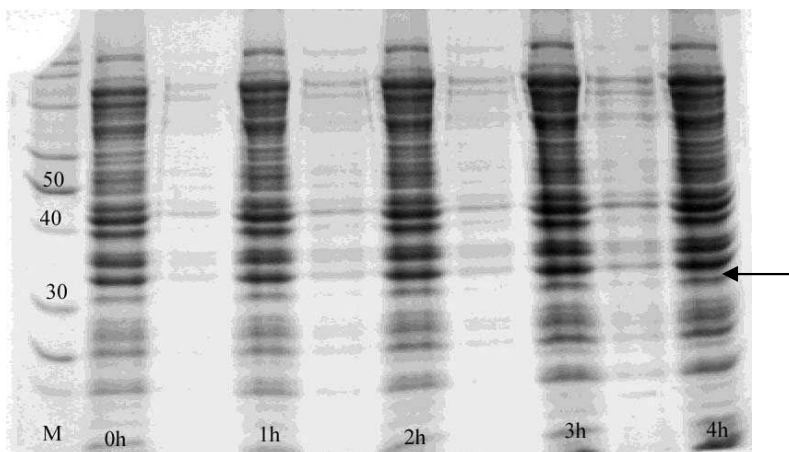
OV – ovaria	G – střevo	MT – malpighické trubice
SG – slinné žlázy	HL – hemolymfa	+ – pozitivní kontrola
- – negativní kontrola		



Obr. 6 Exprese genu pro ferritin za použití specifických primerů *Feritin-Forw* a *Feritin-Rew*, jako pozitivní kontrola exprese peroxiredoxinu v klíštěti *I. ricinus*.

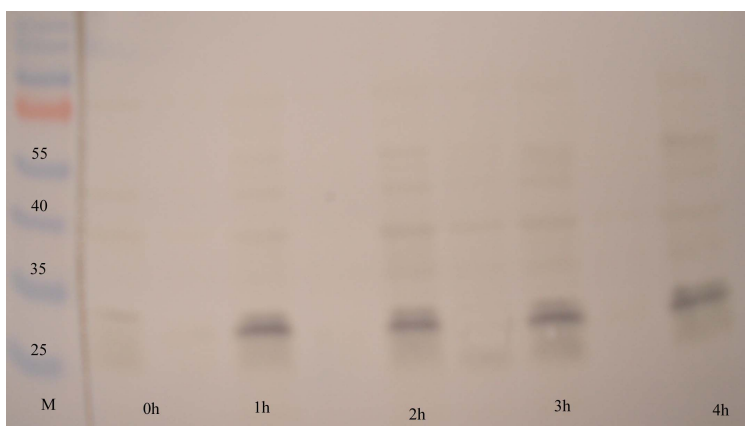
#### 4.5. Příprava rekombinantního proteinu se signálním peptidem

Zaklonováním PCR produktu (peroxiredoxin) obsahující CACC fragment na 5'konci a na 3'konci stop kodon do expresního systému Champion™ pET 100/D-TOPO® byl vytvořen fúzní protein obsahující 6 histidinů na N-konci, čímž se zvětšila jeho molekulová hmotnost o 4 kDa. Po transformaci kompetentních buněk One Shot TOPO10 z 8 náhodně vybraných jednotlivých kolonií byla izolována plazmidová DNA. Přítomnost inzertu v plazmidu byla ověřena pomocí PCR reakce za použití peroxiredoxin-specifických primerů. Správnost čtecího rámce byla ověřena sekvenováním. Po transformaci expresních kompetentních buněk BL21 Star™ (DE3) následovala pilotní indukce exprese proteinu 1 mM IPTG. Každou hodinu bylo odebíráno 500 µl vzorku. Indukce trvala 4 hodiny. Výsledky byly zanalyzovány na SDS-PAGE a rekombinantní protein byl vizualizován pomocí Ni-NTA HRP konjugátů po přenosu na PVDF membránu. Ani v jednom časovém odběru nebyl na gelu po obarvení nalezen proužek odpovídající svou velikostí rekombinantnímu proteinu, u kterého by se projevila over-exprese. Nebyla objevena žádná over-exprese proteinu i po změně podmínek pro kultivaci buněk a indukci. Další pokusy byly prováděny v LB mediu, které obsahovalo 0.5% glukózy. Byla také prodloužena doba růstu buněk před indukci ze 4 na 8 hodin. Přidáním 1 mM IPTG byla spuštěna indukce, kdy byly jednotlivé vzorky odebírány každou hodinu. Ani zde nebylo prokázáno, zda se protein exprimuje. Po přenosu proteinových vzorků na PVDF membránu byla přítomnost peroxiredoxinu dokázána pomocí Ni-NTA HRP konjugátů. Indukce exprese peroxiredoxinu v bakteriálním systému byla zřejmá 1 hodinu po přidání IPTG a zůstala na stejné úrovni po celou dobu experimentu. Velikost proteinu detekovaného na PVDF membráně pomocí Ni-NTA HRP konjugátů odpovídá velikosti His-tag fúzního rekombinantního peroxiredoxinu.



