

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
České Budějovice



**Expresse rekombinantního proteinu
Kunitzova typu, potenciálního toxinu ze slinných
žláz klíštěte *Ixodes ricinus***

Magisterská práce 2009

Bc. Tereza Cermanová

školitel: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

2009

Cermanová T., 2009: Expresse rekombinantního proteinu Kunitzova typu, potenciálního toxinu ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* [Expression of Kunitz-type recombinant protein, potential toxin from the salivary glands of the tick *Ixodes ricinus*. Mgr. Thesis, in Czech], 44 p., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Ticks feed on their vertebrate hosts for number of days, providing enough time for development of an effective immune response. To overcome this, tick saliva contains a complex mixture of active substances which mediate host defense mechanisms. Extremely important role at the tick-host interface is played by the protease inhibitors. In this work, we have focused on the protein named Ixoccludin 2, a member of the Kunitz type/Bovine trypsin inhibitors of serine proteases, related also to the potassium channel blockers toxins. Three different expression systems (*Escherichia coli*, Chinese hamster ovary and *Pichia pastoris*) were tested to prepare an active recombinant Ixoccludin 2, out of which, only bacterial system was in part successful.

Práce byla financována z výzkumného záměru Biologické fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích MŠMT č. 6007665801.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b č. zákona 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to 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

.....
Podpis

Poděkování:

Poděkovat bych chtěla především svému školiteli RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc. za vedení mé práce a možnost pracovat v této laboratoři. Dále mé poděkování patří především Danielu Sojkovi PhD. a Lence Grunclové PhD., ale i dalším kolegům z laboratoře – RNDr. Jindřichu Chmelařovi, Ondřeji Hajduškovi PhD., RNDr. Zdeňku Frantovi a Veronice Burešové PhD. za ochotu kdykoliv pomoci a poradit. Za pomoc při expresi rekombinantního proteinu v buňkách křeččích ovarii děkuji Katce Černé, PhD. Celému osazenstvu 3. patra PAU pak děkuji za skvělou atmosféru, ve které jsem mohla pracovat.

Na závěr bych chtěla poděkovat svým rodičům a příteli za finanční i psychickou podporu.

Obsah:

1. Úvod	1
1.1. Klíště obecné	1
1.2. Interakce mezi imunitním systémem hostitele a klíštětem	2
1.3. Rodina Kunitz/BPTI inhibitorů serinových proteáz	4
1.3.1. Toxiny ze skupiny Monolaris	5
2. Materiál a metody	8
2.1. Klíšťata a pitva tkání	11
2.1.1. Získání slin klíštěte <i>I. ricinus</i>	11
2.2. Izolace totální RNA	11
2.3. 5' - RACE PCR	11
2.4. RT-PCR	13
2.5. Exprese proteinu za použití vektoru pET100/D-TOPO®	14
2.5.1. Příprava expresního vektoru	14
2.5.2. Exprese proteinu	14
2.5.2.1. Purifikace rekombinantního proteinu	15
2.5.2.2. Diluční refolding	15
2.6. Příprava protilátek	16
2.7. Test aktivity rekombinantního proteinu - inhibice trypsinu	16
2.8. Detekce proteinu ve slinách pomocí metody Western Blot	16
2.9. Exprese proteinu v bakteriálním systému za použití vektoru pET-17b	17
2.9.1. Příprava expresního vektoru	17
2.9.2. Exprese proteinu	17
2.10. Exprese v buňkách křeččích ovarii	18
2.10.1. Příprava vektoru	18
2.10.2. Příprava buněk křeččích ovarii – pasážování	18
2.10.3. Transfekce	19
2.11. Exprese ve kvasinkách <i>Pichia pastoris</i>	19
2.11.1. Příprava expresního vektoru	19
2.11.2. Elektroporace do buněk <i>P. pastoris</i>	20
2.11.3. Kultivace	21
3. Výsledky	22
3.1. Izolace genu pro Ixoccludine 2 a jeho sekvence	22
3.2. RT-PCR analýza transkripce genu pro Ixoccludine 2	23
3.2.1. Analýza tkáňového profilu	23
3.2.2. Analýza transkripce v průběhu sání	24
3.3. Exprese proteinu za použití vektoru pET100/D-TOPO®	24
3.4. Identifikace Ixoccludinu 2 ve slinných žlázách a slinách klíštěte <i>I. ricinus</i>	27
3.5. Exprese proteinu v bakteriálním systému za použití vektoru pET-17b	29
3.6. Exprese proteinu v buňkách křeččích ovarii	30
3.7. Exprese ve kvasinkách	31
4. Diskuze	35
5. Závěr	38
6. Seznam použité literatury	39

1. Úvod

1.1. Klíště obecné

Klíšťata (*Ixodida*) (obr. 1) patří mezi obligátní krevsající ektoparazity suchozemských obratlovců. Patří do třídy pavoukovci (*Arachnida*) a kmenu členovci (*Arthropoda*). Bylo popsáno kolem 850 druhů reprezentujících tři velké skupiny – *Ixodidae*, *Argasidae* a *Nuttalliellidae* (Sonenshine, 1994).



