

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Možnosti a limity RNA interference u klíštěte *Ixodes ricinus*

Magisterská práce

2009

Bc. František Musil

Vedoucí práce: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Ondřej Hajdušek, Ph.D.

Musil F., 2009: Možnosti a limity RNA interference u klíštěte *Ixodes ricinus* [Potentials and limits of RNA interference in the tick *Ixodes ricinus*. Mgr. Thesis, in Czech] – 55 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The function of chitin binding protein (CBP) and two isoforms of cathepsin B (cathB1, cathB2) were tested by using RNA interference in the tick *I. ricinus*. Two different methods have been used to deliver dsRNA for RNAi in ticks – injection and capillary feeding. The synthesized dsRNA was used to find out the impact of RNAi in the tick tissues, which were tested by RT-PCR and Western blot. The expression of CBP was successfully silenced by RNAi in the salivary glands. The silencing of cathB1 and cathB2 in the gut was less effective, but still limited tick's ability to feed.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím literatury uvedené v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové 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, dne 28. dubna 2009

.....

Podpis

Poděkování:

RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc. bych chtěl poděkovat za možnost pracovat v jeho laboratoři a ochotu kdykoliv poskytnout odbornou radu a pomoc. Velice děkuji RNDr. Ondrovi Hajduškovi za trpělivost, ochotu poradit v průběhu celé tvorby mé diplomové práce a především za pečlivé uvedení do problematiky RNA interference a dalších odborných metod molekulární biologie.

Veliký dík patří také Mgr. Veronice Burešové a Bc. Heleně Pěničkové za pomoc při veškeré manipulaci s klíšťaty a izolování tkání. Dále děkuji RNDr. Zdeňku Frantovi a RNDr. Danielu Sojkovi za vždy odborné a cenné rady během mého působení v laboratoři.

Také děkuji rodičům a své přítelkyni za jejich podporu v průběhu celého studia.

Seznam použitých zkratek

RNAi	RNA interference
KD	utlumení (knock-down)
dsRNA	dvoušroubovicová RNA (double-stranded RNA)
siRNA	short-interfering RNA
RISC	RNA-induced silencing complex
RdRP	RNA dependentní RNA polymeráza
PCR	polymerázová řetězová reakce
cDNA	komplementární DNA
RT-PCR	reverzní transkripce - PCR
CBP	chitin vázající protein (chitin binding protein)
cathB1	cathepsin B1
cathB2	cathepsin B2
IrCB	<i>Ixodes ricinus</i> cathepsin B
GFP	green fluorescent protein
GUT	střevo
SG	slinné žlázy
OVA	vaječníky
FF	plně nasáté (fully fed)
bp	páry bazí

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Klíšťata.....	1
1.2. Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>).....	1
1.3. Vztah klíště – hostitel.....	3
1.4. Střevo.....	4
1.4.1. Trávicí proteázy.....	5
1.4.2. Trávení krve.....	6
1.4.3. Cathepsin B.....	6
1.5. Slinné žlázy.....	7
1.6. Peritrophická membrána.....	8
1.6.1. Peritrophiny.....	8
1.6.2. Chitin binding protein – peritrophin A.....	9
1.7. RNA interference.....	9
2. Cíle práce	14
3. Materiál a metody	15
3.1. Použité chemikále a kity.....	15
3.2. Použité primery.....	17
3.3. Klíšťata.....	16
3.3.1. Sběr a chov klíšťat.....	17
3.3.2. Aplikace dsRNA do klíšťat.....	18
3.3.2.1. Injikace dsRNA.....	18
3.3.2.2. Kapilární sání klíšťat.....	18
3.3.3. Izolace tkání z klíšťat.....	19
3.4. RNAi protokol.....	19
3.5. SDS-PAGE a Western Blot.....	24
3.6. Izolace totální RNA.....	25
3.7. Reverzní transkripce.....	26
3.8. PCR amplifikace cDNA (RT-PCR).....	26
4. Výsledky	27
4.1. Utlumení exprese chitin vázajícího proteinu metodou RNAi.....	27
4.1.1. Syntéza CBP dsRNA.....	27
4.1.2. Injikace CBP dsRNA a následné sání samic po dobu 5 dnů.....	28
4.1.2.1. Ověření účinnosti RNAi na expresi CBP pomocí RT-PCR.....	28
4.1.2.2. Ověření exprese CBP po RNAi metodou Western blot.....	30
4.2. Utlumení exprese cathepsinu B1 a cathepsinu B2 metodou RNAi.....	31

4.2.1. Syntéza cathB1 a cathB2 dsRNA.....	32
4.2.2. Injikace dsRNA pro cathB1 a cathB2 a následné sání samic po dobu 5 dnů.....	33
4.2.2.1. Ověření účinnosti RNAi na expresi cathB1 a cathB2 pomocí RT-PCR ve střevě samic 5 dnů nasátých.....	34
4.2.2.2. Ověření exprese cathB1 a cathB2 po RNAi metodou Western blot ve střevě samic 5 dnů nasátých.....	35
4.2.3. Injikace dsRNA pro cathB1 a cathB2 a následné sání samic po dobu 3 dny, 6 dnů a do plného nasátí.....	35
4.2.3.1. Ověření účinnosti RNAi na expresi cathB1 a cathB2 pomocí RT-PCR ve střevě samic 3 dny, 6 dnů a plně nasátých.....	36
4.2.3.2. Ověření exprese cathB1 a cathB2 po RNAi metodou Western blot ve střevě samic 6 dnů a plně nasátých.....	38
4.2.4. Aplikace cathB1 dsRNA společně s cathB2 dsRNA kapilárním sáním a následné sání samic po dobu 4 a 6 dnů.....	39
4.2.4.1. Ověření účinnosti RNAi na expresi cathB1 a cathB2 pomocí RT-PCR.....	40
4.2.4.2. Ověření exprese cathB1 a cathB2 po RNAi metodou Western blot.....	41
5. Diskuze.....	43
6. Závěr.....	45
7. Literatura.....	46
8. Přílohy.....	52

1. Úvod

1.1. Klíšťata

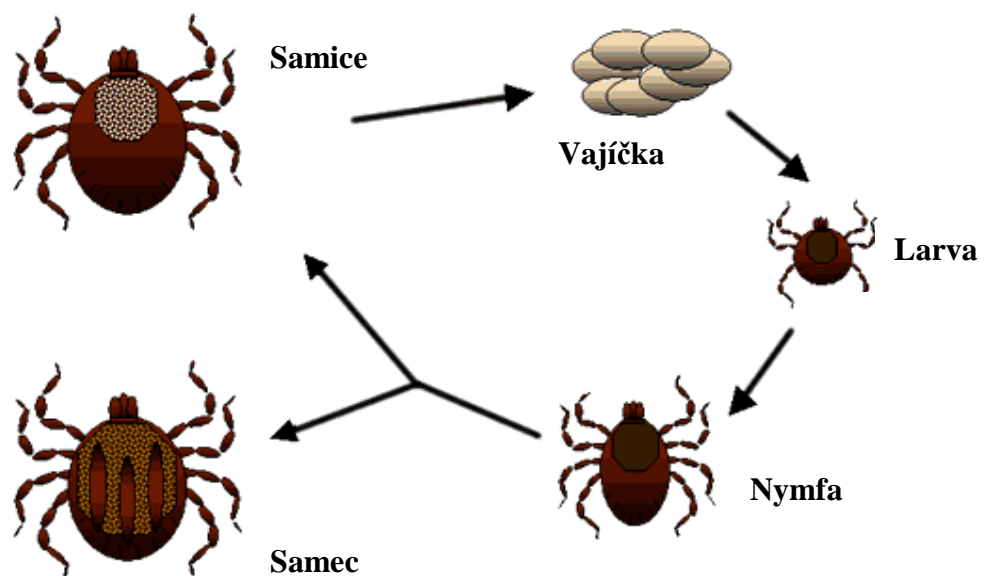
Klíšťata řadíme do kmene Arthropoda, podkmene Chelicerata, třídy Arachnida a do řádu Acarina. Dělí se do 2 základních čeledí: Ixodidae (klíšťata) a Argasidae (klíšťáci). Do čeledi Ixodidae je řazeno 13 rodů a 650 druhů, zatímco čeleď Argasidae zahrnuje 5 rodů a 170 druhů (Sonenshine, 1991). Čeleď Ixodidae se dále dělí na skupiny Prostriata (rod *Ixodes*) a Metastriata (rody *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyaloma*, aj.). Jednotlivé čeledi se liší v ontogenezi, fyziologii, morfologii i reprodukční strategii.

Klíšťata jsou krev sající ektoparazité vyšších obratlovců, které nalezneme ve všech terestrických oblastech. Jsou závislá na příjmu proteinů z hostitelské krve, které jsou důležité pro jejich vývoj a reprodukci (Grandjean, 1984). Vedle komárů jsou klíšťata druhou nejvýznamnější skupinou přenašečů různých patogenů, které se do střeva klíšťate dostanou s nasátou krví a odtud mohou migrovat do slinných žláz a touto cestou pak mohou být přeneseny na další hostitele. Většina patogenních mikroorganismů využívá klíšťata jako vektory pro definitivní hostitele. Na lidech parazitují hlavně dospělci a nymfy. Během sání mohou přenášet řadu různých bakteriálních, virových a protozoálních onemocnění z jednoho hostitele na dalšího (Jongejan a Uilenberg, 2004). Jsou hlavními vektory patogenů způsobujících nemoci jako je horečka skalistých hor, ehrlichioza, lymská borelióza, theilerióza a babezióza (Sonenshine, 1991). Klíšťata rodu Argasidae přenáší původce Africké horečky prasat a spirochéty rodu *Borrelia*, původce návratných horeček (Piesman a Gage, 1996).

1.2. Klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*)

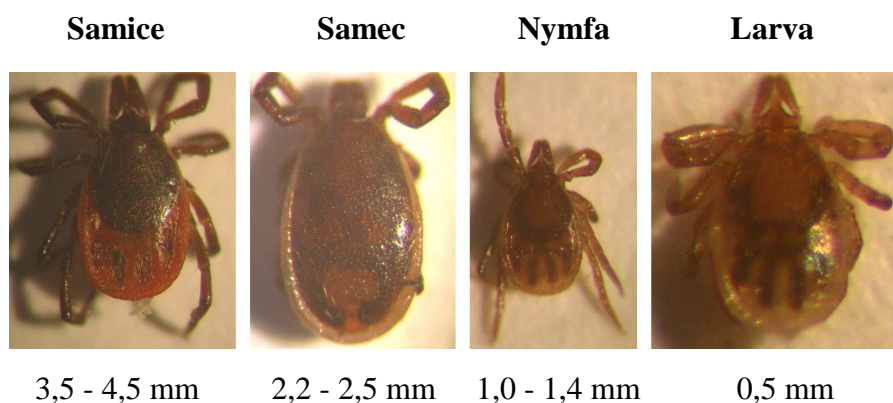
Druh *Ixodes ricinus* je nejčastější druhem v Evropě. Tento krev sající parazitující členovec je řazen do čeledi Ixodidae, mezi tzv. „tvrdá klíšťata“. Zatímco u samce je tělo kryté hřbetním štítkem, u samice kryje štítek jen přední část jejího těla. Tím je zadeček samice velmi silně roztažitelný a samice se tak může po přijmutí potravy zvětšit až do velikosti jednoho centimetru. Před samotným tělem se nachází jako zvláštní oddíl gnatosoma s ústním ústrojím. Chelicery jsou tvořeny úzkými klepítky, které směřují do stran. Obě kyčle makadel vpředu uprostřed srůstají v jeden protáhlý sací orgán se zpětnými háčky zvaný hypostom, který proniká pomocí chelicer při sání do kůže hostitele. V kůži je hypostom v průběhu sání ukotven cementem. Na dolní části předních nohou se nachází Hallerův orgán, umožňující

detekci CO₂ při hledání kořisti, což je pro klíště důležité, neboť je slepé. Tělní dutinu (hemocoel) vyplňuje tekutina, která se nazývá hemolymfa. Je tvořena hemocyty a plasmou. Významnou složku plasmy tvoří humorální faktory, které mají důležitou funkci v procesu rozpoznávání vlastních a cizích složek a v aktivaci obranných reakcí (Sonenshine, 1991). Klíště obecné se vyskytuje v celé Evropě ve vlhkých lesích s bujným bylinným a keřovým patrem, ale také na lesních okrajích a vlhkých loukách. Obývá nadmořské výšky i za hranicí 1000 m. n. m. (Gray, 1991). Pohybovat se začíná při teplotě vzduchu kolem 7°C. Při zvyšování teploty prostředí dochází ke zrychlení vývoje klíštěte, ale jen do teplot kolem 32°C. Důležitá je také relativní vlhkost vzduchu. V přírodě se lze s klíštětem setkat od března do října. Hladové klíště (dokáže hladovět i jeden rok) sedí na konci větve nebo jiných vyčnívajících místech s předníma nohama šikmo zdviženými vzhůru. Vyhledání hostitele je pasivní, neboť klíště vyčkává v trávě na přímý kontakt s hostitelem (Sonenshine, 1991). Klíště *I. ricinus* patří mezi 3 - hostitelské druhy (Singh a Girschick, 2003). Sání krve na hostitelích je pro klíště důležitý fyziologický proces potřebný k přeměně na dospělého jedince. Příjem krve představuje pro klíště hlavní zdroj živin a energie pro vývoj dalších stádií a produkci vajíček u dospělých samic. Trávení krve poté probíhá intracelulárně v buňkách střevního epitelu. Délka vývojového cyklu klíštěte závisí na konkrétních podmínkách, pohybuje se v rozmezí dvou až čtyř let. Životní cyklus klíštěte zahrnuje 4 vývojová stádia: vajíčko, larva, nymfa a dospělec (Obr. 1; Obr. 2).



Obr. 1: Schéma vývojového cyklu 3 – hostitelských klíšťat

Každé stádium saje jedenkrát krev hostitele. Larvální stádium klíštěte saje především na hlodavcích a dalších menších savcích. Nymfy sají na ptácích a středně velkých savcích. Jako dospělci sají krev již jen samice a to na větších savcích, mezi které patří i člověk. Po nasátí samice naklade vajíčka (až 5000) a umírá. Z vajíček se na konci léta líhnou šestinohé larvy, které většinou sají až následující léto. Po nasátí, které trvá v rozmezí 1-10 dní, prodělají přeměnu na již osminohé nymfy. U obou stádií nelze rozpoznat pohlaví. Poslední přeměna na dospělé probíhá většinou koncem léta nebo začátkem podzimu a následující léto dochází ke kopulaci, sání a kladení vajíček. Samice sají 8-10 dní, jsou schopny nasát až 1000 mg krve a zvětšit svůj tělesný objem až 200x (Kaufman, 1989). Největší objem krve přijímají oplodněné samice během poslední fáze sání, během tzv. „rapid engorgement“.



Obr. 2: Životní stádia klíštěte *I. ricinus* a jejich velikosti (nenasátá; bez měřítka; převzato z Hajdušek, Ph.D. thesis, 2009)

Mezi nejzávažnější patogeny přenášené klíštětem *I. ricinus* se řadí spirochéta *Borrelia burgdorferi* sensu lato a virus klíšťové encefalitidy (Nutall, 1999). Důležité je, že klíšťata zůstávají infikována po celou dobu jejich života. Infekce se přenáší z larvy na nymfu a dále na dospělé.

1.3. Vztah klíště – hostitel

Po přisátí se snaží klíště mandibulami penetrovat pokožku a udržet se pomocí sekretovaných látek na hostiteli (Kaufman, 1989). Při sání se klíště snaží potlačit obranné imunitní mechanismy hostitele sekrecí biologicky aktivních látek ze slinných žláz, které mají antikoagulační, vazodilatační a imunosupresivní vlastnosti (Valenzuela, 2000). Zabraňují tak rozsáhlé zánětlivé reakci v poškozené tkáni (Ribeiro, 1985). Dochází k potlačení Th1 subpopulace, která je součástí imunitní odpovědi hostitele. Vyšší mírou se tedy podílí na

imunitní odpovědi Th2 subpopulace (cytokiny IL-4, IL-10, IL-13), což je příznivé pro klíště, neboť dochází k potlačení zánětu v místě sání. Imunomodulační molekuly obsažené ve slinných žlázách klíštěte umožňují přenos patogenů, které jsou klíštětem přenášeny a tento jev, kdy složení klíštěcích slin usnadňuje přenos patogenů do hostitele, se nazývá SAT (Salivary Activated Transmission). Imunomodulační molekuly také potlačují schopnost fagocytózy a produkci zabíječských NK buněk hostitelem, což usnadňuje zmíněnou infekci hostitele patogeny přenášenými klíštětem.

V průběhu sání klíštěte se tvoří silná imunitní odpověď hostitele, kterou se snaží klíště potlačit. Obranná imunitní reakce hostitele spočívá v zánětlivé reakci s přítomností lymfocytů, eozinofilů a mikrofágů v místě přisátí. Svou roli v obraně hostitele proti vetřelci hraje i hypersenzitivní reakce IV. typu – DTH (Delayed type hypersensitivity), které se účastní bazofily (Allen, 1973). V místě sání dochází také k mechanickému poškození kůže, což vede k nespecifické imunitní odpovědi v podobě lokalizovaného zánětu (Brossard a Fivaz, 1982). Přestože sání klíštěte představuje velký zásah do organismu hostitele, je klíště schopno sání dokončit. V některých případech ale může DTH reakce způsobit i smrt klíštěte. Klíště se snaží také co nejvíce potlačit hemostázu, která je reakcí hostitele na poranění a jejímž výsledkem je vznik fibrinové sraženiny v místě sání klíštěte zamezující ztrátám krve. Důležitou roli v organismu hostitele představuje agregace destiček, vazokonstrikce a koagulační kaskáda. V místě poranění působí dále také histamin, serotonin a bradykinin, což jsou látky zodpovědné za bolest a svědění. Tyto reakce mohou vést k odstranění klíštěte z pokožky samotným hostitelem.