Obr. 7 Pilotní exprese fúzního rekombinantního peroxiredoxinu (vel. 32 kDa)

M – marker



Obr. 8 Detekce rekombinantního proteinu pomocí Ni-NTA konjugátu

Srovnání proteinových sekvencí peroxiredoxinu z *I. ricinus* s podobnými známými sekvencemi z ostatních organismů ukázalo, že peroxiredoxin z *I. ricinus* a *I. scapularis* prokazuje 100% identitu na části proteinu bez signálního peptidu. Rozmezí shodnosti Prx *I. ricinus* se zbytkem náhodně vybraných sekvencí byla od 78.9% (*Penaeus monodon*) do 83.4% (*Haliotis discus*). Vysoká podobnost peroxiredoxinu klíštěte *I. ricinus* se členy 1CysPrx skupiny, což jsou homodimerické, thiol-specifické antioxidantní (TSA) proteiny, definitivně ukázala jeho příslušnost k uvedené 1CysPrx skupině.



		Percent Identity									
		1	2	3	4	5	6	7	8		
Divergence	1	█	100.0	80.9	81.4	80.9	83.4	82.4	78.9	1	Ixodes ricinus
	2	0.0	█	80.9	81.4	80.9	83.4	82.4	78.9	2	Ixodes scapularis
	3	22.1	22.1	█	96.0	96.5	78.4	82.4	79.9	3	Anopheles gambiae
	4	21.4	21.4	4.1	█	98.5	78.4	82.9	79.4	4	Aedes aegypti
	5	22.1	22.1	3.6	1.5	█	78.4	82.9	79.4	5	Culex quinquefasciatus
	6	18.8	18.8	25.5	25.5	25.5	█	79.9	78.4	6	Haliotis discus
	7	20.1	20.1	20.1	19.4	19.4	23.5	█	80.9	7	Lutzomyia longipalpis
	8	24.8	24.8	23.5	24.1	24.1	25.5	22.1	█	8	Penaeus monodon
		1	2	3	4	5	6	7	8		

Obr. 9 Sekvenční podobnost odhalená porovnáním peroxidoredoxinu *I. ricinus* s ostatními členy ICysPrx skupiny.