OBR. 1. Člen řádu *Ixodida* (*Ixodes ricinus*)

Ke svému životu vyžadují klíšťata vysokou, téměř sedmdesátiprocentní vlhkost vzduchu. Jejich přirozeným prostředím jsou biotopy lesů, křovin a pastvin s křovinami.

Výskyt je pevně vázán na přítomnost vhodných hostitelů, hlavně větších savců. Dospělci se během vyhledávání hostitele vyskytují až ve výšce jednoho metru, a napadají převážně vyšší zvěř jako jsou srnci, domácí zvířata a člověk. Nymfy a larvy napadají převážně menší živočichy – hlodavce, ježky nebo ptáky (Sonenshine, 1994) a se vyskytují ve výšce od 5 do 50 cm.

Klíšťata při svém vývoji prochází třemi vývojovými stádii: larva, nymfa a imago. Z vajíček se líhnou larvy, které mají pouze tři páry kráčivých končetin, nymfy a dospělci mají čtyři páry nohou.

U klíšťat (*Ixodidae*) je pevně daný počet sání i množství hostitelů. V této souvislosti rozlišujeme klíšťata na jednohostitelská, dvouhostitelská a trojhostitelská. Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je zástupcem trojhostitelských klíšťat, u kterých vhodného hostitele napadá nejprve larva, jež se posléze pustí a zahrabána v zemi se svléká. Poté se mění v nymfu, která opět vyhledá hostitele, po určité době odpadá, svléká se a mění v pohlavně zralého dospělého, který vyhledá třetího hostitele.

Klíšťata jsou přenašeči mnohých lidských i zvířecích patogenů, mezi které patří protozoa, bakterie, viry i houby (Jongejan & Uilenberg, 2004). Klíště *I. ricinus* je ve střední a západní Evropě důležitým přenašečem zejména dvou závažných onemocnění, a to klíšťové encefalitidy (jejíž původcem jsou arboviry) a Lymské boreliózy (jejím původcem jsou spirochety *Borrelia burgdorferi* sensu lato) (Nuttall, 1999). Dále se ukázalo, že je též přenašečem *Anaplasma phagocytophilum* (Ogden et al, 2003), jež patří mezi rickettsie. Jedná se bakterie, obligátní intracelulární patogeny, jež napadají buňky retikulo-endoteliálního

sytému, zejména monocyty či buňky endotelu. Dále je zodpovědné i za přenos několika druhů rodu *Babesia*, patogena způsobujícího babesiózu, onemocnění červených krvinek (Lewis a Young, 1980).

1.2. Interakce mezi imunitním systémem hostitele a klíštětem

Vrozená buněčná imunitní odpověď, závislá na receptorech (TLR receptory), patří mezi první linie obrany proti patogenům. Další obranou je kaskáda komplementu, jejíž aktivace vede k opsonizaci patogena i k formaci membránového komplexu, která vede k lýzi bakterie. Specifičtější imunitní odpověď, ke které dochází po překonání vrozené imunitní odpovědi, je spuštěna v okamžiku migrace aktivovaných antigen-prezentujících buněk do lymfoidní tkáně. V lymfatických uzlech dochází k prezentaci zpracovaných antigenů T-lymfocytům. Ty hrají centrální roli v buněčné imunitní odpovědi proti infekci a asistují při aktivaci B-lymfocytů pro vývoj následné protilátkové imunitní odpovědi.

Klíšťata přijímají krev po dobu několika dní, což je dostatečná doba pro rozvinutí hostitelovi imunitní odpovědi. Adaptace klíštěte k sání vedla k vývoji komplexní směsi látek ve slinách, jež pomáhají parazitovi potlačit srážení krve a brání vzniku zánětlivé reakce. Dlouhá evoluce klíšťat vedla k rozvoji mechanismů interferujících s mechanismy imunitní odpovědi, srážení krve, agregace krevních destiček, vasodilatace a inervace kožní tkáně hostitele. Proto by znalost jednotlivých látek klíštěcích slin mohla vést k objevu nových farmakologicky použitelných molekul a k vývoji vakcíny blokující přenos nemocí.