1.4. Střevo

Střevo (midgut) je největší tělesný orgán klíštěte a je hlavním zásobním orgánem. Trávení krve probíhá výhradně intracelulárně za kyselého pH (Sojka a kol., 2008). Odehrává se uvnitř buněk střevního epitelu v endo/lysozomálních váčcích, které se do buněčného prostoru dostanou ze střevního lumen převážně pomocí pinocytózy a fagocytózy (Sonenshine, 1991). Střevo klíšťat neobsahuje extracelulární trávicí enzymy na rozdíl od krev sajícího hmyzu, kde jsou trávicí enzymy sekretovány do střevního obsahu (Terra a Ferreira, 1994). Nepřítomnost extracelulárních trávicích enzymů umožňuje skladování nenatrávené potravy ve střevě po dlouhou dobu. Právě s ohledem na tuto skutečnost jsou klíšťata schopna vydržet dlouhou časovou periodu bez přijímání potravy (Sonenshine, 1991). Zároveň ale absence extracelulárních enzymů umožňuje patogenům přežít ve střevě klíšťat a být při dalším sání

přenášeny (Sonenshine, 1991). Tyto patogeny mohou poté migrovat do slinných žláz a infikovat při sání napadené hostitele. Zmíněné patogeny představují také hrozbu pro samotná infikovaná klíšťata. Proto existují určité mechanismy, které chrání klíště před přítomnými invadujícími patogeny. V první řadě to jsou malé antimikrobiální proteiny zvané defensiny (Kocan a kol., 2008), které jsou sekretovány do střeva. Další důležitou obrannou střevní bariéru tvoří peritrophická membrána, která bude popsána v samostatné kapitole.

1.4.1. Trávicí proteázy

Trávicí proteázy mají obecně důležité funkce v mnoha fyziologických procesech jako je trávení, aktivace a modelace proteinů. Tyto enzymy byly identifikovány v biologickém systému od virů až po obratlovce. U klíšťat zastávají trávicí proteázy důležité funkce při trávení hemoglobinu, což představuje vysoce dynamický systém odbourávání přijatého hemoglobinu během sání krve klíštětem na hostiteli. Tyto klíštěcí proteolytické enzymy byly popsány například ve střevě *Haemaphysalis longicornis* (Miyoshi a kol., 2004; Naotoshi a kol., 2008), *Boophilus microplus* (Mendiola a kol., 1996) a *I. ricinus* (Sojka a kol., 2007). Trávicí procesy ve střevě klíštěte představují složité a vzájemně propojené mechanismy. Řízení klíštěcího trávení spoléhá na evolučně konzervovanou síť cysteinových a aspartátových peptidáz (Sojka a kol., 2008). V publikaci Horn a kol. (2009) byly tyto trávicí proteázy popsány ve střevní tkáni *I. ricinus* a autoři se zaměřili na popsání pěti důležitých endo- a exopeptidáz. Konkrétně se jedná o aspartátovou proteázu cathepsin D (IrCD) z klanu AA, který má výraznou proteolytickou aktivitu při trávení hemoglobinu. Do skupiny cysteinových proteáz patří papainové proteázy cathepsin B (IrCB), cathepsin L (IrCL) a cathepsin C (IrCC) z klanu CA. Dále pak asparaginylová endopeptidáza (IrAE, legumain) z klanu CD (Horn a kol., 2009). Cysteinové i aspartátové peptidázy přispívají významným dílem k odbourávání hostitelského hemoglobinu z nasáté krve (Mendiola a kol., 1996). Asparaginylová endopeptidáza (SmAE) pravděpodobně přispívá k aktivaci ostatních cysteinových a aspartátových proteáz, jak bylo popsáno u *S. mansoni* (Sajid a kol., 2003). Inkubace SmCB1 pro-peptidu s IrAE v kyselém prostředí vedla k vytvoření aktivní formy peptidu SmCB1 (Sojka a kol., 2007). Je možné, že Cathepsin B (IrCB) u *I. ricinus* podstupuje podobnou aktivaci působením IrAE. U *I. ricinus* bylo zjištěno, že IrAE je exprimován výhradně ve střevní tkáni a nejvyšší aktivitu vykazuje za kyselého pH v hodnotách 5.5 až 6 (Sojka a kol., 2007). Ostatní cysteinové proteázy mají nejvyšší účinnost při pH v rozmezí 5 až 6 a aspartátové proteázy při pH 3 až 4 (Horn a kol., 2009).

1.4.2. Trávení krve

Trávení krve je u klíšťat poměrně pomalý proces, který vyžaduje kyselé prostředí pro správnou funkci trávicích proteáz ve střevních intracelulárních váčcích (Grandjean a Aschliemann, 1973). Důležitou funkcí střeva je schopnost vypořádat se s velkým množstvím hemu, který vzniká proteolýzou hemoglobinu z nasáté krve a ve své volné formě je pro klíště toxický. Po požití hostitelské krve dochází nejprve k hemolýze erytrocytů ve střevní lumen (Agbede a Kemp, 1985; Miyoshi a kol., 2007) a formování velkých hemoglobinových krystalů v lumen střeva. Již zmíněná absence extracelulárního trávení pravděpodobně umožňuje ukládání krystalů hemoglobinu ve střevní lumen (Horn a kol., 2009). Příčina formování těchto krystalů ale není doposud přesně známa. Postupně dochází k endocytóze uvolněného hemu trávicími buňkami do hemocoelu, kde následuje intracelulární trávení endo/lysozomální odbourání hemoglobinu cysteinovými a aspartátovými proteázami (Coons a Alberti, 1999). Degradace hemoglobinu byla zjištěna jako nejúčinnější v rozmezí pH 3,5 až 4,5 (Horn a kol., 2009), což odpovídá kyselému prostředí, které se vyskytuje v trávicích váčcích (Lara a kol., 2005). Degradací proces je iniciován cathepsinem D a cathepsinem L, který je podporován legumainem. Následuje aktivace proteáz cathepsinu C a cathepsinu B, které pokračují v odbourávání velkých fragmentů do podoby dipeptidů (Horn a kol., 2009). Celý proces je ukončen ukládáním uvolněného toxického hemu v hemosomech. Tyto speciální orgány jsou proto považována za hlavní detoxikační mechanismus klíšťat (Lara, 2003). Hemosomy jsou uskupovány v trávicích buňkách. Po nahromadění mnoha odpadních produktů dochází k uvolnění trávicích buněk z epitelu a následnému přesunu do lumen střeva, kde postupně dojde k jejich odstranění jako odpadního materiálu (Coons a Alberti, 1999).

1.4.3. Cathepsin B

Cathepsin B je lysozomální cysteinová proteáza papainového typu. Je lokalizován ve střevním epitelu a zodpovídá za intracelulární odbourání proteinů v lysozomech. Řadí se do třídy globulárních lysozomálních střevních proteáz s nejvyšší aktivitou v kyselé oblasti pH. Jeho hlavní funkce spočívá tedy v zajištění degradace proteinů v lysozomech. Spolu s dalšími trávicími proteázami hraje významnou roli při trávení velkých hemoglobinových fragmentů (Horn a kol., 2009). Jak již bylo zmíněno, je možné, že ve střevní tkáni klíštěte je funkce cathepsinu B (IrCB) umožněna působením peptidázy legumainu (IrAE). K potvrzení či vyvrácení této hypotézy bude potřeba ještě podrobný výzkum. Na rozdíl od ostatních členů

rodiny cysteinových proteáz vykazuje cathepsin B endopeptidázovou i exopeptidázovou aktivitu (Nägler a kol., 1997). Jako exopeptidáza je schopen odštěpovat dipeptid z C-konce cílového degradovaného substrátu (Barrett a Kirschke, 1981). Schopnost cathepsinu B fungovat jako dipeptidyl karboxypeptidáza je přisuzována přítomnosti dvou histidinových zbytků His¹¹⁰ a His¹¹¹ (Krupa a kol., 2002) v tzv. „occluding loop“, což je vložený segment o velikosti 20 AA lokalizovaný v molekule cathepsinu B.

Důležitá skutečnost je pravděpodobná existence více isoform IrCB. Sojka a kol. (2008) popsal za použití screeningu střevní cDNA degenerovanými primery specifickými pro jednotlivé peptidázy možnost výskytu IrCB ve střevě klíštěte ve dvou nepatrně odlišných formách, zatímco ostatní v této práci klasifikované střevní proteázy byly prezentovány jen jednou formou enzymu. Zjištění existence dvou isoform cathepsinu B je srovnatelné s daty prezentovanými u *S. mansoni* (Sajid a kol., 2003) a *Trichobilharzia regenti* (Dvořák a kol., 2005), kde byla popsána více než jedna isoforma cathepsinu B. Dvě isoformy cathepsinu B podrobené vlivu RNAi byly v této diplomové práci označeny jako cathepsin B1 (cathB1) a cathepsin B2 (cathB2). U cathepsinu B2 se jevila jeho patrná upregulace po sání klíštěte. S využitím RT-PCR bylo zřejmé, že IrCB je přítomen ve všech vývojových stádiích klíštěte *I. ricinus* kromě vajíček a exprimován je pouze ve střevní tkáni (Sojka a kol., 2008).

1.5. Slinné žlázy

Slinné žlázy jsou největšími v těle klíštěte. Jsou tvořeny shluky sekrečních váčků (acinů), které jsou spojeny systémem kanálků se slinnými ducty. Hlavní dukt se uvnitř slinné žlázy větví na mnoho kratších ductů, které dále ústí do jednotlivých acinů. Hlavním sběrným kanálkem tečou sliny do salivaria, což je výběžek ústní dutiny. U samiček klíštěte *I. ricinus* jsou přítomny dva typy acinů – agranulární (pyramidální) a granula sekretující (Balashov, 1979). Slinné žlázy zastávají důležitou funkci při sání na hostiteli a zároveň jsou primárním místem přenosu širokého spektra patogenů, neboť zde působí již zmíněný slinami aktivovaný přenos patogenů do hostitele (SAT). Slinné žlázy obsahují různé enzymy, proteiny, soli a farmakodynamické modulátory, které působí proti hemostatickým a zánětlivým složkám imunitního systému hostitele a tím usnadňují příjem krve do klíštěte. Důležité antikoagulační vlastnosti klíštěčích slin (SGE-Salivary gland extract) jsou dány přítomností molekulárních inhibitorů koagulačních faktorů V a VII (Gordon a Allen, 1991) a také přítomností apyrázy (ATP-difosfohydroláza), která zabraňuje agregaci krevních destiček v místě sání klíštěte (Ribeiro a kol., 1985). Slinné žlázy zajišťují i další funkce, mezi které patří absorpce vody z ovzduší během období, kdy klíště neparazituje na hostiteli (Wikel a kol., 1994) a sekrece

elektrolytů, vody a cementu, pomocí něhož se klíště ukotví v kůži napadeného hostitele (Munderloh a Kurti, 1995). Klíštěcí sliny mají také schopnost suprimovat nebo naopak zvyšovat produkci některých cytokinů při sání na hostiteli (Kopecký a kol., 1999).

1.6. Peritrophická membrána

Peritrophická membrána (PM) funguje ve střevě většiny krev sajících členovců jako fyzická bariéra. Vyskytuje se ve 2 formách (PM-1 a PM-2). PM-1 je syntetizována a sekretována buňkami střevního epitelu v důsledku pozření potravy. PM-2 je syntetizována neustále nezávisle na příjmu potravy ve specializovaném orgánu zvaném Cardia, který se nalézá v anteriorní oblasti střeva (Peters, 1992). Přítomnost PM byla zatím zaznamenána pouze u tří druhů klíšťat. Výskyt peritrophické matrix byl popsán u klíštěte *Ixodes dammini* (Rudzinska a kol., 1982), u *Ornithodoros moubata* z čeledi *Argasidae* (Grandjean, 1984) a ve všech vývojových stádiích klíštěte *I. ricinus* (Zhu a kol., 1991). Svým složením se podobá peritrophické membráně hmyzu (Martoja a Ballan-Dufrançais, 1984). Přesná chemická struktura PM je stále nejasná, ale předpokládá se, že je tvořena převážně proteoglykany, různými proteiny a chitinem, který je její důležitou strukturní složkou. Funkce této membrány spočívá v obklopení pozřené krve a její izolaci od epiteliálních buněk. Další její funkce je vytvoření bariéry před možnými patogenními mikroorganismy, které jsou přijaty v nasáté krvi a mohly by ohrozit samotné klíště (Peters, 1992). Předpokládá se, že určitá obnova PM se odehrává během celé periody sání klíšťat a každá nová generace střevních buněk syntetizuje svou novou matrix (Grigorieva a Amosova, 2004).

1.6.1. Peritrophiny

Peritrophiny se řadí do velké rodiny chitin vázajících proteinů. Tato skupina proteinů je silně asociována s peritrophickou membránou (PM). V této membráně jsou proteiny vázány na chitinová vlákna nebo jiné peritrophiny (Tellam a kol., 1999). Tato vazba je umožněna přítomností chitin vázající peritrophin A domény. Doména se skládá z 65-70 aminokyselin a obsahuje konzervovanou pozici 6-ti cysteinů. Podle práce Wanga a Granadose (2001) se předpokládá, že struktura chitin vázající domény v peritrophinech má za následek překřížení a vazbu chitinových vláken při tvorbě PM. Biologická funkce peritrophinů není zatím příliš objasněná, ale předpokládá se, že mají vliv na trávení, obranu organismu před infekcí, ochranu střevní struktury nebo i výměnu plynů v trachejích. Právě poslední zmíněná funkce peritrophinů byla objasněna u *Drosophily melanogaster* (Barry a kol., 1999), kde byl

izolován protein z rodiny chitin vázajících proteinů z trachejí, nikoliv tedy ze střevní tkáně, ve které zastávají peritrophiny svou nejdůležitější roli. Tato skutečnost ukazuje, že nejméně jeden zástupce ze skupiny chitin vázajících proteinů má funkci nejen ve střevní peritrophické matrix *D. melanogaster*, ale i v trachejích a pravděpodobně i ováriích. Vzhledem k prokázání přítomnosti peritrophinů i v trachejích mohou zastávat také důležitou roli jako spojovací článek mezi hmyzem a okolním prostředím, zejména při výměně plynů a při eliminaci vniknutí parazitů do organismu.

1.6.2. Chitin binding protein – peritrophin A

Chitin vázající protein (CBP) se řadí do rozsáhlé skupiny peritrophinů, která byla podrobně popsána hlavně u řady druhů hmyzu (Barry a kol., 1999; Tellam a kol., 1999). Peritrophin A doména se nachází v chitin vázajících proteinech, zejména v peritrophické matrix proteinů hmyzích a zvířecích chitináz. Je to extracelulární doména, která obsahuje šest konzervovaných cysteinů, které pravděpodobně tvoří tři disulfidické můstky. Chitinová vazba byla prokázána pro protein obsahující pouze dvě z těchto domén. Peritrophin A, jedna z komponent peritrophické matrix, byl poprvé izolován ze střeva hmyzu. Slouží k ochraně organismů před napadením mikroorganismy a k stimulaci trávení potravy.

Chitin je β -1,4 homopolymer N-acetyl-D-glukosaminu. Je to nerozpustný strukturní polysacharid, který zastává důležitou funkci jako stavební složka extracelulárních struktur v exoskeletonu členovců včetně klíšťat (You a kol., 2003). Chitinové mikrofibrily spolupracují s proteiny při formování chitinózních struktur epidermis a také při vzniku zmiňované peritrophické matrix (PM) ve střevní lumen klíštěte po sání krve (Shao a kol., 2001).

1.7. RNA interference

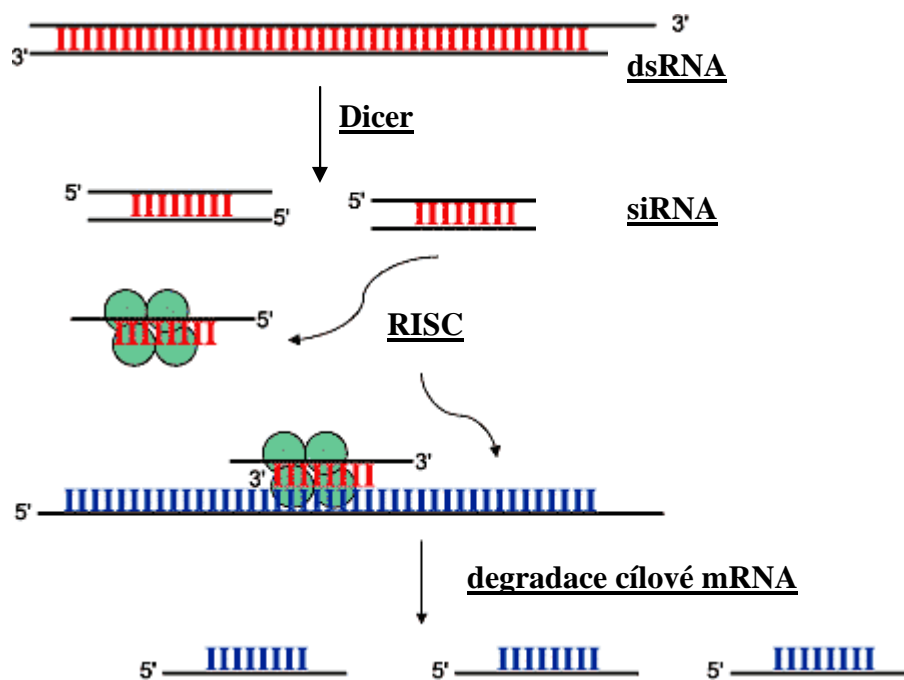
RNA interference (RNAi) je teprve v nedávné historii objasněný evolučně konzervovaný proces, který umožňuje regulovat vnitrobuněčnou expresi sledovaného genu na posttranskripční úrovni. V tomto molekulárně biologickém procesu fragmenty dvouvláknové RNA (dsRNA) spolu s dalšími složkami tohoto mechanismu interferují s komplementární mRNA, dochází k její vysoce selektivní degradaci a následnému potlačení exprese cílového genu (Bernstein a kol., 2001). Nepřítomnost sledovaného proteinu pak umožňuje sledovat možný fenotypový projev. Poté, co byl tento proces popsán na molekulární úrovni, bylo zřejmé, že RNA interference je významnou formou posttranskripčního genového utlumení, při kterém dvoušroubovice RNA indukuje degradaci homologních transkriptů. Tím je

napodoben účinek případné ztráty funkce genu nebo snížení jeho aktivity, ve výsledku tedy RNAi inhibuje aktivitu cílového genu a tedy i produkci kódovaného proteinu v tkáních.