I_ricinus	1	GHNTHMSKACISRPAPDFTGTAVVDGEFQDFKLSDFKGGKYLVFFFYPLDFTFVCPTETIAFSDRVKREFKRLNAEVIACSV
I_scapularis	1	GHNTHMSKACISRPAPDFTGTAVVDGEFQDFKLSDFKGGKYLVFFFYPLDFTFVCPTETIAFSDRVKREFKRLNAEVIACSV
A_gambiae	1	DHRLQWTKAVISRPAPEFETAVVDGAFKRIKLSDYRGGKYLVFFFYPLDFTFVCPTETIAFSDRVNREFKRLNAEVIACSV
A_aegypti	1	DHRLQWTKAVISRPAPEFETAVVDGAFKRIKLSDYRGGKYLVFFFYPLDFTFVCPTETIAFSDRVKREFKRLNAEVIACSV
C_quinquef	1	DHRLQWTKAVISRPAPEFETAVVDGAFKRIKLSDYRGGKYLVFFFYPLDFTFVCPTETIAFSDRVSEFKRLNAEVIACSV
H_discus	1	GHATHMSQWISRPAPDFTGTAVVDGEFQDFKLSDFKGGKYLVFFFYPLDFTFVCPTETIAFSDRVKREFKRLNAEVIACSV
L_longipalpis	1	GHALHGTAVISRPAPEFEGTAVVDGEFQDFKLSDFKGGKYLVFFFYPLDFTFVCPTETIAFSDRVKREFKRLNAEVIACSV
P_monodon	1	GHSLQWTKAVISRPAPEFEGTAVVDGEFQDFKLSDFKGGKYLVFFFYPLDFTFVCPTETIAFSDRVKREFKRLNAEVIACSV
I_ricinus	81	DSHFTHLAWINTPRKGGGLGFIKIPLLSDLTHQISKDYGVYLEDLGHSLRGLFIIDDKGRLRQITMNDLPVGRSVDETLR
I_scapularis	81	DSHFTHLAWINTPRKGGGLGFIKIPLLSDLTHQISKDYGVYLEDLGHSLRGLFIIDDKGRLRQITMNDLPVGRSVDETLR
A_gambiae	81	DSHFTHLAWINTPRKGGGLGKIMPLVSDITHSISKDYGVYLEDLGHSLRGLFIIDDKGRLRQITMNDLPVGRSVDETLR
A_aegypti	81	DSHFTHLAWINTPRKGGGLGKIMPLVSDITHSISKDYGVYLEDLGHSLRGLFIIDDKGRLRQITMNDLPVGRSVDETLR
C_quinquef	81	DSHFTHLAWINTPRKGGGLGKIMPLVSDITHSISKDYGVYLEDLGHSLRGLFIIDDKGRLRQITMNDLPVGRSVDETLR
H_discus	81	DSHFTHLAWINTPRKGGGLGKIMPLVSDITHSISKDYGVYLEDLGHSLRGLFIIDDKGRLRQITMNDLPVGRSVDETLR
L_longipalpis	81	DSHFTHLAWINTPRKGGGLGKIKIPLLSDLTHQISKDYGVYLEDLGHSLRGLFIIDDKGRLRQITMNDLPVGRSVDETLR
P_monodon	81	DSHFTHLAWINTPRKGGGLGKIKIPLLSDLTHQISKDYGVYLEDLGHSLRGLFIIDDKGRLRQITMNDLPVGRSVDETLR
I_ricinus	161	LVQAFQYTDKHGEVCPAGWKPGGDTIIPNPEKIKYFESK
I_scapularis	161	LVQAFQYTDKHGEVCPAGWKPGGDTIIPNPEKIKYFESK
A_gambiae	161	LVQAFQYTDKHGEVCPAGWKPGGDTIIPNPEKIKYFESK
A_aegypti	161	LVQAFQYTDKHGEVCPAGWKPGGDTIIPNPEKIKYFESK
C_quinquef	161	LVQAFQYTDKHGEVCPAGWKPGGDTIIPNPEKIKYFESK
H_discus	161	LVQAFQYTDKHGEVCPAGWKPGGDTIIPNPEKIKYFESK
L_longipalpis	161	LVQAFQYTDKHGEVCPAGWKPGGDTIIPNPEKIKYFESK
P_monodon	161	LVQAFQYTDKHGEVCPAGWKPGGDTIIPNPEKIKYFESK

Obr. 10 Srovnání proteinové sekvence peroxidoredoxinu *I. ricinus* s vybranými členy ICysPrx skupiny.

## 5. Diskuse

Peroxiredoxiny jsou zahrnuty v hem-volné thiol peroxidázové rodině stejně jako glutathion peroxidáza. Avšak obě rodiny jsou odlišné hned od primární sekvence, mají společné vytváření sulfenické kyseliny na N-terminálním katalytickém cysteinu během prvního kroku redukce peroxidu. Peroxiredoxin kódující sekvence je detekován ve všech říších organismů. Výjimky mohou být pozorovány u určitých skupin: atypický 2-Cystein peroxiredoxin PrxQ/BCP chybí u živočichů a PrxII-glutoredoxin fúzní proteiny jsou detekovány pouze u prokaryot (18, 19, 20).