Extrakt ze slinných žláz (SGE - salivary gland extrakt) a klíštěcí sliny mají zásadní význam pro přenos a uchycení patogenů v hostitelském organismu (Nuttall & Labuda, 2004). Důležitým faktorem pro přenos jsou mechanismy imunosuprese a imunomodulace klíštěcími slinami (Wikel, 1999; Brossard & Wikel, 1997; Wikel & Bergnam, 1997).

Relativně málo je známo o proteinech ze slin klíšťat zodpovědných za jednotlivé efekty SGE a klíštěcích slin. Významným pokrokem v tomto směru jsou práce analyzující transkripty slinných žláz - klonů cDNA knihoven ze slinných žláz *Ixodes ricinus* (Chmelař et al., 2008), *Ixodes scapularis* (Valenzuela et al., 2003; Ribeiro et al., 2006) a *Ixodes pacificus* (Francischetti et al., 2005). Přehled bioaktivních molekul z klíštěcích slin, převzatý z publikace Valenzuely (2004) a doplněný recentně popsány proteiny, je uveden v tabulce 1.

TABULKA 1.: Anti-hemostatické látky identifikované v klíščících slinách

Druhy klíšťat	Vazodilatační faktor	Protisrážlivý faktor	Faktor zamezující agregaci krev. destiček
<i>Amblyomma americanum</i>	Prostaglandin E2, F2* (Aljamali et al., 2002; Ribeiro et al., 1992)	Factor Xa inhibitor (Zhu et al., 1997a); Americanin (anti-thrombin- Zhu et al., 1997b)	Americanin (antithrombin- Zhu et al., 1997b)
<i>Boophilus microplus</i>	Prostaglandin E2* (Dickinson et al., 1976)	Antithrombin (Horn et al., 2000), Microphilin (inhibice thrombinu, ciprandi et al., 2006)	Antithrombin (Horn et al., 2002)
<i>Dermacentor andersoni</i>		Inhibitor FV a FVII (Gordon & Allen, 1991)	
<i>Dermacentor variabilis</i>			
<i>Haemaphysalis longicornis</i>		Madanin 1 a 2 (Iwanaga et al., 2003)	GPIIa-IIIb antagonist* (Wang et al., 1996)
<i>Hyalomma truncatum</i>		FXa inhibitor (Joubert et al., 1995)	Madanin 1 a 2 (Iwanaga et al., 2003)
<i>Ixodes scapularis</i>	PG12 (prostaeyclin)* (Ribeiro et al., 1988)	Faktor Xa inhibitor* (Narasimhan et al., 2002); Ixolaris* (TFPI- inhibitor FVIIa - Francischetti et al., 2002); Penthalaris* (TFPI- inhibitor FVIIa, Francischetti et al., 2004); Salp 14 (aktivita proti FXa, Narasimhan et al., 2004)	Apyráza (Ribeiro et al., 1985)
<i>Ornithodoros moubata</i>		Tick anticoagulant peptide (TAP)* (Hawkins & Hellmann, 1966); Ornithodorin (anti-thrombin* - Van der Locht et al., 1996)	Apyráza (Ribeiro et al., 1991); Disagregin* (Karczewski et al., 1994); Moubatin* (Keller et al., 1993); Tick adhesion inhibitor (TAI- Karczewski et al., 1995)
<i>Ornithodoros savignii</i>		Savignin (anti-thrombin* -Nienaber et al., 1999); Factor Xa inhibitor* (Joubert et al., 1998); BSAP1, BSAP2 (Ehebauer et al., 2002)	Savignygrin (desintegrin* - Mans et al., 2002; Apyráza (Mans et al., 2000); Savignin (anti-thrombin* - Nienaber et al., 1999)
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>		Factor Xa inhibitor (Limo et al., 1991)	

* - biologicky aktivní látky charakterizované na molekulární úrovni, červeně jsou označeny členové rodiny Kunitz/BPTI (Bovine pancreatic trypsin inhibitors)