Teprve ale popsání metody RNAi u hlístice *Caenorhabditis elegans* (Fire a kol., 1998) znamenalo významný pokrok v objasnění tohoto procesu. Američtí vědci Andrew Fire ze Stanfordovy univerzity a Craig Mello z Massachusettské univerzity popsali fenomén RNAi a odstartovali tak revoluci v molekulární biologii. Původně se autoři tohoto objevu pokoušeli o inaktivaci genu *unc-22* v *C. elegans* pomocí injikování antisense-RNA komplementární k cílové mRNA. Podle jejich předpokladu mělo dojít ke tvorbě RNA duplexů z dodané antisense-RNA a mRNA. Vzniklé duplexy měly za úkol bránit translaci příslušné mRNA a následné expresi genu *unc-22*. Jako kontrolu použili háďátka injikovaná sense-RNA. Poté ovšem překvapivě zaznamenali stejný mutantní fenotyp u pokusných i kontrolních jedinců. Tuto skutečnost následně objasnili tím, že injikované RNA použité v pokusu byly připraveny in vitro transkripcí, která ovšem i přes svou vysokou specifitu tvoří určitou dsRNA kontaminaci. A právě přítomnost dsRNA byla následně prokázána jako vlastní interferenční agens, které umožňuje specifickou degradaci mRNA. V roce 2006 získali Andrew Z. Fire a Craig C. Mello za tento objev Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. V následujících letech se zjistilo, že mechanismus RNAi se vyvinul pravděpodobně jako obrana genomu eukaryotické buňky před napadením (ds)viry a transpozony, jejichž genetická informace je uložena v některých životních stádiích ve formě dsRNA (Tabara a kol., 1999). Dvouřetězcová RNA v normálním procesu exprese genetické informace nevzniká, ale často bývá meziproduktem při replikaci zmíněných virů. Mnoho eukaryotických organismů tudíž na přítomnost dsRNA reaguje obrannými mechanismy v podobě RNAi. Proces RNAi byl zjištěn u většiny eukaryot (Cogoni a Macino, 2000), ačkoliv u některých organismů se zdá být naopak téměř potlačen, například u *Saccharomyces cerevisiae*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* a *Plasmodium falciparum* (Cerutti a Casas-Mollano, 2006).

Mechanismus RNA interference je schematicky znázorněn na obrázku (Obr. 3). Po vstupu dsRNA do buňky, je tato dvoušroubovice za spotřeby ATP (Zamore a kol., 2000; Nykänen a kol., 2001) štěpena specifickou RNAázou III, která se nazývá DICER (Bernstein a kol., 2001). Ta ji rozštěpí na krátké nekódující dvouřetězcové molekuly siRNA (Elbashir a kol., 2001), což jsou oligonukleotidy obsahující 19-25 párů basí, které obsahují fosfátovou skupinu na 5' konci a volnou – OH skupinu na 3' konci. Vzniklé siRNA se dále váží na specifický multiproteinový komplex s helikázovou aktivitou zvaný RISC (RNA-induced silencing complex) (Hammond a kol., 2000). Součástí RISC komplexu je i proteinová

komponenta Argonaute (Cerutti, 2003). V tomto RISC komplexu dochází k rozpletení dvouřetězcových struktur siRNA a s RISC komplexem zůstává asociováno pouze „anti-sense“ vlákno siRNA („sense“ vlákno je degradováno). Takto vzniklý komplex vykazuje endonukleázovou aktivitu, siRNA je schopna rozeznat komplementární cílovou sekvenci mRNA a komplex RISC zahájí následné štěpení molekuly mRNA uprostřed oblasti homologie (Elbashir a kol., 2001). Štěpení zajišťují svou nukleázovou aktivitou zmiňované proteiny z rodiny Argonaute. Poté je rozštěpená mRNA degradována buněčnými RNAázami. Následně dochází k znemožnění použití odbourané mRNA jako templátu pro translaci sledovaného proteinu. Původní molekula siRNA během štěpení cílové mRNA není spotřebována, odpojí se a celý proces se může opakovat. Tímto způsobem může jedna molekula siRNA pomoci vyhledat a inaktivovat mnoho molekul konkrétní mRNA. Doposud nepřilíš známou skupinou proteinů týkající se amplifikace RNAi signálu jsou specifické RNA dependentní RNA polymerázy (RdRP), které mohou po skončení procesu využít jednotlivé řetězce siRNA jako primery a dosyntetizovat novou dsRNA (Nishikura, 2001). Ta se pak stane opět substrátem pro DICER a cyklus se opakuje. Jedna molekula dsRNA tak může způsobit likvidaci velkého počtu molekul komplementární mRNA. Tímto lze vysvětlit relativně dlouhodobou účinnost RNA interference u některých organismů (Hannon, 2002). Například v genomu klíštěte *I. scapularis* bylo zaznamenáno sedm různých RdRP polymeráz (Hajdušek, Ph.D. thesis, 2009), avšak popsání přesného působení a funkcí zjištěných RdRP molekul bude vyžadovat ještě mnoho času. Tyto polymerázy ale nebyly doposud detekovány u lidí a dalších obratlovců, což by mohlo v budoucnu pomoci při vytváření protiklíštěcích vakcín (Hajdušek, Ph.D. thesis, 2009).



Obr. 3: Stručné schéma popisující mechanismus RNAi

Co se týká možnosti uplatnění fenoménu RNAi v klíšťecí problematice, tak vůbec první studie pojednávající o existenci RNAi u klíšťat byla publikována v roce 2002 (Aljamali a kol., 2002). V další práci se tito autoři zaměřili na možnost utlumení HBP (histamin vázající protein) u nenasátých samic klíšťat *Amblyomma americanum* (Aljamali a kol., 2003). Po injikaci HBP dsRNA docházelo u testovaných jedinců ke snížení schopnosti slinných žláz vázat histamin. Utlumení pomocí RNAi přesto nebylo úplné, neboť určitým rušivým elementem po aplikaci dsRNA mohlo být následné sání klíšťat, kdy dochází ke zvětšování tělesného objemu a k fyziologickým změnám klíšťecích tkání. S podobnými komplikacemi se potýkal Boldbaatar a kol. (2006) u *H. longicornis* při objasňování funkcí longepsinu, u kterého také nebylo dosaženo kompletního vypnutí na transkripční úrovni pomocí RNAi. Naopak pozitivních výsledků při použití RNAi dosáhl Ramakrishnan a kol. (2005) ve studiu funkcí klíšťecích slinných žláz. Metoda RNAi byla využita i při objasnění funkcí proteinů synaptobrevinu a cystatinu během sání krve u *A. americanum* (Karim a kol., 2005). Výsledný efekt dsRNA ve střevě na rozdíl od slinných žláz ale nebyl 100%, neboť utlumení mRNA kódující gen pro cystatin ve střevní tkáni bylo nestabilní a během několika dnů došlo k opětovnému dosyntetizování mRNA na normální transkripční hladinu. Vcelku úspěšného utlumení exprese sledovaných proteinů pomocí RNAi bylo dosaženo ve střevě klíšťat v dalších studiích (Pal a kol., 2004; Miyoshi a kol., 2007). Jiné pokusy pomocí RNAi byly

provedeny k analyzování funkce subolesinu u *Ixodes scapularis* (de la Fuente a kol., 2006). Testované samice prokazovaly nižší schopnost přežívání, sání i kladení vajíček. Potlačení exprese genu u samců způsobilo nejen porušení funkce střeva a slinných žláz, ale i sterilitu. Určité komplikace s použitím RNAi u klíšťat mohou nastat v důsledku velké variability genů u jednotlivých druhů klíšťat, což může vést k jen omezenému utlumení genů pomocí RNAi a tedy výsledný efekt utlumení je nedostatečný (Soares a kol., 2005). Fenomén RNAi byl uplatněn také u klíšťat *Boophilus microplus*, *A. americanum*, *D. variabilis* a *I. scapularis* (Nijhof a kol., 2007; Kocan a kol., 2007) při výzkumu vlivu RNAi proti subolesinu na klíštěcí potomstvo. Injikace dsRNA do hemolymfy nasátých samic způsobila prokázané utlumení exprese subolesinu v následném larválním stádiu. Avšak potlačení sledovaného genu již nebylo znatelné u dospělců (Nijhof a kol., 2007). Tento výsledek může hovořit proti možnosti amplifikace procesu RNAi u klíšťat, která byla naopak prokázána jako skutečnost zajišťující dlouhodobé trvání silencingu i v dalších generacích u *C. elegans* (Vastenhouw a kol., 2006). De la Fuente a kol. (2005) ve své práci naznačil možnosti využití RNAi také při detekování klíštěcích ochranných antigenů, které znamenají velkou překážku při vývoji protiklíštěcích vakcín. Další využití RNA interference bylo úspěšné u klíštěte *I. ricinus* (Decrem a kol., 2008), kde napomohla k objasnění funkcí metalloproteáz (Metis 1 a 2) ve slinných žlázách testovaných jedinců. Utlumení genů pro Metis 1 a Metis 2 způsobilo částečně sníženou schopnost sání u klíšťat injikovaných specifickou dsRNA a současně byla zaznamenána i vyšší mortalita klíšťat. Pomocí RNA interference byla zkoumána také funkce trávicí proteázy longipainu ve střevním epitelu u *H. longicornis* (Tsuji a kol., 2008). Utlumení exprese longipainu mělo za následek zvýšené množství parazita *Babesia*, jehož je *H. longicornis* vektorem. Využití metody RNAi vedlo ke zjištění, že longipain je důležitý pro přežití klíštěte a může hrát roli i v přenosu parazita *Babesia* u *H. longicornis*. Metoda RNAi pomohla také k identifikaci důležitého proteinu ferritinu 2, který hraje významnou roli ve složitém procesu metabolismu železa u klíštěte *I. ricinus* a konkrétně se podílí na transportu železa mezi střevem a tkáněmi. Utlumení exprese ferritinu 2 pomocí RNAi mělo za následek zhoršené sání klíšťat a jejich zasychání na hostiteli, proto by tato skutečnost mohla být využita v budoucnu k vývoji vakcín proti klíšťatům (Hajdušek a kol., 2009).

2. Cíle práce

Cílem diplomové práce bylo pokusit se o aplikaci metody RNA interference k utlumení exprese proteinu CBP ve slinných žlázách a trávicích proteáz cathepsinu B1 a cathepsinu B2 ve střevě samic klíštěte *I. ricinus* během různých period sání na morčatech. Vliv RNAi byl hodnocen po injekci či kapilárním sání specifické dsRNA pomocí metody RT-PCR a Western blot u jednotlivých testovaných skupin klíšťat.

3. Materiál a metody

3.1. Použité chemikálie a kity

PCR; RNA a DNA elektroforéza

10x TBE pufr	0,89 M Tris; 0,89 M kys. boritá; 20 mM Na ₂ EDTA; DEPC H ₂ O
1x TBE pufr	10x TBE pufr ředěný DEPC H ₂ O
50x TAE pufr	200 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA
1x TAE pufr	50x TAE pufr ředěný DEPC H ₂ O
EtBr	Ethidium bromid (0,5 µg/ml)
Agaróza	1% agarosa pro ELFO
Polymeráza	Taq polymeráza (Top-bio s.r.o.)
6x Loading Dye	0,25% bromfenolová modř; 0,25% xylencyanol; 30% glycerol, 1,2% SDS; 60 mM fosfát sodný
PCR H ₂ O	filtrovaná, destilovaná, autoklávovaná voda (Millipore)
DNA Ladder	GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas)
RNA Ladder	High Range RNA Ladder (MBI Fermentas)
DEPC H ₂ O	dietylpyrokarbonát 1000x ředěný v dest. H ₂ O, odstátá, autoklávovaná

Média a půdy pro pěstování bakterií

SOC médium	2% bacto-trypton; 0,5% bacto-yeast extract; 0,05% NaCl; 2,5mM KCl; 10 mM MgSO ₄ ; 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: 1M)
Antibiotika	ampicillin (zásobní roztok: 50 mg/ml H ₂ O)

Použité kity

Izolace PCR produktu z agarózového gelu	JET Quick Gel Extraction Spin Kit (Genomed)
Čištění PCR produktu	JET Quick PCR Purification Kit (Genomed)
Ligační reakce	pGEM T-easy Kit
Izolace plazmidů	QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen)
Syntéza ssRNA	MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit (Ambion)
Syntéza cDNA	Enhanced Avian HS RT-PCR 100 Kit (Sigma)

SDS-PAGE a Western Blot

5x Elektroforetický pufr	0,125 M Tris/HCl; 0,96 M glycin; 0,5% SDS
5x Gelový pufr	1,875 M Tris/HCl; pH 8,8
1x Vzorkový pufr	50 mM Tris/HCl (pH 6,8); 100 mM dithiotreitol; 2% SDS; 0,2% bromophenol blue; 10% glycerol
Odbarvovací pufr	methanol:kys. octová:dest. H ₂ O (25:10:65)
LMW – proteinový marker	LMW Electrophoresis Calibration Kit (Amersham)
Barvicí roztok	0,05% Coomassie Brilliant Blue; 50% methanol; 10% kys. octová
PBS – Tween	1x PBS; 0,05% Tween 20
Blotovací pufr	0,125 M Tris; 0,96 M glycin; 0,1% SDS; 20% methanol
Blokovací pufr	5% sušené mléko v PBS Tween 20
TEMED	N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine
Substrátový roztok	~10 mg diaminobenzidin; 50 µl H ₂ O; 100 ml 0,1 M Tris/HCl (pH 7,8)
Primární protilátky	Ra X CBP; Ra X cathB
Sekundární protilátka	SwAR/Px (ředění 1:1000)

Příprava dsRNA

Proteináza K	1 µl proteináza K (20 mg/ml) v 150 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8) a 2 mM CaCl ₂
10% SDS	dodecylsírán sodný

Izolace totální RNA

RNaseZap®	RNase decontamination solution (Ambion)
Tri Reagent™	Sigma®, technical Bulletin MB - 205, 1999

Software

Editace DNA sekvencí	Editseq (DNASTAR)
Analýza DNA sekvencí	NBCI (www.ncbi.nlm.nih.gov)
Návrh primerů	Primer Select (DNASTAR)
Clustal W	MegAlign (DNASTAR)
Fotodokumentace	AlphaDigiDoc RT (Kodak)

3.2. Použité primery

Použité primery byly navrženy v programu Primer select (DNASTAR) a následně obědnány u firmy Generi Biotech (Tab. 1).

Tab. 1: Oligonukleotidy použité v diplomové práci

Název	Forward primery 5'-3'	Reverse primery 5'-3'
CBP	TGC TTC GAG CTC CAG C	AAT GCT TCG CAA ACA AC
CathB1	CCG CGA CCA GTC CAC CT	CCC AGG CTG CCG CCG GGT A
CathB2	CCA TAT CGG ACC GAA TC	AGC GGT GTC TCC ACC GTT G
Aktin	CCG TGC CGT GTT CCC CTC CAT	CCG GCC GGC CAA GTC CAG A

3.3. Klíšťata

3.3.1. Sběr a chov klíšťat

Klíšťata *Ixodes ricinus* byla sbírána vlajkováním vegetace bílou flanelovou látkou v lesní lokalitě u Českých Budějovic. Klíšťata byla nasbírána do zkumavek, kam byla přidána tráva pro udržení vlhkosti. Následně byla klíšťata umístěna do laboratorního chovu Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích, kde byla chována při teplotě 25-26°C s fotoperiodou L:D 12:12. V následujících pokusech klíšťata sála na laboratorních morčatech, na jejichž hřbetě byla upevněna pomocí pryžového kloboučku (Obr. 4) překrytého shora síťovinou (na obrázku je síťovina odstřižena).



Obr. 4: Klíšťata v pryžovém kloboučku během sání na morčeti

3.3.2. Aplikace dsRNA do klíšťat

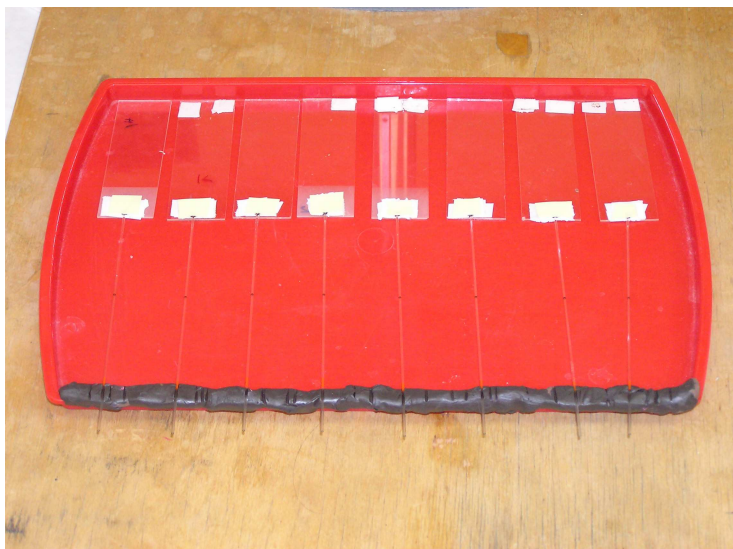
V klíštěcí problematice jsou známy čtyři různé techniky aplikace dsRNA do klíštěte: injekce dsRNA, kapilární sání dsRNA, nasáknutí dsRNA ponořením klíštěte do suspenze a produkce dsRNA samotným klíštětem po virové infekci. V této diplomové práci byly použity první dvě popsané metody k vyvolání účinku RNAi u *I. ricinus*.

3.3.2.1. Injekce dsRNA

Injekce je nejběžnější metoda k doručení dsRNA do klíštěte a poprvé byla použita k injikaci dsRNA do samic klíštěte *A. americanum* (Aljamali a kol., 2002). V mé diplomové práci byla injekce dsRNA prováděna pomocí mikrokapiláry umístěné na mikromanipulátoru (Narishige) pro lepší manipulaci a snadnou kontrolu injikovaného objemu. Tento postup popsal Narasimhan a kol. (2004). Vpich byl prováděn do hemolymfy mezi I. a II. kyčelním kloubem na vertikální straně klíštěte. Injekováno bylo 0,5 µl nasyntetizované dsRNA o koncentraci 3 µg/µl. Následně byla injikovaná klíšťata ponechána při pokojové teplotě po dobu 24 hodin ve vlhkém prostředí a poté následovalo sání na morčatech (Obr. 4).

3.3.2.2. Kapilární sání dsRNA

Metoda kapilárního sání byla popsána například v práci Gern a kol. (1990) na dospělých *I. ricinus* a kapilární sání roztoku dsRNA u nymf *I. scapularis* využil a popsal jako jeden z prvních Soares a kol. (2005). V našem případě byly nejprve samice upevněny dorsální stranou pomocí oboustranné lepicí pásky na podložní sklo. Pak byly fixovány z ventrální strany lepicí páskou. Skla s fixovanými klíšťaty byla umístěna na plastový nosič a naproti ústnímu ústrojí klíšťat byla na okraj víka nalepena modelovací hmota. Na hypostom a palpu klíšťat byly pod stereomikroskopem nasazeny skleněné mikrokapiláry s připravenou dsRNA. Druhý konec mikrokapilár byl upevněn do modelovací hmoty (Obr. 5). Takto byla klíšťata připravena k sání a umístěna do termostatu o teplotě 34 °C, kde byla vyšší vlhkost chránící klíšťata před dehydratací (Broadwater a kol., 2002). V těchto podmínkách trvalo kapilární sání 3 hodiny a klíšťata byla schopna během této doby přijmout přibližně 0,5 µl dsRNA z mikrokapiláry. Následující den byla klíšťata umístěna na morčata, kde pokračovala v přirozeném sání.