Bylo prokázáno, že dva samostatné peroxiredoxinové geny (shodnost 43%, podobnost 50%, přesahuje 160 aminokyselin) byly silně indukované ve střevu, slinných žlázách a hemolymfě klíštěte *Ixodes ricinus* po infekci *B. burgdorferi* (22). U thioredoxin peroxidázy byla prokázána role při odpovědi na oxidativní stres v S2 buňkách u *D. melanogaster* (23). Je možné, že gen thioredoxin peroxidázy u *I. ricinus* je indukován v odpovědi na oxidativní stres jako důsledek infekce *B. burgdorferi*. To by mohl být výsledek uvolněného ROS hemocyty klíšťat, jako část antibakteriální odpovědi (12). Navíc klíšťata narážejí na ROS vytvářené imunitními hostitelskými buňkami, jako jsou neutrofilové, během procesu krmení (21).

Námi bylo prokázáno, že se gen pro peroxiredoxin (EU373821) exprimuje ve všech vývojových stádiích klíštěte *Ixodes ricinus* po krmení. Peroxiredoxin přítomný u larvy, nymfy a dospělce může mít funkci hlavního ROS detoxifikujícího enzymu. Dřívější studie ukazují, že se peroxiredoxin produkuje ve všech vývojových stádiích klíštěte *Haemaphysalis longicornis*. U endoparasitického hlísta *Dilofilara immitis* je peroxiredoxin také exprimován ve všech vývojových stádiích (21), stejně jako u prasečí škrkavky *Ascaris suum* (16).

Expres peroxiredoxinu je patrná ve všech zkoumaných tkáních (slinných žlázách, střevu, ovarích, hemolymfě a malpighických trubicích). Nejvíce se Prx exprimuje ve slinných žlázách a ve střevu, což jsou orgány bezprostředně spjaté s krmením klíštěte. Slinné žlázy jsou orgánem, který produkuje velké množství biologicky aktivních látek, čili přítomnost většího množství peroxiredoxinu je zde logická.

## 6. Závěr

Ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* byl získán gen pro peroxiredoxin. Izolovaný gen o velikosti 756 bp obsahuje čtecí rámeček kódující protein o molekulové hmotnosti 27.95 kDa. Byla prokázána 97% homologie s peroxiredoxinem izolovaným z klíštěte *Ixodes scapularis* na nukleotidové úrovni celého genu a 99% homologie na proteinové úrovni. Srovnání Prx proteinových sekvencí bez signálního peptidu z obou klíšťat ukázalo, že jsou 100 % identické. Srovnání peroxiredoxinu *I. ricinus* se známými sekvencemi jiných organismů prokázalo, že patří k 1CysPrx skupině, což jsou homodimerické, thiol-specifické antioxidantní (TSA) proteiny, které prokazují ochrannou roli v buňkách pomocí redukce a detoxifikace peroxidu vodíku, peroxynitritu a organických vodíkových peroxidů. Bylo prokázáno, že se peroxiredoxin exprimuje ve všech stádiích (larva, nymfa, dospělec) klíštěte *I. ricinus*. Také se exprimuje ve všech zkoumaných orgánech, nejvíce pak ve slinných žlázách a střevu. Bylo prokázáno, že je peroxiredoxin přítomen i v nenasátých nymfách a dospělých, ale zřejmě exprese genu je indukována krměním. Nejvyšší úroveň exprese byla objevena 7 dní po krmění klíštěte na hostiteli. V bakteriálním expresním systému byl získán rekombinantní protein se signální sekvencí, ale při pilotní expresi se ukázalo, že nedošlo k žádné over-expresi peroxiredoxinu klíštěte *I. ricinus*. Přítomnost imunodetekce rekombinantního proteinu Ni-NTA konjugáty prokázala jeho přítomnost v množství stejném jako u jiných buněčných proteinů. Pro produkci biologicky aktivního peroxiredoxinu klíštěte *I. ricinus* je zřejmě zapotřebí exprese rekombinantního peptidu bez signální sekvence nebo změna expresního systému.