Obr. 5: Kapilární sání dsRNA klíšťaty upevněnými na plastovém nosiči

3.3.3. Izolace tkání z klíšťat

Klíšťata byla uchycena na Petriho misku s tuhým voskem a pitvána sterilními nástroji ošetřenými RNase Zapem® pod binokulárním mikroskopem v PBS pufru. Pomocí nůžek byla odstraněna posteriorní kutikula, požadované tkáně byly vypitvány, promyty v nadbytku PBS a urychleně ukládány jak do 1,5 ml popsaných mikrozkuvek pro následnou analýzu Western Blotem, tak i do 1,5 ml mikrozkuvek s 0,5 ml Trireagentu™ pro izolaci totální RNA. Vypitvané tkáně byly uloženy do -80 °C.

3.4. RNAi protokol

1) PCR amplifikace

Prvním krokem v procesu tvorby dsRNA byla PCR amplifikace cDNA ze slinných žláz a střeva samic pět dní nasátých pomocí navržených specifických primerů (Tab. 1). Reakční směs byla namíchána dle následujícího postupu.

Reakční směs:

10x Taq buffer	1 μ l
dNTPs (10 mM každý)	0,25 μ l
primer – Forw (10 mmol)	1 μ l
primer – Rev (10 mmol)	1 μ l
Taq polymeráza (Top-bio s.r.o.)	1 μ l
cDNA	1 μ l
dH ₂ O	4,75 μ l

Celkový objem: 10 μ l

Program pro PCR:

- 1) úvodní denaturace94 °C.....5 minut
 - 2) denaturace94 °C.....30 sekund
 - annealing.....55 °C..... 30 sekund
 - elongace.....72 °C.....1 minuta
- } 30 cyklů
- 3) konečná elongace.....72 °C..... 10 minut

Amplifikační reakce byla prováděna v 0,2 ml mikroskopických v termocycleru Mastercycler® (Eppendorf). Výsledky byly analyzovány v 1% TAE agarózovém gelu obsahujícím ethidium bromid (0,5 μ g/ml). Elektroforéza probíhala při 100V po dobu 30 minut. Gel byl poté vizualizován na UV iluminátoru a vyfocen.

2) Extrakce DNA z gelu

PCR produkt byl vyříznut z gelu a přečištěn pomocí JET Quick Gel Extraction Spin Kit (Genomed) podle postupu uváděného výrobcem. DNA byla eluována 30 μ l dH₂O.

3) Restrikce

Restrikční reakce plazmidu pl 10 a získaného PCR produktu probíhala pomocí restrikčních enzymů Apa I a Xba I po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C v následujícím složení:

	<u>plazmid</u> <u>pl 10</u>	<u>PCR</u> <u>produkt</u>
Buffer TANGO 10x	3 µl	3 µl
Enzym (APA I, XBA I)	1 µl každý	1 µl každý
DNA	3 µl (0,5 µg)	20 µl
H ₂ O	23 µl	6 µl
<u>Celkový objem:</u>	<u>30 µl</u>	<u>30 µl</u>

4) Purifikace

Dalším krokem byla purifikace PCR produktu a plazmidu pomocí JET Quick PCR Purification Kitu (Genomed) dle přiloženého návodu.

5) Ligace

Ligační reakce byla připravena s použitím pGEM T-easy kitu a probíhala přes noc při 4 °C. Schéma složení ligační směsi bylo následující:

Buffer	5 µl
Naštípaný plazmid pl 10	2 µl
DNA (PCR produkt)	2 µl
T4 ligáza	1 µl
<u>Celkový objem:</u>	<u>10 µl</u>

6) Transformace plazmidu do TOP 10 buněk

Buňky OneShot®TOP 10 (Invitrogen) byly vyjmuty z -80 °C a nechány 10 minut rozmrazit na ledu. K 25 µl buněk bylo přidáno 10 µl připravené ligační směsi a směs byla inkubována 25 minut na ledu. Pak následoval tepelný šok při teplotě 42 °C po dobu 1 minuty, aby bakterie byly schopny přijmout vektorovou DNA. Poté byla směs ihned zchlazena po dobu 2 minut na ledu. Následovalo přidání 400 µl SOC média a inkubace směsi na třepačce 1 hodinu při teplotě 37 °C. Získaná směs byla nakonec ve flow-boxu nalita do Petriho misky, která obsahovala LB médium s ampicilinem (50 µg/ml). Suspenze byla rozetřena po celé ploše agaru a miska byla ponechána přes noc při 37 °C. Narostlé kolonie byly další den vybrány a překřížkovány do nové misky, kde následovala opět kultivace přes noc. Dále bylo nutné zjistit pomocí PCR přítomnost plazmidu nesoucího sledovaný gen v jednotlivých narostlých bakteriálních koloniích a tedy ověřit úspěšnost transformace plazmidu do bakteriálních buněk. Vybrané pozitivní klony byly následně použity pro přeočkování do připraveného LB média s ampicilinem (50 µg/ml). Jejich kultivace probíhala přes noc na třepačce při teplotě 37 °C.

7) Izolace plazmidů

Plazmidy byly izolovány a přečištěny z 2–3 ml narostlých buněčných kultur pomocí QIAprep® Spin Miniprep Kitu (Qiagen) podle manuálu. Získaná plazmidová DNA byla eluována 30 µl dH₂O. Její množství bylo proměřeno na UV spektrofotometru a přítomnost zaklonovaného genu byla ověřena osekvenováním v sekvenační laboratoři.

8) Restrikce purifikovaného plazmidu

Při restrikci byly použity enzymy Apa I a Xba I. Složení reakcí bylo následující:

10 µg plazmid	30 µl
Buffer TANGO	5 µl
Enzym (Apa I; Xba I)	6 µl
H ₂ O	9 µl
<u>Celkový objem:</u>	<u>50 µl</u>

Takto připravené restriční reakce poté probíhaly 2 hodiny při 37 °C a úspěšnost restrikce byla ověřena elektroforézou.

9) Purifikace linearizovaného plazmidu

K našťípanému plazmidu bylo přidáno ve sterilním boxu 25 µl proteinázy K a 3,75 µl 10% SDS. Takto připravená směs byla inkubována po dobu 30 minut za teploty 50 °C. Následovalo přidání 80 µl fenol-chloroformu, promíchání na vortexu a centrifugace 5 minut při nejvyšších otáčkách. Poté bylo odebráno přibližně 80 µl vodné fáze do nové mikrozkušavky a k ní přidáno 80 µl chloroformu. Opět byla směs promíchána a stočena po dobu 5 minut. Následovalo další odebrání přibližně 80 µl vodné fáze, přidání 80 µl izopropanolu a promíchání na vortexu. Získaná směs byla nechána 15 minut při laboratorní teplotě a pak stočena v centrifuze 30 minut. Získaný pelet byl promyt 80 µl 80% EtOH a centrifugován 8 minut. Po odsání EtOH byla nechána mikrozkušavka ve sterilním boxu cca 10 minut, aby vyschly zbytky EtOH. Plazmidový pelet byl poté rozpuštěn v 20 µl DEPC H₂O. Množství přečištěného plazmidu bylo na závěr spektrofotometricky změřeno.

10) Syntéza ssRNA

Reakční směsi pro syntézu sense i antisense vláken ssRNA byly připraveny mimo led. Syntéza jednovláknové RNA probíhala při 37 °C v termostatu po dobu 10 hodin a připravené reakční směsi byly lehce promíchávány každé 2 hodiny. Syntéza se uskutečnila pomocí reagensů z MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kitu (Ambion) dle následujícího schématu:

dNTPs (A,U,G,C)	8 µl (2 µl každý)
Buffer (37 °C, vortex)	2 µl
Lin. plazmid	x µl (1 µg, max 8 µl)
Enzyme mix (led)	2 µl
H ₂ O	doplnit do 20 µl (H ₂ O+plazmid=8 µl)

Celkový objem: 20 µl

11) Purifikace ssRNA

Následovala purifikace obou vláken ssRNA opět pomocí MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kitu (Ambion). Nejprve se k vzorkům přidal 1 µl DNAzy a po inkubaci 15 minut při 37 °C se přidalo 115 µl DEPC H₂O a 15 µl acetátu amonného (5 M). Poté se směs promíchala na vortexu. Dále se přidalo 150 µl fenol-chloroformu, směs se promíchala na vortexu a stočila 5 minut v centrifuze. K odsáté vodné fázi o objemu ~ 150 µl bylo přidáno 150 µl chloroformu, promícháno a stočeno 5 minut. K další odebrané vodné fázi o objemu opět ~ 150 µl se přidalo 105 µl izopropanolu a promíchalo. Vytvořená reakční směs se nechala působit po dobu 30 minut v -20 °C. Pak byla stočena 30 minut při nejvyšších otáčkách v centrifuze. Po odsátí izopropanolu se nechala mikrozkušavka krátce vyschnout ve sterilním boxu a ve finální fázi byla jednovláknová sense i antisense RNA rozpuštěna 10 µl DEPC H₂O. Poté se koncentrace ssRNA (musí být > 3000 µg/ml) proměřila spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm na spektrofotometru Biophotometer (Eppendorf).

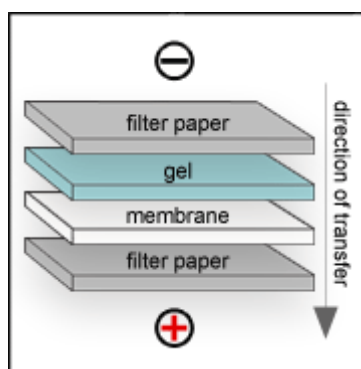
12) Hybridizace – syntéza dsRNA

Tento krok byl poslední při syntéze dsRNA. Spočíval ve smíchání vytvořených sense a antisense vláken ssRNA v poměru 1:1. Výsledná koncentrace musela činit 3 µg/µl. Po namíchání požadované koncentrace, byl vzorek umístěn do skleněného odměrného válce o objemu 2 litry. Do válce byla nalita vroucí voda a celý jeho povrch byl obalen hliníkovou fólií. Vzorek byl pak inkubován přes noc ve válci. Výsledek hybridizace byl zjištěn na agarózovém TBE gelu (Obr. 8) za použití Ambion loading dye (naneseno bylo 1 µg RNA):

3.5. SDS-PAGE a Western Blot

Proteiny byly rozděleny pomocí vertikální polyakrylamidové elektroforézy SDS-PAGE při konstantním napětí 100V. Po ukončení elektroforézy byl gel s připravenou membránou a filtračními papíry promyt cca 10 minut v blotovacím pufru s metanolem. Poté byl sestaven blotovací sendvič následujícím způsobem: blotovací papír Whatman, membrána, gel a blotovací papír Whatman (Obr. 6). Po sestavení blotovacího sendviče byly proteiny z SDS-PAGE gelu přebloťovány na nitrocelulózu membránu při proudu 150 mA po dobu 90 minut. Poté byl odříznut marker a obarven spolu s kontrolní částí membrány v 0,1% amidoblack v odbarvovacím pufru. Membrána byla dále blokována v 5% roztoku sušeného

mléka v PBS-Tween po dobu 1 hodiny. Poté byla membrána promyta v PBS-Tween (3x5 minut). Pak byla inkubována 2 hodiny v primární králičí protilátce (ředění 1:100 v PBS-Tween). Následně byla opět promyta v PBS-Tween (3x5 minut). Poté byla membrána inkubována 1 hodinu v sekundární králičí protilátce SwAR/Px (ředění 1:1000 v PBS-Tween). Následovalo poslední promytí v PBS-Tween (3x5 minut). Nakonec byl sledovaný protein vizualizován v substrátovém roztoku 3,3'-diaminobenzidinu (DAB), který se oxiduje během reakce peroxidázy s peroxidem vodíku (H_2O_2) a zabarví se do hněda. Reakce byla ve finální fázi zastavena promytím membrány vodou.



Obr. 6: Schéma popisující složení blotovacího sendviče použitého v metodě Western blot

3.6. Izolace totální RNA

Pro izolaci RNA z tkání je nutné použít ošetřené nástroje a autoklávované roztoky. Vypitvané vzorky byly nejprve homogenizovány sterilními nástroji v mikrozkuhavce s 0,5 ml Tri ReagentuTM ve sterilním boxu. Dále byl přidán chloroform (0,1 ml chloroformu na 0,5 ml Tri ReagentuTM), následovalo promíchání na vortexu, inkubace 2 minuty při pokojové teplotě a centrifugace 12000g, 15 minut, při 4 °C. Poté byla horní vrstva s RNA odsáta do nové 1,5 ml mikrozkuhavky, následovalo přidání isopropanolu (0,25 ml isopropanolu na 0,5 ml Tri ReagentuTM), překlopení mikrozkuhavky, promíchání na vortexu a inkubace 10 minut v -20 °C. Pak proběhla další centrifugace 12000g, 10 minut, při 4 °C a supernatant byl odstraněn. K peletu byl přidán 75% ethanol (0,5 ml ethanolu na 0,5 ml Tri ReagentuTM), následoval vortex a centrifugace 7500g, 5 minut, při 4 °C. Supernatant byl pak opět odstraněn a mikrozkuhavka s RNA se nechala vyschnout od ethanolu cca 15 minut na vzduchu ve sterilním boxu. V posledním kroku izolace bylo přidáno 30 μ l DEPC H_2O , promícháno a inkubováno 10 minut při 55 °C. Výsledné množství izolované RNA bylo změřeno pomocí spektrofotometru proti sterilní DEPC H_2O a vzorek RNA byl zkontrolován

pomocí gelové elektroforézy. Část ze získané mRNA byla následně použita pro reverzní transkripci na cDNA a zbytek mRNA byl uložen do -80 °C.

3.7. Reverzní transkripce

Tato metoda byla provedena pomocí kitu Enhanced Avian HS RT-PCR 100 Kit (Sigma). RNA izolovaná z jednotlivých tkání *I. ricinus* byla přidána tak, aby finální koncentrace RNA v reakci byla 0,5 µg/µl. Postupovalo se dle návodu v těchto krocích:

- 1) RNA.....x µl
Deoxynucleotide mix.....1 µl
Oligo (dt)₂₃1 µl
H₂O (Kit).....x µl
celkový objem 10 µl
- 2) centrifugace a inkubace reakční směsi 10 minut v 70 °C
- 3) inkubace 2 minuty na ledu, centrifugace a přidat:
- 4) 10x buffer for eAMV-RT.....2 µl
Enhanced avian RT.....1 µl
RNase inhibitor.....1 µl
H₂O (Kit).....6 µl
získaná cDNA 20 µl
- 5) na závěr inkubace 50 minut při teplotě 45 °C
- 6) poté zamrazit -20 °C pro RT-PCR

3.8. PCR amplifikace cDNA (RT-PCR)

Templátem pro RT-PCR pak byla získaná cDNA (naředěná 1:10) z různých tkání (střevo, slinné žlázy, vaječníky) klíšťat *I. ricinus*. Pro kontrolní reakce byly použity specifické primery pro aktinový gen, který je exprimován v přibližně stejném množství ve všech tkáních a jeho transkripce není ovlivněna sáním.

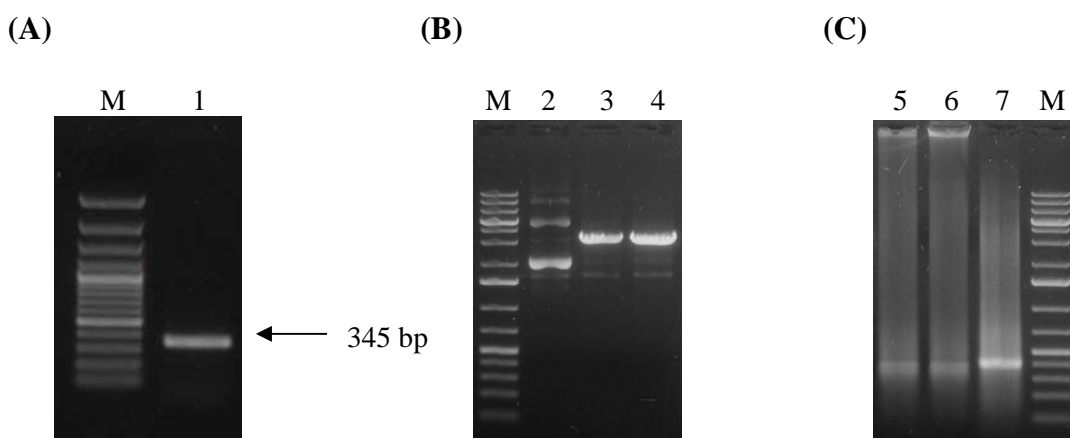
4. Výsledky

4.1. Utlumení exprese chitin vázajícího proteinu metodou RNAi

Nukleotidová a aminokyselinová sekvence klíčícího chitin vázajícího proteinu (CBP) je zobrazena v příloze č. 1. Délka cDNA sekvence činí 653 bazí. Předpokládaná molekulová hmotnost maturovaného proteinu byla stanovena na hodnotu 14323 Da a hodnota izoelektrického bodu (pI) na 3,92. Jedním z cílů této diplomové práce bylo prokázat předpokládanou lokalizaci CBP ve slinných žlázách klíštěte *I. ricinus* (Hajdušek, nepublikováno). Dále bylo nutné nasyntetizovat CBP dsRNA podle již popsaného protokolu. Následně jsem se pokusil o utlumení exprese CBP metodou RNAi pomocí injekce hybridizované dsRNA do samic klíštěte *I. ricinus*, které byly vzápětí ponechány k sání po dobu pěti dnů na laboratorních morčatech. Po dané době sání byly přeživší samice odebrány a bylo zjištěno, zda účinek RNAi měl nějaký efekt na snížení exprese CBP na transkripční a proteinové úrovni.

4.1.1. Syntéza CBP dsRNA

Prvním krokem přípravy dsRNA byla amplifikace cDNA ze slinných žláz samic pět dnů nasátých pomocí navržených primerů pro CBP (Tab. 1) a byl získán PCR produkt o velikosti 345 bp (Obr. 7A). Příprava a průběh PCR reakce, restrikce plazmidů, syntéza vláken RNA a finální hybridizace dsRNA (Obr. 7B,C) byla již popsána podrobně v kapitole věnující se celému průběhu RNAi protokolu.



Obr. 7: Příprava CBP dsRNA. Panel A – PCR amplifikace cDNA *I. ricinus* (M – marker, 1 – PCR produkt). Panel B – Klonování do plazmidu p10 a restrikce pomocí restrikčních enzymů Apa I a Xba I (M – marker, 2 – pl 10, 3 – Apa I, 4 – Xba I). Panel C – Hybridizace dsRNA (5 – sense RNA, 6 – antisense RNA, 7 – dsRNA, M - marker).

4.1.2. Injikace CBP dsRNA a následné sání samic po dobu 5 dnů

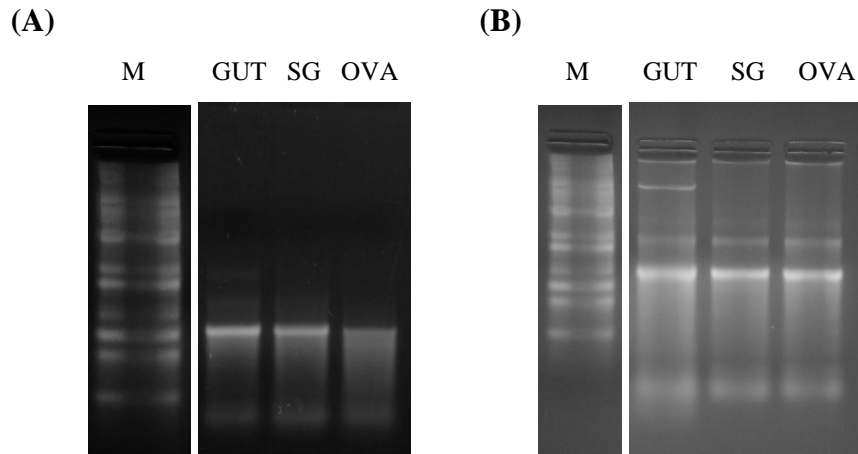
Nasyntetizovaná dsRNA byla následně použita k pokusu na samicích *I. ricinus*. Do první skupiny nasbíraných samic bylo pomocí mikrokapiláry injikován 0,5 µl kontrolní GFP dsRNA (Levashina a kol., 2001), neboť tento vysoce specifický protein získaný z organismu *Aequorea victoria* může v klíštěti spolehlivě fungovat jako inertní kontrola RNAi. Do druhé skupiny samic byla ve stejném množství injikována nasyntetizovaná CBP dsRNA. Poté se nechaly samice sát po dobu 5 dnů na morčatech. Po dané době byl zjištěn počet přeživších nasátých samic a byly zaznamenány hodnoty jejich váhy (Tab. 2). Výsledek naznačoval možný negativní dopad eliminace CBP pomocí RNAi na schopnost sání a mortalitu testovaných samic.

Tab. 2: Shrnutí výsledků RNAi experimentu po aplikaci dsRNA pro CBP mikroinjikací do samic *I. ricinus*

	GFP kontrola			CBP dsRNA		
	Počet před sáním	Počet po sání	Průměrná váha po sání (mg)	Počet před sáním	Počet po sání	Průměrná váha po sání (mg)
sání 5 dnů	20	13	26,4	20	8	21,9

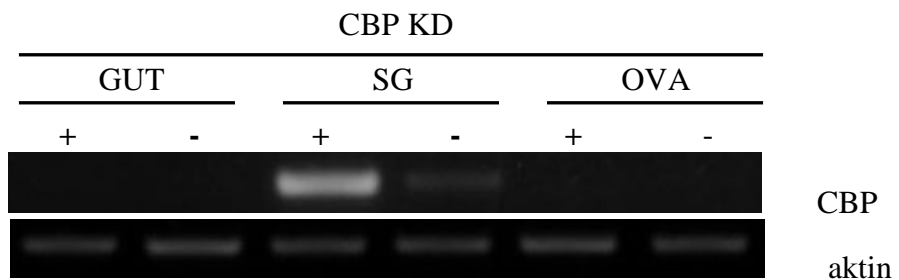
4.1.2.1. Ověření účinnosti RNAi na expresi CBP pomocí RT-PCR

Z přeživších nasátých samic s GFP dsRNA a CBP dsRNA byly nejprve vypitvány střeva, slinné žlázy a vaječníky. Následovala izolace totální RNA a její kvalita byla ověřena elektroforézou (Obr. 8).



Obr. 8: Kvalita vyizolované RNA z jednotlivých tkání *I. ricinus* byla potvrzena elektroforézou. Panel A – RNA ze střeva, slinných žláz a vaječníků samic *I. ricinus* injikovaných s kontrolní GFP dsRNA. Panel B - RNA ze střeva, slinných žláz a vaječníků samic *I. ricinus* injikovaných s CBP dsRNA.

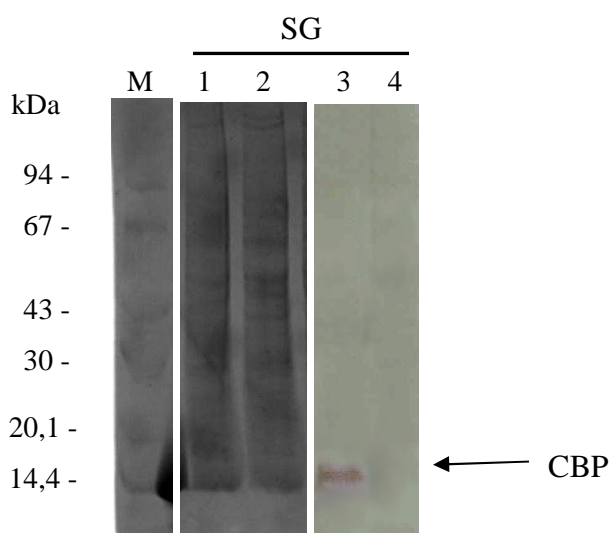
Po izolaci totální RNA následovalo přepsání RNA reverzní transkripcí do podoby cDNA. Následně byla provedena RT-PCR ke zjištění efektu RNAi. Na následujícím obrázku (Obr. 9) lze vidět poměrně úspěšné utlumení exprese chitin vázajícího proteinu (CBP) ve slinných žlázách pomocí RNAi. Tímto byla zároveň potvrzena exprese CBP výhradně ve slinných žlázách *I. ricinus*.



Obr. 9: Tkáňově specifická exprese CBP KD pomocí RT-PCR ze střeva, slinných žláz a vaječníků *I. ricinus* potvrdila předpokládanou expresi CBP výhradně ve slinných žlázách a zároveň prokázala efekt RNAi na snížení exprese CBP v této tkáni. Symbolem „plus“ jsou označeny výsledky amplifikované cDNA z jednotlivých tkání klíšťat injikovaných kontrolním GFP dsRNA a symbolem „minus“ tkáně z jedinců injikovaných s CBP dsRNA. Aktin byl použit jako vnitřní kontrola.

4.1.2.2. Ověření exprese CBP po RNAi metodou Western blot

Metodou Western blot jsem se dále pokoušel potvrdit výsledek z předchozího pokusu s RT-PCR, který naznačoval poměrně úspěšné utlumení sledovaného CBP působením RNAi. Výsledek Western blotu je na následujícím obrázku číslo 10. Po provedení pokusu byl detekován band CBP odpovídající velikosti (cca 14,3 kD) jen ve vzorku získaného ze slinných žláz samic injikovaných s kontrolní GFP dsRNA. Toto zjištění naznačuje, že pravděpodobně vlivem RNAi došlo ke značnému utlumení exprese CBP ve slinných žlázách samic pět dní nasátých injikovaných s CBP dsRNA, neboť zde nebyl band po vyhodnocení western blotu detekován.

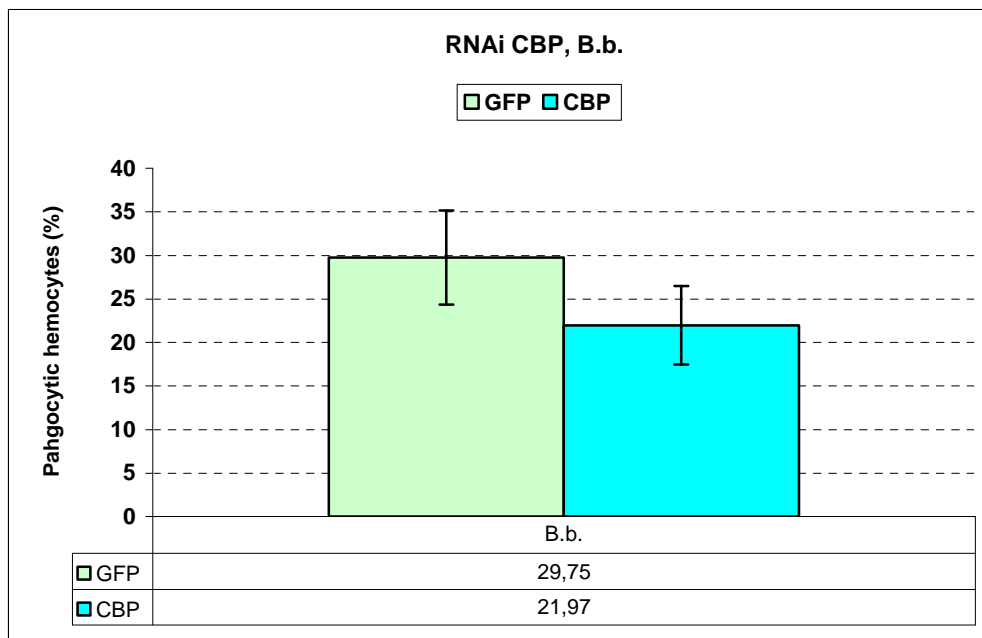


Obr. 10: Stanovení exprese CBP v homogenátech ze slinných žláz po RNAi metodou Western blot u samic *I. ricinus* 5 dní nasátých (M – marker molekulových hmotností LMW; 1,2 – proteinový profil; 3, 4 – Western blot s RaX CBP protilátkou; 1, 3 – GFP KD; 2, 4 – CBP KD).

Zjištěné výsledky z RT-PCR na úrovni RNA a z Western blotu na proteinové úrovni ukazují, že RNA interference působí jako účinný nástroj k potlačení exprese daného sledovaného proteinu. Utlumení chitin vázajícího proteinu (CBP) pomocí dsRNA bylo zřetelné ve slinných žlázách testovaných samic klíštěte *I. ricinus*. K tomuto tvrzení přispívá i skutečnost, že během sání na morčatech byla zaznamenána vyšší úmrtnost u jedinců injikovaných s CBP dsRNA ve srovnání s jedinci injikovanými s kontrolní GFP dsRNA (Tab. 1).

Klíšťata s CBP KD byla zahrnuta i do experimentu testujícího schopnost klíštěcích hemocytů fagocytovat spirochetu *B. burgdorferi* (Burešová, nepublikováno). Během tohoto pokusu bylo testováno asi 15 RNAi molekul zahrnujících například thioesterové proteiny, lektiny ixoderinového typu, chitinázu, ferritin 2 a také CBP. Utlumení CBP pomocí RNAi jako

jediné významně snížilo schopnost klíštěcích hemocytů fagocytovat *B. burgdorferi* (konkrétně z 29,75% na 21,97%) ve skupině klíšťat injikovaných s CBP dsRNA v porovnání s kontrolní skupinou injikovanou s kontrolní GFP dsRNA (Obr. 11).



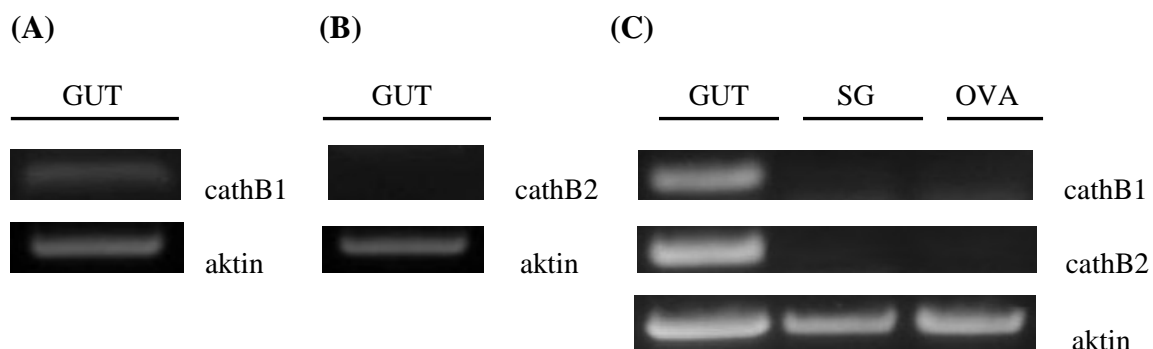
Obr. 11: Vliv CBP KD na schopnost klíštěcích hemocytů fagocytovat spirochetu *B. burgdorferi* (Burešová, nepublikováno)

4.2. Utlumení exprese cathepsinu B1 a cathepsinu B2 metodou RNAi

Dalším cílem mé práce bylo pokusit se o potlačení exprese dvou forem střevní trávicí proteázy cathepsinu B. Konkrétně se jednalo o cathepsin B1 (cathB1) popsáný v práci Sojky a kol. (2008) a další dosud nepublikovanou isoformu cathepsin B2 (cathB2).

Nukleotidová a odvozená aminokyselinová sekvence cathB1 je zobrazena v příloze č. 3. Délka cDNA sekvence cathB1 (GenBank: EF428206) činí 1073 bazí. Teoretická molekulová hmotnost maturovaného proteinu byla vypočítána na 35725 Da a hodnota izoelektrického bodu (pI) na 5,76. V případě cathB2 je nukleotidová a aminokyselinová sekvence zobrazena v příloze č. 4. Délka cDNA sekvence cathB2 je 1072 bazí. Teoretická molekulová hmotnost proteinu byla stanovena na 37772 Da a hodnota izoelektrického bodu (pI) na 6,27. Alignment nukleotidových sekvencí obou zmíněných isoform cathepsinu B provedený v programu BioEdit je zobrazen v příloze č. 2.

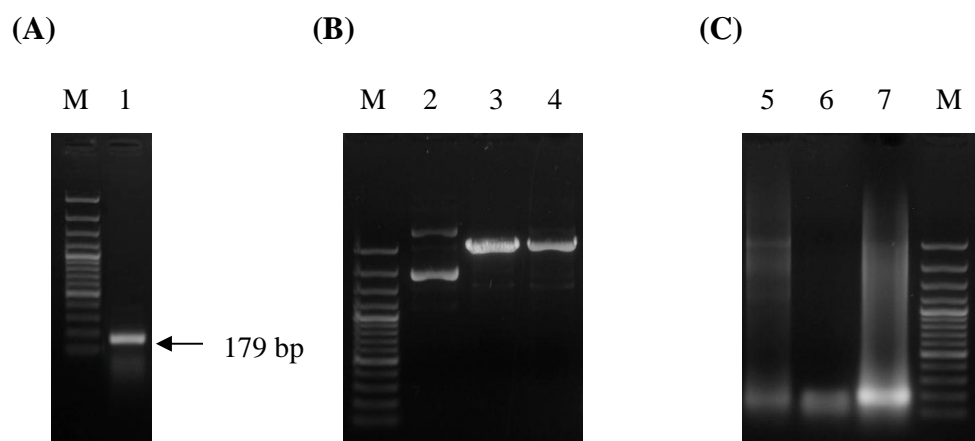
Předběžné výsledky naznačovaly, že exprese cathB2 je výrazně tzv. „upregulována“ v rané fázi sání klíštěte, což by znamenalo, že intenzita exprese cathB2 ve střevní tkáni nenasátých samic bude nižší ve srovnání s cathB1. Tuto hypotézu potvrdila RT-PCR, ke které byla použita cDNA ze střeva nenasátých samic *I. ricinus* (Obr. 12A,B). Tkáňový profil ze střeva, slinných žláz a ovarí vypitvaných ze středně nasátých samic potvrdil lokalizaci obou forem cathepsinu B výhradně ve střevní tkáni *I. ricinus* (Obr. 12C).



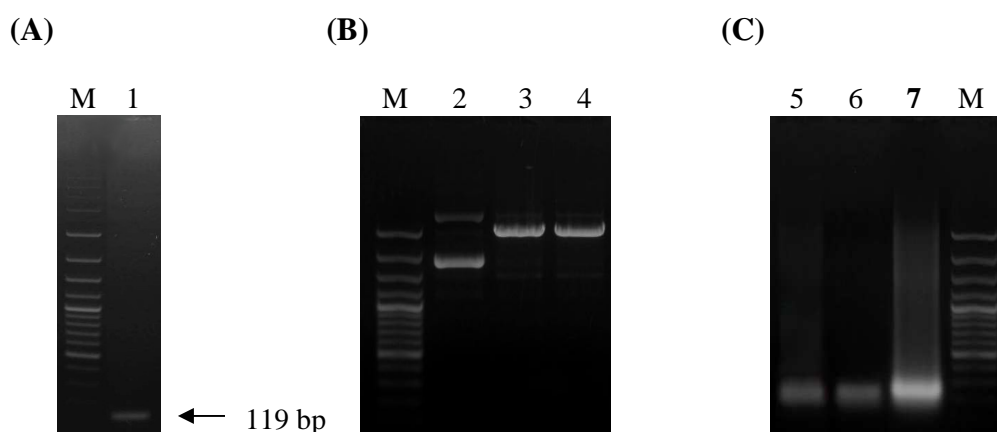
Obr. 12: Panel A – Exprese cathB1 ve střevě nenasátých samic *I. ricinus*. **Panel B** – Exprese cathB2 ve střevě nenasátých samic *I. ricinus*. Nižší intenzita exprese cathB2 u nenasátých jedinců značila upregulaci isoformy cathB2 až po sání klíštěte. **Panel C** - Tkáňová lokalizace exprese cathB1 a cathB2 pomocí RT-PCR u středně nasátých samic klíštěte *I. ricinus*. Potvrdila se lokalizace obou isoform výhradně ve střevě *I. ricinus*. Aktin byl použit jako vnitřní kontrola.

4.2.1. Syntéza cathB1 a cathB2 dsRNA

Proces vedoucí k vytvoření dsRNA pro cathepsin B1 a B2 začal obdobně jako v případě CBP amplifikací cDNA ze střevní tkáně samic pět dnů nasátých pomocí navržených primerů pro cathB1 i cathB2 (Tab. 1), pomocí níž byl získán PCR produkt cathB1 o velikosti 179 bazí a PCR produkt cathB2 o velikosti 119 bazí. Dále pokračoval proces přípravy dsRNA podle RNAi protokolu a finálním krokem byla hybridizace dsRNA pro obě isoformy cathepsinu B (Obr. 13 a Obr. 14).



Obr. 13: Příprava cathB1 dsRNA. Panel A – PCR amplifikace (M - marker, 1 – PCR produkt). **Panel B** - Klonování do plazmidu p110 a restrikce pomocí enzymů Apa I, Xba I (M – marker, 2 – pl 10, 3 – Apa I, 4 – Xba I). **Panel C** – Hybridizace dsRNA (5 – sense RNA, 6 – antisense RNA, 7 – dsRNA, M - marker).