## 7. Literatura

1. **Kovář L (2004):** Tick saliva in anti-tick immunity and pathogen transmission. *Folia Microbiol.* 49: 327-336.
2. **Hovius JWR, Levi M, Fikrig E (2008):** Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva. *PloS Medicine* 5: e43.
3. **Ferreira BR, Szabo MJ, Cavassani KA, Bechara GH, Silva JS (2003):** Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. *Veterinary Parasitology* 115: 35-48.
4. **Brossard M, Fivaz V (1982):** Ixodes ricinus L.: mast cells, basophils and eosinophils in the sequence of cellular events in the skin of infested or re-infested rabbits. *Parasitology* 85: 583-592.
5. **Ceraur SM, Sonenshine DE, Hynes WL (2002):** Resistance of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) following challenge with the bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). *J Med Entomol.* 39: 376-383.
6. **Eggenberger LR, Lamoreaux WJ, Coons LB (1990):** Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. *Exp Appl Acarol.* 9: 279-287.
7. **Hoffmann JA, Kafatos FC, Jeneway CA, Ezekowitz RA (1999):** Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284: 1313-1318.
8. **Johns R, Sonenshine DE, Hynes WL. (2000):** Response of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) to hemocoelic inoculation of *Borrelia burgdorferi* (Spirochetales). *J Med Entomol.* 37: 265-270.
9. **Grubhoffer L, Kovár V, Rudenko N (2004):** Tick lectins: structural and functional properties. *Parasitology* 129: 113-125.
10. **Sauer JR, McSwain JL, Bowman AS, Essenberg RC (1995):** Tick salivary gland physiology. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 245-267.
11. **Thorpe GW, Fong ChF, Alic N, Higgins VJ, Dawes IW (2004):** Cells have distinct mechanism to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 6564-6569.
12. **Pereira LS, Oliveira PL, Barja-Fidalgo C, Daffre S (2001):** Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp Parasitol.* 99: 66-72.
13. **Vass E, Nappi AJ (1998):** Prolonged oviposition decreases the ability of the parasitoid *Leptopilina boulardi* to suppress the cellular immune response of its host *Drosophila melanogaster*. *Exp Parasitol.* 89: 86-91.

14. **Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K (2003):** Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem.* 10: 2495-2505.
15. **Kuhn KH (1996):** Mitotic activity of the hemocytes in the tick *Ixodes ricinus* (Acari; Ixodidae). *Parasitol Res.* 82: 511-517.
16. **Tsuji N., Kasuga-Aoki H., Isobe T., Yoshihara S. (2000):** Cloning and characterisation of a peroxiredoxin from the swine roundworm *Ascaris suum*. *International Journal for Parasitology* 30: 125-128.
17. **Donnelly S, O'Neill SM, Sekiya M, Mulcahy G, Dalton JP (2004):** Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and Immunity*: 166-173.
18. **Cha MK, Hong SK, Kim IH (2007):** Four thiol peroxidases contain a conserved GCT catalytic motif and act as a versatile array of lipid peroxidases in *Anabaena* sp. *Free Radic Biol Med.* 42: 1736-1748.
19. **Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005):** Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 38: 1543-1552.
20. **Rouhier N, Jacquot JP (2005):** The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radic Biol Med.* 38: 1413-1421.
21. **Tsuji N, Kamio T, Isobe T, Fujisaki K. (2001):** Molecular characterization of peroxiredoxin from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Molecular Biology* 10: 121-129.
22. **Rudenko N, Golovchenko M, Edwards MJ, Grubhoffer L (2005):** Differential expression of *Ixodes ricinus* tick genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection. *J Med Entomol.* 42: 36-41.
23. **Radyuk SN, Sohal RS, Orr WC (2003):** Thioredoxin peroxidases can foster cytoprotection or cell death in response to different stressors: over- and under-expression of thioredoxin peroxidase in *Drosophila* cells. *Biochem. J.* 371: 743-752