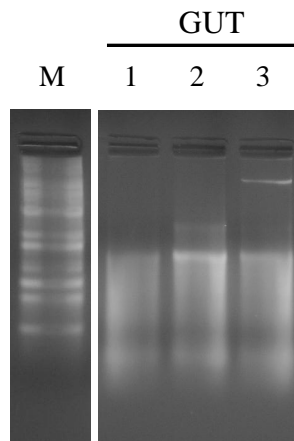
Obr. 14: Příprava cathB2 dsRNA. Panel A – PCR amplifikace (M - marker, 1 – PCR produkt). **Panel B** - Klonování do plazmidu p110 a restrikce pomocí enzymů Apa I, Xba I (M – marker, 2 – pl 10, 3 – Apa I, 4 – Xba I). **Panel C** – Hybridizace dsRNA (5 – sense RNA, 6 – antisense RNA, 7 – dsRNA, M - marker).

4.2.2. Injikace dsRNA pro cathepsin B1 a cathepsin B2 a následné sání samic po dobu 5 dnů

Do nasbíraných samic klíštěte *I. ricinus* byla pomocí mikrokapiláry injikována připravená cathB1 dsRNA nebo cathB2 dsRNA. Do další skupiny samic byla injikována kontrolní GFP dsRNA. Počty samic, které byly použity k injikaci a následnému sání na morčatech po dobu 5 dnů, jsou zobrazeny v tabulce č. 3.

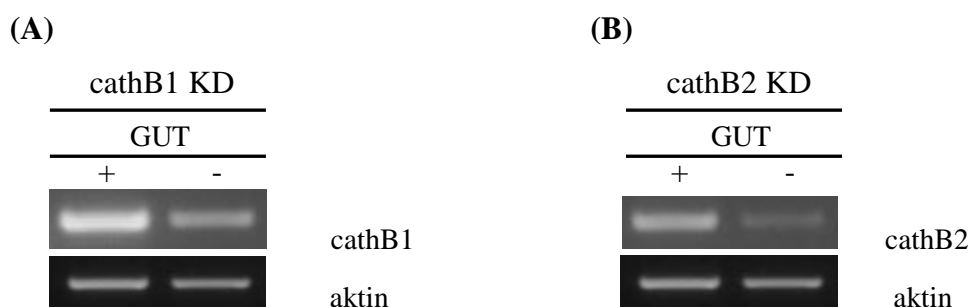
4.2.2.1. Ověření účinnosti RNAi na expresi cathB a cathB2 pomocí RT-PCR ve střevě samic 5 dnů nasátých

Dalším krokem bylo vypitvání střevní tkáně z přeživších samic, které sály na morčatech po dobu pěti dnů a izolace střevní RNA (Obr. 15).



Obr. 15: Kvalita vyizolované RNA ze střevní tkáně samic *I. ricinus* byla potvrzena elektroforézou (M – marker, 1 – GFP KD, 2 – cathB1 KD, 3 – cathB2 KD)

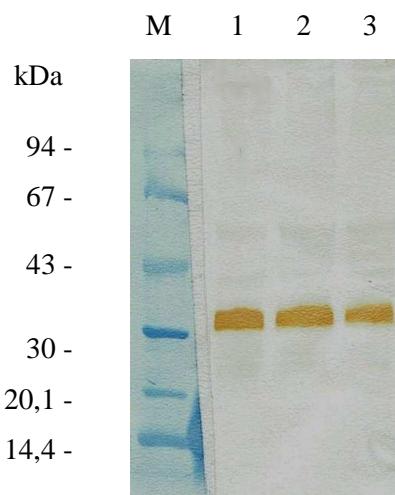
Po izolaci totální RNA byla dle protokolu nasyntetizována cDNA, která byla poté použita k ověření exprese cathB1 a cathB2 pomocí RT-PCR (Obr. 16). Získané výsledky naznačovaly určité snížení v intenzitě exprese cathB1 i cathB2 ve střevní tkáni u samic injikovaných s dsRNA oproti expresi ve tkáních z kontrolní skupiny samic injikovaných s GFP.



Obr. 16: Expresa cathB1 KD a cathB2 KD pomocí RT-PCR ve střevě *I. ricinus* samic 5 dnů nasátých. Panel A – Expresa cathB1 ze střeva samic injikovaných s cathB1 dsRNA. Panel B - Expresa cathB2 ze střeva samic injikovaných s cathB2 dsRNA. Aktin byl použit jako vnitřní kontrola.

4.2.2.2. Ověření exprese cathB1 a cathB2 po RNAi metodou Western blot ve střevě samic 5 dnů nasátých

Následovala detekce exprese na proteinové úrovni metodou Western blot, která ukázala malé utlumení exprese jen v případě cathB2 KD (Obr. 17).



Obr. 17: Stanovení exprese cathB1 a cathB2 ve střevních homogenátech po RNAi metodou Western blot u samic *I. ricinus* 5 dnů nasátých (M – marker molekulových hmotností LMW; 1-3 Western blot s RaX cathB1 protilátkou; 1 – GFP KD, 2 - cathB1 KD, 3 - cathB2 KD).

4.2.3. Injikace dsRNA pro cathepsin B1 a cathepsin B2 a následné sání samic po dobu 3 dnů, 6 dnů a do plného nasátí (FF)

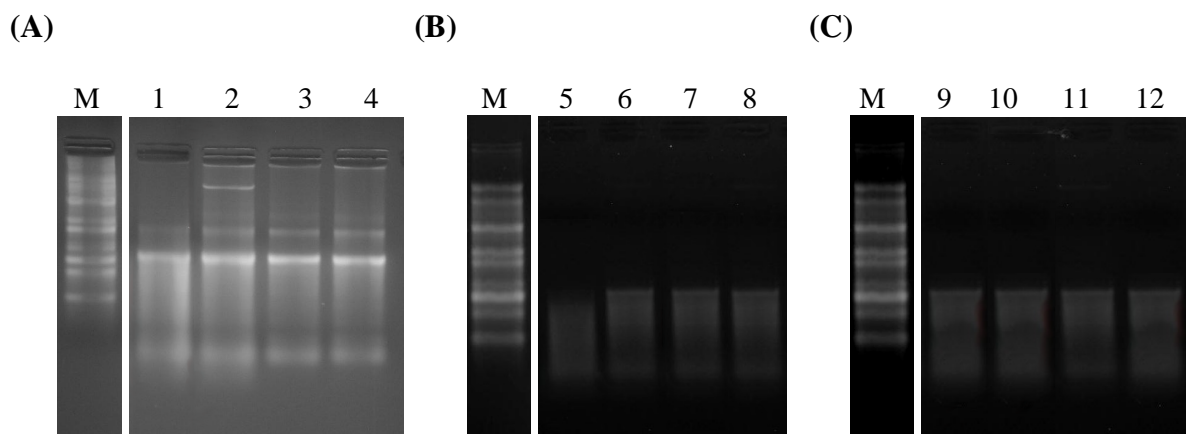
Ve druhém pokusu, ve kterém byla opět použita metoda RNAi na potlačení dvou isoformů proteázy cathepsinu B u samic klíštěte *I. ricinus*, byly opět samice injikovány mikrokapilárou s připravenou dsRNA. Tentokrát ale byla klíšťata rozdělena do 4 skupin. Do první skupiny byla injikována kontrolní GFP dsRNA, do druhé cathB1 dsRNA, do třetí cathB2 dsRNA a do čtvrté současně cathB1 i cathB2 dsRNA (B1+B2). Jednotlivé skupiny samic jsou rozepsány v tabulce 3. Vliv RNAi na potlačení exprese sledovaných proteinů byl stanoven vypitváním střevní tkáně po 3 dnech sání, po 6 dnech sání a po úplném nasátí (FF) samic na morčatech.

Tab. 3: Shrnutí výsledků RNAi experimentu po aplikaci dsRNA pro cathepsin B1 a cathepsin B2 mikroinjikací do samic *I. ricinus*

		sání 5 dnů	sání 3 dny	sání 6 dnů	plně nasáté
GFP kontrola	Počet před sáním	18	15	15	15
	Počet po sání	15	13	12	12
	Průměrná váha po sání (mg)	26,6	25,1	27,5	30,5
cathB1 dsRNA	Počet před sáním	18	15	15	15
	Počet po sání	11	12	9	7
	Průměrná váha po sání (mg)	23,4	22,1	25,5	26,8
cathB2 dsRNA	Počet před sáním	18	15	15	15
	Počet po sání	12	12	8	6
	Průměrná váha po sání (mg)	24,7	14,9	28,9	26,2
cathB1+B2 dsRNA	Počet před sáním	-----	15	15	15
	Počet po sání	-----	10	7	7
	Průměrná váha po sání (mg)	-----	19,8	26,5	22,9

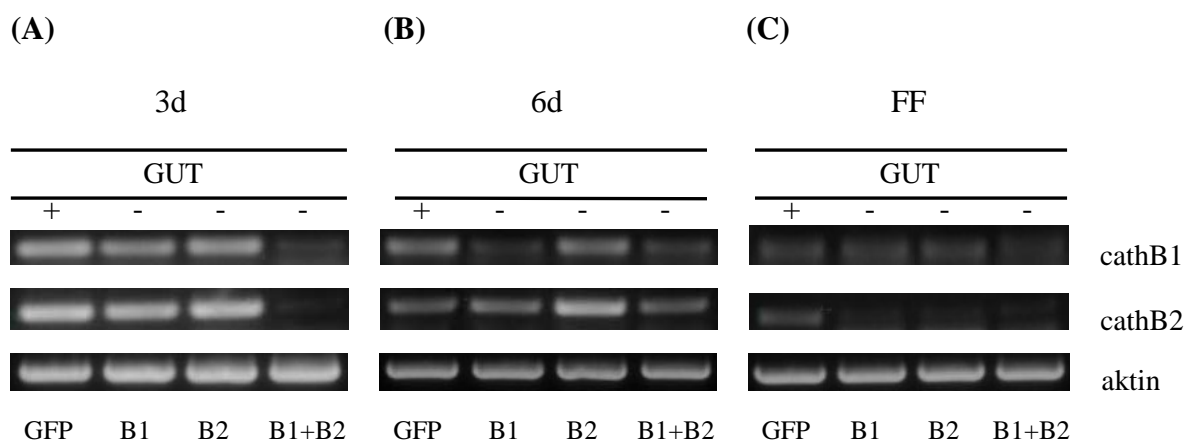
4.2.3.1. Ověření účinnosti RNAi pro cathB1 a cathB2 pomocí RT-PCR ve střevě samic 3 dny, 6 dnů a plně nasátých (FF)

Opět byla stejným způsobem jako v předchozích pokusech nejprve izolována totální RNA z nasátých samic (Obr. 18) a poté připravena cDNA reverzní transkripcí.



Obr. 18: Kontrola kvality izolované RNA ze střevní tkáně samic *I. ricinus*. Panel A – RNA ze samic 3 dny nasátých (M – marker, 1 – GFP KD, 2 – cathB1 KD, 3 – cathB2 KD, 4 – cathB1+B2 KD). Panel B – RNA ze samic 6 dnů nasátých (M – marker, 5 – GFP KD, 6 – cathB1 KD, 7 – cathB2 KD, 8 – cathB1+B2 KD). Panel C – RNA ze samic plně nasátých (M – marker, 9 – GFP KD, 10 – cathB1 KD, 11 – cathB2 KD, 12 – cathB1+B2 KD).

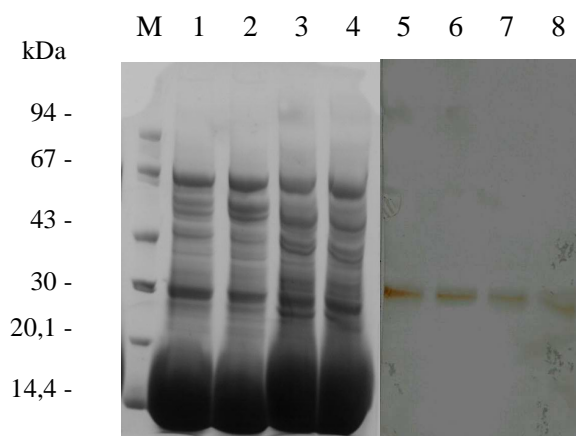
S nasynthetizovanou cDNA byla provedena PCR amplifikace cDNA (RT-PCR) pro všechny stupně nasátých samic (Obr. 19). Po vyhodnocení výsledků bylo zřejmé, že injekce obou isoformů cathB1 a cathB2 (cathB1+B2 KD) společně do první skupiny samic, které sály po dobu 3 dnů, způsobila znatelné utlumení exprese. To znamenalo, že metoda RNAi pravděpodobně částečně zafungovala u samic v raných fázích nasátí po společném injikování dsRNA pro cathB1 a cathB2. Výsledek RT-PCR u klíšťat nasátých 6 dnů ukázal jen nepatrně sníženou expresi cathB1 a u plně nasátých jedinců bylo nejvíce patrné potlačení exprese cathB2. Nejprokazatelnější pokles exprese byl tedy pozorován ve vzorcích izolovaných ze střev samic v raných fázích sání (3 dny) při dvojitém KD po mikroinjikaci cathB1+B2, čemuž odpovídala i nejvyšší úmrtnost samic a znatelný pokles váhy nasátých jedinců oproti skupině nasáté kontrolním GFP dsRNA (Tab č. 3).



Obr. 19: Expresse cathB1 a cathB2 po cathB1 KD, cathB2 KD a cathB1+B2 KD pomocí RT-PCR ve střevě samic *I. ricinus*. Panel A – Expresse u samic 3 dny nasátých (3d). Panel B – Výsledek RNAi u samic 6 dnů nasátých (6d). Panel C – Expresse u samic plně nasátých (FF). GFP - RNAi kontrola. Aktin byl použit jako vnitřní kontrola.

4.2.3.2. Zjištění exprese cathB1 a cathB2 na proteinové úrovni po aplikaci RNAi metodou Western blot ve střevě samic 6 dnů a plně nasátých (FF)

K dalšímu ujasnění představy o působení RNAi byla provedena metoda Western blot pro skupinu samic nasátých 6 dnů a plně nasátých (FF) injikovaných s GFP dsRNA a společně s cathB1+B2 (Obr. 20). Analýza pro stádia nasátá jen 3 dny nebyla provedena, neboť úroveň exprese cathepsinu B ve střevě klíštěte v časném stádiu sání byla na hranici detekovatelnosti (Franta, nepublikováno). Po vyhodnocení analýzy metodou Western blot byl efekt potlačení exprese u cathB1+B2 u obou stádií jen nepatrně znatelný zhruba jako v případě provedené RT-PCR. Vliv na nedostatečné utlumení exprese pomocí RNAi mělo s vysokou pravděpodobností i mnohonásobné zvýšené aktivity cathB1 a cathB2 ve střevě klíštěte během pozdního stádia sání (Franta, nepublikováno).



Obr. 20: Stanovení exprese cathB1 a cathB2 ve střevních homogenátech po RNAi metodou Western blot u samic *I. ricinus* 6 dní nasátých a plně nasátých (M – marker molekulových hmotností LMW; 1-4 proteinový profil; 5-8 Western blot RaX cathB1 protilátkou; 1, 5 – GFP KD 6d; 2, 6 – B1+B2 KD 6d; 3, 7 – GFP KD FF; 4, 8 – B1+B2 KD FF).

4.2.4. Aplikace cathB1 dsRNA společně s cathB2 dsRNA kapilárním sáním a následné sání samic po dobu 4 a 6 dnů

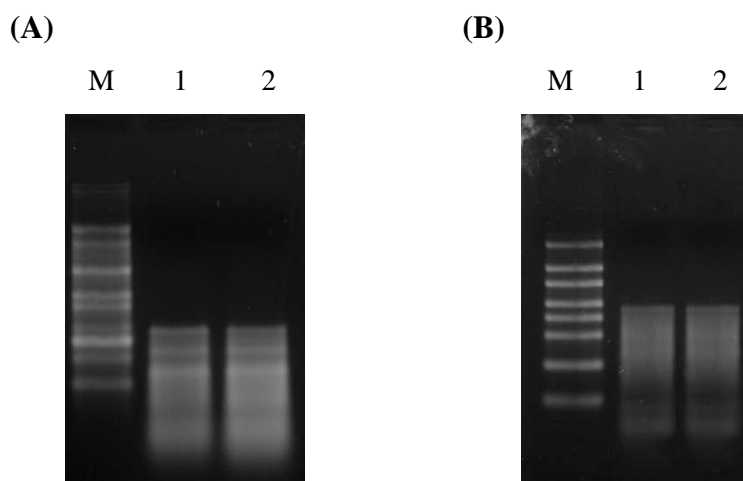
V tomto pokusu byla aplikována metoda kapilárního sání jako další možnost doručení hybridizované dsRNA (Soares a kol., 2005) do samic *I. ricinus*. Tato metoda aplikace dsRNA představovala v této diplomové práci alternativu k metodě injikace dsRNA, která byla využita v předchozích pokusech k utlumení exprese CBP, cathB1 a cathB2. S ohledem na vcelku příznivé výsledky RNAi zjištěné v předchozím pokusu u samic nasátých 3 dny po injikaci cathB1 dsRNA společně s cathB2 dsRNA (B1+B2), byla následně metodou kapilárního sání aplikována do skupiny testovaných jedinců *I. ricinus* pouze směs cathB1+B2. Do druhé skupiny samic byla opět vpravena kontrolní GFP dsRNA. Pomocí kapilárního sání následně proběhly dva pokusy, které se lišily v délce časového úseku, ve kterém samice *I. ricinus* po kapilárním nasátí dsRNA sály na laboratorních morčatech. V prvním pokusu sály samice po dobu 4 dnů. Tento časový interval byl zvolen s ohledem na předchozí pokus, ve kterém byl zaznamenán částečný KD v raných fázích sání. Ve druhém pokusu se samice nechaly dosát delší dobu, konkrétně 6 dní na morčatech. Data o počtu nasátých klíšťat jsou v tabulce č. 4.

Tab. 4: Shrnutí výsledků RNAi experimentu po aplikaci dsRNA pro cathepsin B1 a cathepsin B2 kapilárním sáním do samic *I. ricinus*

	GFP kontrola			cathB1+B2 dsRNA		
	Počet před sáním	Počet po sání	Průměrná váha po sání (mg)	Počet před sáním	Počet po sání	Průměrná váha po sání (mg)
sání 4 dny	16	13	26,4	16	8	21,9
sání 6 dnů	19	17	27,1	19	9	26,3

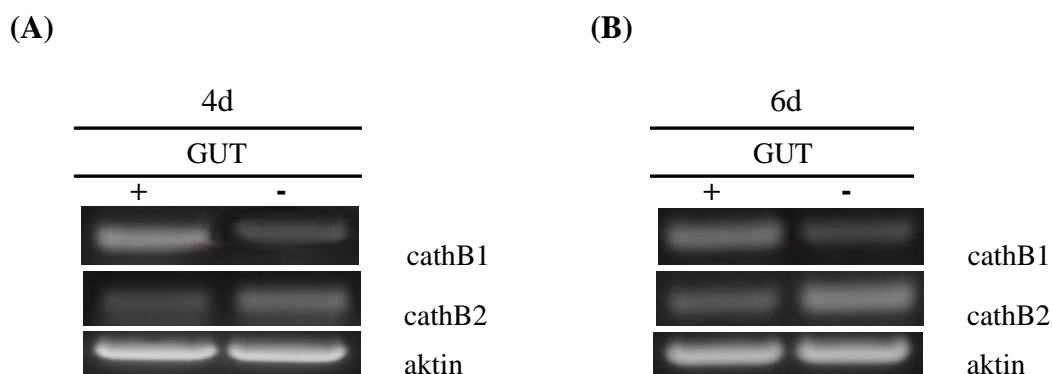
4.2.4.1. Ověření účinnosti RNAi na expresi cathB1 a cathB2 pomocí RT-PCR

Ke zjištění možného utlumení exprese sledovaných trávicích proteáz ve střevě klíšťat pomocí kapilárně aplikované dsRNA bylo potřebné z nasátých přeživších samic nejprve opět izolovat totální RNA (Obr. 21).



Obr. 21: Kontrola kvality izolované RNA ze střevní tkáně samic *I. ricinus* kapilárně nasátých s cathB1+B2 dsRNA. Panel A - RNA ze samic nasátých 4 dny (M – marker, 1 – GFP KD, 2 – cathB1+B2 KD). Panel B - RNA ze samic nasátých 6 dnů (M – marker, 1 – GFP KD, 2 – cathB1+B2 KD).

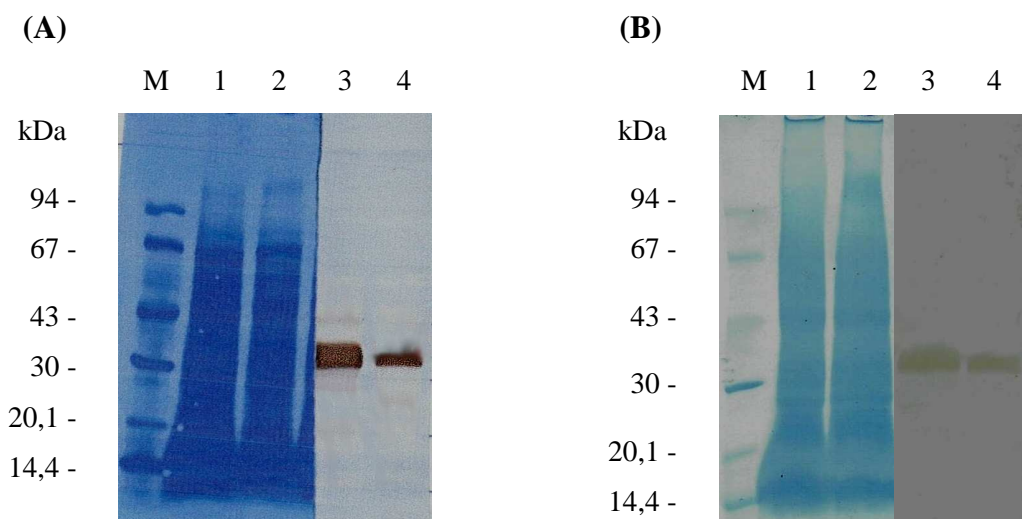
Získaná RNA byla zpětnou transkripcí dle protokolu přepsána na cDNA, pomocí níž následovala PCR amplifikace cDNA (Obr. 22) k ověření účinnosti RNAi. Analýza získaných výsledků naznačila pravděpodobné částečné utlumení exprese cathB1 ve vzorcích získaných ze střevní tkáně samic nasátých 4 dny i 6 dnů.



Obr. 22: Stanovení exprese cathB1 a cathB2 ve střevě samic *I. ricinus* pomocí RT-PCR po aplikaci cathB1+B2 dsRNA kapilárním sáním. Panel A – Výsledek RNAi u samic nasátých 4 dny (4d). Panel B - Výsledek RNAi u samic nasátých 6 dnů (6d). Aktin byl použit jako vnitřní kontrola.

4.2.4.2. Ověření exprese cathB1 a cathB2 po RNAi metodou Western blot

Výsledek Western blotu naznačoval, že pravděpodobně došlo opět k utlumení jen jedné formy cathepsinu B u samic nasátých 4 dny na morčeti (Obr. 23, Panel A). Viditelný byl totiž zřejmě pouze jeden band po reakci s králičí protilátkou proti cathepsinu B1 ve vzorku získaného ze střevní tkáně samic kapilárně nasátých s cathB1+B2. V případě analyzované střevní tkáně ze samic nasátých s kontrolním GFP dsRNA byl po vizualizaci membrány pozorován dvojitý band naznačující s velkou pravděpodobností přítomnost obou forem cathepsinu B. Po kapilárním nasátí cathB1+B2 dsRNA došlo i ke značné úmrtnosti samic (8 z 16) po dokončeném sání na morčeti a zaznamenána byla i nižší průměrná hmotnost nasátých samic s ohledem k průměrné váze kontrolních jedinců (Tab. 4). Tyto poznatky nasvědčují tomu, že vliv RNAi byl relativně značný, když pravděpodobně dokázal napomoci k úhynu značného množství testovaných samic. Vizualizace výsledku ze střevní tkáně samic 6 dnů nasátých metodou Western blot (Obr. 23, Panel B) nenaznačovala potlačení exprese cathepsinu B v takové míře jako u samic kapilárně nasátých po dobu 4 dnů, ale jistý pokles exprese lze zpozorovat.



Obr. 23: Stanovení exprese cathB1 a cathB2 ve střevních homogenátech samic *I. ricinus* metodou Western blot po aplikaci cathB1+B2 dsRNA kapilárním sáním. Panel A, B (M – marker molekulových hmotností LMW; 1,2 – proteinový profil; 3-4 Western blot RaX cathB1 protilátkou). Panel A – Exprese u samic 4 dny nasátých (1,3 – GFP KD; 2, 4 – B1+B2 KD). Panel B – Exprese u samic 6 dnů nasátých (1,3 – GFP KD; 2, 4 – B1+B2 KD).

5. Diskuze

Již několik let je metoda RNAi důležitým nástrojem v oblastech výzkumu mnoha vědeckých týmů při zkoumání funkcí genů, metabolických drah a při vývoji nových druhů léčiv a vakcín. Molekuly siRNA byly doposud využívány mimo jiné například v medicíně zejména při vyhledávání nových nástrojů pro léčbu různých virových infekcí, chorob imunitního systému, kancerogeneze, neurodegenerativních a metabolických onemocnění (Lochmanová a Bartoš, 2008). Od znalosti metody RNAi si medicína do budoucna slibuje významné pokroky v léčení dosud neléčitelných onemocnění na molekulární bázi. Jednalo by se tedy o obdobu genové terapie, při které by však nehrozila trvalá změna DNA pacienta, ale utlumil by se pouze projev cílového genu. Teoreticky by metoda RNAi mohla být v budoucnu využita při léčbě různých závažných chorob způsobených nadměrnou expresí určitého proteinu (Lieberman a kol., 2003). Metoda RNAi se tedy ukazuje být v několika posledních letech účinným nástrojem k utlumení exprese sledovaných genů a určování jejich funkcí v modelových organismech.

Pomocí RNAi se již řada autorů pokoušela o detailní charakterizace a popsání funkcí různých proteinů také u klíšťat (Hajdušek a kol., 2009; Aljamali a kol., 2003; Karim a kol., 2005; Pal a kol., 2004; Miyoshi a kol., 2007; Decrem a kol., 2008; aj.). Co se týká konkrétní aplikace RNAi v klíštěcí problematice, tak zde se jako velmi perspektivní využití již nyní ukazuje zejména možnost aplikace RNAi jako účinného nástroje v budoucím vývoji vakcín proti klíšťatům (Hajdušek a kol., 2009).

V průběhu mé diplomové práce jsem použil dvě možnosti aplikace dsRNA do klíštěcího organismu k vyvolání efektu RNAi. Metoda injikace dsRNA se ukázala být o něco méně efektivní než aplikace dsRNA kapilárním sáním v případě experimentů s cathepsinem B2. V případě injikování dsRNA pro chitin vázající protein (CBP) se ale ukázala injikace jako velice účinná a fungující při utlumení exprese CBP ve slinných žlázách testovaných samic *I. ricinus*. Injikace dsRNA byla také využita k již zmíněnému utlumení CBP, které mělo za následek významné snížení schopnosti klíštěcích hemocytů fagocytovat *B. burgdorferi* (Burešová, nepublikováno; Obr. 11). Úspěšné využití funkce RNAi ve slinných žlázách po injikování dsRNA byla popsána i v několika publikacích (Ramakrishnan a kol., 2005; Karim a kol., 2005; aj.).

Určitá omezení lze zaznamenat při využití RNAi ve střevní tkáni klíšťat, kde se jeví tento mechanismus o něco méně účinný než v ostatních tkáních. V klíštěcím střevě se zdá být

v některých případech poněkud problematické využití RNAi, protože pravděpodobně dochází k výraznému opětovnému obnovení transkripční hladiny cíleně utlumeného proteinu. Dalším možným vysvětlením nižší účinnosti RNAi v této klíštěcí tkáni může být nedostatečná schopnost distribuce dsRNA do střeva metodou injekce dsRNA mikrokapilárou do hemolymfy. Tomu nasvědčují i závěry vyvozené po provedení experimentů mé diplomové práci, kde jsem se pokoušel o utlumení exprese střevních trávicích proteáz cathepsinu B1 a cathepsinu B2. Z provedených pokusů lze vyvodit závěry, které naznačují, že během sání klíštěte je účinek RNAi ve střevě klíštěte v jisté míře eliminován výrazným zvýšením exprese sledovaných proteinů. V průběhu provedených pokusů u dvou isoform cathepsinu B se toto významné zvýšení aktivity odehrávalo pravděpodobně mezi ranou (3-4 dny) a pozdní fází sání (6 dnů) na morčatech. Tato hypotéza odpovídá i dalším výsledkům zjištěných při snaze popsat expresi cathepsinu B během různých period sání u *I. ricinus* (Franta, nepublikováno). Obdobné potíže s kompletním potlačením exprese sledovaných střevních proteinů na rozdíl od slinných žláz zaznamenal i Karim a kol. (2005) u klíštěte *A. americanum*, neboť během několika dnů po začátku sání došlo navzdory působení RNAi k dosyntetizování potlačených střevních proteinů na normální hladinu. Vzhledem k vysokému nárůstu aktivity střevních proteáz zhruba kolem pátého až šestého dne příjmu hostitelské krve ve srovnání s jejich aktivitou v raných fázích sání pravděpodobně dochází k jistému omezení funkce RNAi na utlumení exprese těchto cílených střevních proteinů. Míra exprese jednotlivých proteáz totiž strmě stoupá především v pozdějších fázích sání a proto efekt RNAi zřejmě ztrácí na své účinnosti. S tímto jevem jsem se s největší pravděpodobností setkal během studia účinku RNAi na utlumení exprese cathB1 a cathB2.

Je ale pravděpodobné, že aplikace RNAi byla nakonec v utlumení exprese cathB1 a cathB2 relativně úspěšná. A to z toho důvodu, že analyzované tkáně byly získány z přeživších jedinců, u nichž tedy zřejmě nedošlo vlivem RNAi k dostatečnému utlumení exprese sledovaných genů. Naopak úspěšné snížení projevu cathB1 a cathB2 bylo s velkou pravděpodobností hlavní příčinou úhynu samic již v průběhu rané fáze sání na morčatech.

Možné zlepšení funkce RNAi může v budoucnu přinést zvýšení dodaných dávek dsRNA do klíštěte nebo také delší časový interval mezi injekcemi dsRNA a následným sáním klíštěte (Hajdušek, Ph.D. thesis, 2009).

6. Závěr

Prvním úkolem mé diplomové práce bylo pokusit se pomocí RT-PCR úspěšně potvrdit lokalizaci chitin vázajícího proteinu (CBP) výhradně ve slinných žlázách izolovaných z nasátých samic klíštěte *I. ricinus*. Následně byla aplikována metoda RNAi procesem injekce CBP dsRNA do klíštěcí hemolymfy k potlačení exprese CBP ve slinných žlázách. Úspěšné utlumení projevu sledovaného genu bylo potvrzeno metodou RT-PCR, metodou Western blot a také značnou úmrtností samic injikovaných s CBP dsRNA ve srovnání s kontrolní skupinou injikovanou s GFP dsRNA během sání na morčatech. Poměrně významně byla snížena i průměrná hmotnost přeživších jedinců injikovaných CBP dsRNA oproti kontrolní skupině.

Druhým úkolem byla aplikace RNAi k vyvolání utlumení exprese dvou isoform střešní proteázy cathepsinu B - cathepsinu B1 a cathepsinu B2. Po potvrzení jejich lokalizace v klíštěcím střevě byla zjištěna nepatrně nižší hladina výskytu isoformy cathB2 ve střevě u nenasátých samic *I. ricinus*. Po následné injekci cathB1 a cathB2 dsRNA byla provedeno srovnání účinku RNAi na potlačení exprese v jednotlivých stupních nasátí. Pravděpodobně největšího utlumení bylo dosaženo ve skupině samic s aplikovaným dvojitým KD (cathB1+B2) a nasátých jen poměrně krátkou dobu na morčatech, konkrétně 3 dny. Proto se nabízela myšlenka pokusit se o utlumení exprese cathB1 a cathB2 v jiném časném stádiu sání klíšťat pomocí dvojitého KD a s použitím jiného způsobu aplikace dsRNA. Vybrán byl tedy časový úsek 4 dny (a 6 dní) sání na morčeti, kterému předcházela aplikace cathB1+B2 dsRNA kapilárním sáním. Výraznější pokles exprese byl pozorován opět v raném stádiu po 4 dnech sání po vyhodnocení metody Western blot. Zjištěn byl také pokles průměrné váhy nasátých klíšťat s ohledem na kontrolní skupinu s GFP dsRNA, což mohlo znamenat ovlivnění schopnosti sání na hostiteli metodou RNAi.

Dosažené výsledky po úspěšném utlumení exprese CBP ve slinných žlázách samic *I. ricinus* demonstrují významné schopnosti RNAi jako účinného nástroje k utlumení projevu cílového genu. Přesto je ještě nutné v budoucím výzkumu této perspektivní metody objasnit různé zjištěné nejasnosti a rozpory, s kterými jsem se potýkal v mé diplomové práci při aplikaci RNAi na snížení exprese střešních proteáz cathepsinu B1 a cathepsinu B2.

7. Literatura

- Agbede RI, Kemp DH (1985) Digestion in the cattle-tick *Boophilus microplus*: light microscope study of the gut cells in nymphs and females. *Int J Parasitol* 15: 147-157.
- Aljamali MN, Sauer JR, Esenberg RC (2002) RNA interference: applicability in tick research. *Exp Appl Acarol* 28: 89-96.
- Aljamali MN, Bior AD, Sauer JR, Esenberg RC (2003) RNA interference in ticks: a study using histamine binding protein dsRNA in the female tick *Amblyomma americanum*. *Insect Biochem Mol Biol* 12: 299-305.
- Allen JR (1973) Tick resistance: basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. *Int J Parasitol.* 3: 195-200.
- Balashov YS (1979) Atlas of the Electron Microscopic Anatomy of Ixodid Ticks. Nauka, Leningrad, 256 pp.
- Barrett AJ, Kirschke H (1981) Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol.* 80: 535-561.
- Barry MK, Triplett AA, Christensen AC (1999) A peritrophin-like protein expressed in the embryonic tracheae of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* 29: 319-327.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
- Boldbaatar D, Sikalizyo Sikasunge C, Battsetseg B, Xuan X, Fujisaki K (2006) Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 25-36.
- Broadwater AH, Sonenshine DE, Hynes WL, Ceraul S, de Silva AM (2002) Glass capillary tube feeding: A method for infecting nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *J Med Entomol* 39: 285-292.
- 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.
- Cerutti H (2003) RNA interference: travelling in the cell and gaining functions? *Trends Genet* 19: 39-46.
- Cerutti H, Casas-Molano JA (2006) On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet* 50: 81-99.
- Cogoni C, Macino G (2000) Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr Opin Genet Dev* 10: 638-643.

- Coons LB, Alberti G (1999) The acari-ticks. In *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, eds Harrison FW and Foelix R (Wiley-Liss, New York) pp 267-514.
- Decrem Y, Mariller M, Lahaye K, Blasioli V, Beaufays J, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Cérutti M, Brossard M, Vanhamme L, Godfroid E (2008) The impact of gene knock-down and vaccination against salivary metalloproteases on blood feeding and egg laying by *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol* 38: 549-560.
- de la Fuente J, Almazán C, Blouin EF, Naranjo V, Kocan KM (2005) RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitol Res* 96: 137-141.
- de la Fuente J, Almazán C, Blas-Machado U, Naranjo V, Mangold AJ, Blouin EF, Gortazar C, Kocan KM (2006) The tick protective antigen, 4D8, is a conserved protein involved in modulation of tick blood ingestion and reproduction. *Vaccine* 24: 4082-4095.
- Dvořák J, Delcroix M, Rossi A, Vopálenký V, Pospíšek M, Šedinová M, Mikeš L, Sajid M, Sali A, McKerrow JH, Horák P, Caffrey CR (2005) Multiple cathepsin B isoforms in schistosomula of *Trichobilharzia regenti*: Identification, characterisation and putative role in migration and nutrition. *Int J Parasitol* 35: 895-910.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21 – and 22 – nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15: 188-200.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas S, Driver S, Mello C (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Gern L, Zhu Z, Aeschlimann A (1990) Development of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* females during blood feeding. *Ann Parasitol Hum* 65: 89–93.
- Gordon JR, Allen JR (1991) Factor V and VII anticoagulant activities in the salivary glands of feeding *Dermacentor andersoni* ticks. *J Parasitol* 77: 167-170.
- Grandjean O, Aeschlimann A (1973) Observations on fecundity in *Ornithodoros moubata*, Murray (Ixodoidea: Argasidae). Relationships between mating and oviposition. *Acarologia* 15: 206-217.
- Grandjean O (1984) Blood digestion in *Ornithodoros moubata* Murray sensu stricto Walton (Ixodoidea: Argasidae) females. Biochemical changes in the midgut lumen and ultrastructure of the midgut cells, related to intracellular digestion. *Acarologia* 25: 147-165.
- Gray JS (1991) The development and seasonal activity of the tick *I. ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Rev Med Vet Entomol* 6: 324-333.
- Grigor'eva LA, Amosova LI (2004) Peritrophic matrix in the midgut of tick females of the genus *Ixodes* (Acari: Ixodidae). *Parazitologija* 38: 3-11.
- Hajdušek O, Sojka D, Kopacek P, Buresova V, Franta Z, Sauman I, Winzerling J, Grubhoffer L (2009) Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 1033-1038.

- Hajdušek O (2009) Functional analysis of metabolic and immune proteins in the tick *Ixodes ricinus* by RNA interference. *Ph.D thesis, University of South Bohemia*.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.
- Hannon GJ (2002) RNA interference. *Nature* 418: 244-251.
- Jongejan F, Uilenberg G (2004) The global importance of ticks. *Parasitology* 129: 3-14.
- Karim S, Miller NJ, Valenzuela J, Sauer JR, Mather TN (2005) RNAi-mediated gene silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood feeding. *Bioch Biophysical Research Commun* 334: 1336-1342.
- Kaufman WR (1989) Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. *Parasitol Today* 5: 47-56.
- Kocan KM, Manzano-Roman R, de la Fuente J (2007) Transovarial silencing of the subolesin gene in three-host ixodid tick species after injection of replete females with subolesin dsRNA. *Parasitol Res* 100: 1411-1415.
- Kocan KM, de la Fuente J, Manzano-Roman R, Naranjo V, Hynes WL, Sonenshine DE (2008) Silencing expression of the defensin, varisin, in male *Dermacentor variabilis* by RNA interference results in reduced *Anaplasma marginale* infections. *Exp Appl Acarol*. 46: 17-28.
- Kopecký J, Kuthejlová M, Pechová J (1999) Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon- γ by the upregulation of interleukin 10. *Parasite Immunology* 21: 351-356.
- Krupa JC, Hasnain S, Nägler DK, Ménard R, Mort JS (2002) S₂ substrate specificity and the role of His¹¹⁰ and His¹¹¹ in the exopeptidase activity of human cathepsin B. *Biochem J* 361: 613-619.
- Lara FA, Lins U, Paiva-Silva G, Almeida IC, Braga CM, Miguens FC, Oliceira PL, Petretski M (2003) A new intracellular pathway of hem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle the hemosome. *J Exp Biol* 206: 1707-1715.
- Lara FA, Lins U, Bechara GH, Oliveira PL (2005) Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J Exp Biol* 208: 3093-3101.
- Levashina EA, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC (2001) Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* 104: 709-718.

- Lieberman J, Song E, Lee SK, Shankar P (2003) Interfering with disease: opportunities and roadblocks to harnessing RNA interference. *Trends Mol Med* 9: 397-403.
- Lochmanová J, Bartoš M (2008) Interferující ribonukleové kyseliny a molekulární patofyziologie vybraných onemocnění. *Časopis lékařů českých* 147: 607-615.
- Martoja R, Ballan-Dufrançais C (1984) The ultrastructure of the digestive and excretory organs. *Bull Soc Zool Fr* 199-268.
- Mendiola J, Alonso M, Marquetti MC, Finlay C (1996) Boophilus microplus: multiple proteolytic activities in the midgut. *Exp Parasitol* 82: 27-33.
- Miyoshi T, Tsuji N, Islam MK, Kamio T, Fujisaki K (2004) Cloning and molecular characterization of a cubilin-related serine proteinase from the hard tick Haemaphysalis longicornis. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 799-808.
- Miyoshi T, Tsuji N, Islam MK, Huang X, Motobu M, Alim MA, Fujisaki K (2007) Molecular and reverse genetic characterization of serine proteinase-induced hemolysis in the midgut of the ixodid tick Haemaphysalis longicornis. *J Insect Physiol.* 53: 195-203.
- Munderloh UG, Kurtti TJ (1995) Cellular and molecular interrelationships between ticks and prokaryotic tick-borne pathogens. *Annual rev entomol* 40: 221-243.
- Nägler DK, Storer AC, Portaro FC, Carmona E, Juliano L, Ménard R (1997) Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. *Biochemistry* 36: 12608-15.
- Narasimhan S, Montgomery RR, DePonte K, Tschudi C, Marcantonio N, Anderson JF, Sauer JR, Cappello M, Kantor FS, Fikrig E (2004) Disruption of Ixodes scapularis anticoagulation by using RNA interference. *Proc Natl Acad Sci. USA* 101: 1141-1146.
- Nijhof AM, Taoufik A, de la Fuente J, Kocan KM, de Vries E, Jongejan F (2007) Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and subolesin, in the one-host tick Boophilus microplus by RNA interference. *Int J Parasitol* 37: 653-662.
- Nishikura K (2001) A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst. *Cell* 107: 415-418.
- Nutall PA (1999) Pathogen-tick-host interactions: Borrelia burgdorferi and TBE virus. *Zentral Bakteriol* 289: 492-505.
- Nykänen A, Haley B, Zamore PD (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107: 309-321.
- Pal U, Li X, Wang T, Montgomery RR, Ramamoorthi N, de Silva AM, Bao F, Yang X, Pypaert M, Pradhan D, Kantor FS, Telford S, Anderson JF, Fikrig E (2004) TROSPA, an Ixodes scapularis receptor for Borrelia burgdorferi. *Cell* 119: 457-468.
- Peters W (1992) Peritrophic Membranes. *Zoophysiology*, Vol. 30, Springer-Verlag, Berlin.

- Piesman J, Gage KL (1996) Ticks and mites and the agents they transmit. *In* The biology of disease vectors. Beaty BJ and Marquardt WC (eds.). University Press, Boulder, Colorado, pp 160–174.
- Ramakrishnan VG, Aljamali MN, Sauer JR, Essenberg RC (2005) Application of RNA interference in tick salivary gland research. *J Biomolecular Tech* 16: 297-305.
- Ribeiro JM, Makoul GT, Levine J, Robinson DR, Spielman A (1985) Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick *Ixodes dammini*. *J Exp Med* 161: 332-344.
- Rudzinska MA, Spielman A, Lewengrub S, Piesman J, Karakashian S (1982) Penetration of the peritrophic membrane of the tick by *Babesia microti*. *Cell Tissue Res* 221: 471-481.
- Sajid M, McKerrow JH, Hansell E, Mathieu MA, Lucas KD, *et al.* (2003) Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. *Mol Biochem Parasitol* 131: 65-75.
- Shao L, Devenport M, Jacobs-Lorena M (2001) The peritrophic matrix of hematophagous insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 47: 119-125.
- Singh S, Girschick HJ (2003) Tick-host interactions and their immunological implications in tick borne diseases. *Curr Sci* 85: 1284-1298.
- Soares CA, Lima CMR, Dolan MC, Piesman J, Beard CB, Zeidner NS (2005) Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the *isac* gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Mol Biol* 14: 443-452.
- Sojka D, Hajdusek O, Dvorak J, Sajid M, Franta Z, Schneider EL, Craik CS, Vancova M, Buresova V, Bogyo M, Sexton KB, McKerrow JH, Caffrey CR, Kopacek P (2007) IrAE: an asparaginyl endopeptidase (legumain) in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol* 37: 713-724.
- Sojka D, Franta Z, Horn M, Hajdusek O, Caffrey CR, Mares M, Kopacek P (2008) Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionary conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasitol Vectors* 1: 7.
- Sonenshine DE (1991) *Biology of ticks*. (Oxford University Press, New York).
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC (1999) The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99: 123-132.
- Tellam RL, Wijffels G, Willadsen P (1999) Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem Mol Biol*. 29: 87-101.
- Terra WR, Ferreira C (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol B* 109: 1-62.

- Tsuji N, Miyoshi T, Battsetseg B, Matsuo T, Xuan X, Fujisaki K (2008) A cysteine protease is critical for Babesia spp. transmission in Haemaphysalis ticks. *PLoS Pathog* 4(5): e1000062.
- Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN, Ribeiro JM (2000) Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick Ixodes scapularis. *J Biol Chem* 275: 18717-23.
- Vastenhouw NL, *et al.* (2006) Gene expression: long-term gene silencing by RNAi. *Nature* 442: 882.
- Wang P, Granados RR (2001) Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. *Arch Insect Biochem Physiol.* 47: 110-118.
- Wikel SK, Ramachandra RN, Bergman DK (1994) Tick-induced modulation of the host immune response. *Int J Parasitol* 24: 59-66.
- You M, Xuan X, Tsuji N, Kamio T, Taylor D, Suzuki N, Fujisaki K (2003) Identification and molecular characterization of a chitinase from the hard tick Haemophysalis longicornis. *J Biol Chem* 278: 8556-8563.
- Zamore PD (2001) RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol* 8: 746-750.
- Zhu Z, Gern L, Aeschlimann A (1991) The peritrophic membrane of Ixodes ricinus. *Parasitol Res.* 77: 635-641.

8. Přílohy:

ACACAAACGCAGCTGGATTCAATTCATTCGGCCGAGGAACTAACCAAGAAAGGAAACAAA
TGC AACTGACGGT GCAAGTGGCGGT CGCCCTCGTGGCTGCAGTGATGGTGGTCTGTCCTG
M Q L T V Q V A V A L V A A V M V V C P
TCAGCGCACAGCTGGTGGACTGCCCGCCGTGGAGGGCAAAGACGACAACGCGACGTTGT
V S A Q L V D C P A V E G K D D N A T L
TCTACAACCCGTACAACCTGCTCCACCTACTACGTGTGCGACCACGGTACACCGGTGCTGA
F Y N P Y N C S T Y Y V C D H G T P V L
TGCCCTGCCCGCTGGGCACCCACTTCAACGACGTGTGCGAAGATCTGCGACCATCCGGATG
M P C P L G T H F N D V S K I C D H P D
ACGCCAAC TGC TTCGAGCTCCAGC CGCCACCGAGGCGCCCGGACGGAAGCAGCGCCAG
D A N C F E L Q P P T E A P A T E A A P
AGGAGGACCAGCCGCTCACCGAGAAGATCATCATTACCAAGACGACGGAGGAGATCATCA
E E D Q P L T E K I I I T K T T E E I I
GGCCCGTTGACCCCGTGCCGGCAGTTGAACCCGTGCGG TGA AGCGAAGCGTCTTCGCGCA
R P V D P V P A V E P V A
GTTGCCGAAGTCCGTCTCAACGACGAACGATCACCGCCCTCCAGTCGCTGCTCCGGTCTC
ACGCCAGTCATTTACGCGCCACGATATAAATTATATCCCCGTGGATTGCCCGTTAGTA
AAAGGTCTCACTGTTGCTGGTATTGANATAAATAAA GTTGT T T GCGAAGCATT AAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Příloha 1: Kompletní nukleotidová a od ní odvozená aminokyselinová sekvence genu pro CBP.
Start a Stop kodon jsou zvýrazněny zeleně. Žlutou barvou je označena signální sekvence peptidu.
Modře jsou značeny PCR primery.

```

cathB1 1 ATGCTGAAAGTCCCTCCTGGTCTGTGGGCTTCTGGCCGCTGTTGCTTTGGACGTGAGATTTCCTAAAGATGGCAC
cathB2 1 ATGCTGAAATCACCTCCTGGTGTGTGGGATTTTGGGCGCTGTTGCTTTGGACGAGAGATTTCCTAAAGATGGCAC
cathB1 81 ACTCTCCGACCAATGATCAACTTCATCAACAAGATCAACACAACCTTGGAAAGGCAAGGAAGGAACTTCGACAAATCCATC
cathB2 81 GCTCTCCGACCAATGATCAACTTCATCAACAAGATCAACACAACCTTGGAAAGGCGGAAGGAACTTCGACAAATCCATC
cathB1 161 CCATGAGCTACATCAGGGGTCTGATGGGAGTGAACCCCAAGAGCAAGGAGTACCGCTCTGCAGAGTTTGTGCACGAAGA
cathB2 161 CCATGAGCTACATCAGGGGTCTGCTGGGAGTGAACCCCAAGAGCAAGGAGTACCGTCTGCAGAGTTTGTGCACGAAGA
cathB1 241 ATCCGAGACGACCTCCCTGAAAGCTTTCGATGCACGGGAGAAGTGGTCCCACTGCGCATCAATTAACCTTATCCGGCAC
cathB2 241 ATCCCTGACGACCTCCCGAAAGCTTTCGACGCACGGGAGAAGTGGTCCCACTGCGCATCGATTAACCTTATCCGGCAC
cathB1 321 GTCACCGTTCGGGTCTCTGCTGGGCCTTTTGGCCTCCGCGAAGGCGATGTCGGACCGTGTCTGCATTTCACAGGAAAGGAGGG
cathB2 321 GTYCCGGCGGGGTATCTGCTGGGCAATTTGGCCTCCGCGTGAAGGCGATACTCGGACCGAACTGCATTTCACAGGAAAGGCAA
cathB1 401 TCCAGGTAAACATCTCTGCCGAAGACCTCCTGGAGTGTGCGACTCTGCGGTGCAGGGCTGGACGGCGGATACCGGG
cathB2 401 TTCAGGTGAACATCTCGGCTGAAGACCTCCTGGAGTGTGCGCAATCTGCGGTGCAGGGCTGGACGGTGGAGACACCG
cathB1 481 GCAAGCTGGGAATACTGGAAGGAGAGCGGACTCTGTGAGTGAATGGCCTCTACGGCACCCCGACGGCTGCAAGCCTTACT
cathB2 481 GCGGTCTGGGAATACTGGAAGGAGAAACGGACTCTGTGAGCGGAAGCCTCTACGGCACCCCGACGGCTGCAAGCCTTACT
cathB1 561 CCTCGCTCCCTGCGAACACCACACCAAGGCTTCTCTGCTTAAGTCCACCGGAGCCGCTGCCACGCCCAAATGCGTGCAC
cathB2 561 TCTCGCTCCCTGCGAACACTGACCAAGAGCTTCTCTGCTTAAGTCCACCGGAGCCGCTGCCACGCCCAAATGCGTGCAC
cathB1 641 TCTGCAGGAAGGGCTACGGCAAGGACTACCAGCATGACAAGCACCTTCGGCAAGAGGGTGTATTCAATTTGAGCAACGA
cathB2 641 TCTGCAGGAAGGGCTACGGCAAGGACTACCAGCATGACAAGCACCTTCGGCAAGAGGGTGTATTCTATTCTAAGACGA
cathB1 721 AAGCAAATCCAGACCCGAGATCTTCAAGAACGGACCTGTGGAGGCTGACTTTACCGTTTACGGCGACTTCCTGAGCTACA
cathB2 721 AAGCAAATCCAGACCCGAGATCTTCAAGAACGGACCTGTGGAGGCTTCTCTTATTCTGTTTACGGCGACTTCCTGAGCTACA
cathB1 801 ATCTGGCGTGTACCAGCACACAGCGGTGACGTACTCGGAGGCCACGCTATTCCATCCTTGGATGGGGCACAGAGAAC
cathB2 801 ATCTGGCGTGTACCAGCATCACAGTGTGACTGGCTCGGAGTCCACGCTATTCCATCCTTGGATGGGGCACAGAGAA
cathB1 881 GCACCCCTTACTGGCTCGTGGCCAACCTCTGGAACGAAGATG6666CGACCACGGTTATTTCAAGATTCTTCGCGGGA
cathB2 881 GCACCCCTTACTGGCTAGTGGCCAACCTCTGGAACGAAGACTG6666CGACCACGGTTATTTCAAGATTCTTCGCGGGA
cathB1 961 GAGAGTGTGGAATTGAAGAAGACATTAACGCCGGATCCCCAAGGACGAATAG
cathB2 961 GATGAGTGTGGAATTGAAGAAGACATTAACGCCGGATCCCCAAGGACGAATAG

```

Príloha 2: Alignment ORF sekvenci isoform cathepsinu B – cathB1 a cathB2

ctcgggtgcctgcaaacagccactaacagac **atg** ctgaagtcctcctggtcgtgggcctt
M L K S L L V V G L
ctggccgctgtttgctttggacgtgagattcatcctaaaagatggcaccactctccgac
L A A V C F G R E I H P K R W H P L S D
caaatgatcaacttcatcaacaagatcaacacaacttgaaggcaggaaggaacttcgac
Q M I N F I N K I N T T W K A G R N F D
aatccatctccatgagctacatcaggggtctgatgggagtgaacccaagagcaaggag
K S I S M S Y I R G L M G V N P K S K E
taccgcctgccagagtttgtgcacgaagagatcccagacgacctcctgaaagcttcgat
Y R L P E F V H E E I P D D L P E S F D
gcacgggagaagtggtcccactgcgcatcaattaaccttat **ccgcgaccagtccacct**gc
A R E K W S H C A S I N L I R D Q S T C
ggttctctgctgggcctttggcgccgaggcgatgtcggaccgtgtctgcattcacagc
G S C W A F G A A E A M S D R V C I H S
gaaggagggatccaggtaaacatctctgccgaagacctcctggactgctgcgactcctgc
E G G I Q V N I S A E D L L D C C D S C
ggtgccggctgcgacggcgga **taccggcgaggcctggg**aatactggaaggagagcgga
G A G C D G G Y P A A A W E Y W K E S G
ctcgtgagtgatggcctctacggcaccctcgaggctgcaagccttactccctcgctccc
L V S D G L Y G T P D G C K P Y S L A P
tgcaacaccacaccaagggttctctgcctaactgcaccgggaccgtgccacgccc
C E H H T K G S L P N C T G T V P T P K
tgctgcacctctgcaggaagggctacggcaaggactaccagcatgacaagcacttcggc
C V H L C R K G Y G K D Y Q H D K H F G
aagaaggtgtattcaatttcgagcaacgagaagcaaatccagaccgagatcttcaagaac
K K V Y S I S S N E K Q I Q T E I F K N
ggacctgtggaggctgactttaccgtttacgccgacttctgagctacaaatctggcgtg
G P V E A D F T V Y A D F L S Y K S G V
taccagcaccacagcggtgacgtactcggaggccacgctattcgaatccttggatggggc
Y Q H H S G D V L G G H A I R I L G W G
acagagaacggcacccttactggctcgtggccaactcctggaacgaagattggggcgac
T E N G T P Y W L V A N S W N E D W G D
cacggttatttcaagattcttcgcgggaaggacgagtggtggaattgaagacgacattaac
H G Y F K I L R G K D E C G I E D D I N
gccgggatcccaaggacgaa **tag** ctttaataaattatttgtcaaaagcagttaaa
A G I P K D E

Příloha 3: Kompletní nukleotidová a od ní odvozená aminokyselinová sekvence genu pro cathepsin B1. Start a Stop kodon jsou zvýrazněny zeleně. Žlutě je označena signální sekvence peptidu. PCR primery jsou značeny modře. Tzv. „occluding loop“ zodpovědná za exopeptidázovou aktivitu je tučně zvýrazněna včetně dvou histidinů.