Některé z těchto bioaktivních molekul narušují srážení krevních destiček, například Moubatin (Keller et al., 1993), další mají antithrombinovou aktivitu (Lai et al., 2004; Horn et al., 2000). Klíšťata také využívají vysokých koncentrací prostaglandinů (např. PGD₂, PGE₂) k zabránění vazokonstrikce (Champagne, 1994), agregace neutrofilů a degranulace žírných buněk (Ribeiro et al., 1985). PGE₂ způsobuje mimo jiné inhibici produkce Th1, ale nikoliv Th2 cytokinů (Betz & Fox, 1991). Antikoagulační aktivitu vykazují proteiny skupiny Salp9 a Salp14 („Salivary Protein“ o velikosti 9 a 14 kDa) a několik proteinů (Ixolaris, Penthalaris) z rodiny Kunitz/BPTI, které inhibují aktivaci faktoru srážlivosti krve Xa (Francischetti et al., 2002, 2004; Narasimhan et al. 2002). Další mají anti-neutrofil (Ribeiro et al., 1990) či anti-Interleukin-2 aktivitu (Leboulle et al., 2002).

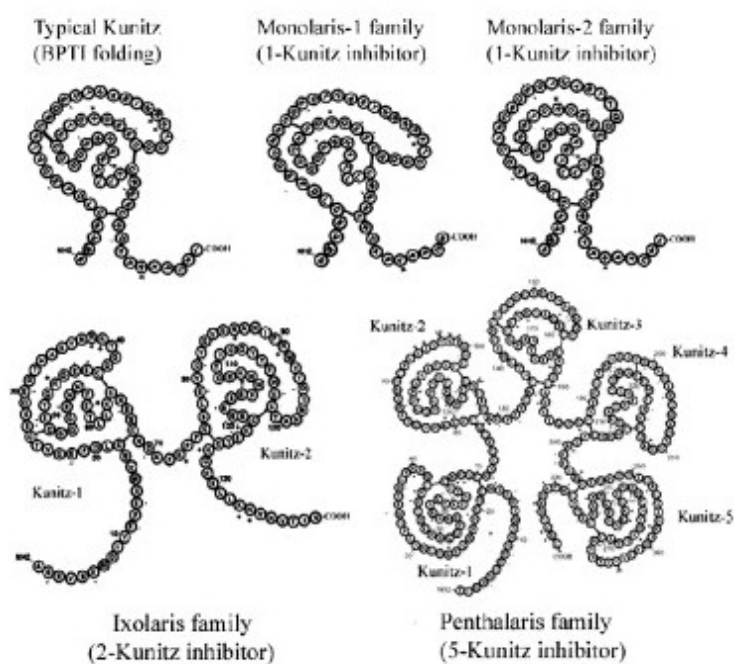
V dnešní době je známo a molekulárně charakterizováno jen málo proteinů s prokázaným imunomodulačním účinkem na specifickou imunitu. Jedním z nich je Da-p36, který výrazně inhibuje proliferaci T-lymfocytů (Bergman et al., 2000), dalšími jsou glykoprotein Salp15 inhibující proliferaci CD⁺ T lymfocytů (Ramamoorthi et al., 2005) a protein IRIS z *I. ricinus* s řadou imunomodulačních funkcí (Leboulle et al., 2002; Anquita et al. 2002)

Nepřímá podpora přenosu klíšťecích patogenů díky působení bioaktivních molekul ze slinných žláz klíšťete se nazývá Saliva Activated Transmission (SAT). Nedávno byla objevena první z molekul, zodpovědných za tento jev – výše zmíněný Salp 15 (Ramamoorthi et al., 2005). U viru klíšťové encefalitidy a SGE z klíšťat *I. ricinus*, *Dermacentor reticulatus* a *Rhipicephalus appendiculatus* byl pozorován stimulační efekt na přenos viru mezi klíšťaty sajícími na jednom hostiteli (Labuda et al., 1993). SAT byl pozorován i u přenosu borelií (Zeidner et al., 2002).

Jednou z dalších vlastností látek, které obsahují klíšťecí sliny, je schopnost toxického působení na nervový systém hostitele - nervová paralýza. V extrémním případě může způsobit vážné onemocnění – klíšťecí paralýzu, pozorovanou např. u hostitelů klíšťete *Ixodes holocyclus* (Campbell et al., 2004) či *Dermacentor andersoni* (Lysyk et al., 2009). Je to relativně neobvyklé nervově svalové onemocnění převažující mezi mladými dívkami a staršími muži. Typickým příznakem je akutní paralýza vyskytující se několik dní po napadení klíšťetem, která může vést až k selhání dýchací soustavy a smrti (Vedananarayanan et al., 2004).

1.3. Rodina Kunitz/BPTI inhibitorů serinových proteáz

Relativně velký počet molekul, identifikovaných ze slinných žláz klíšťat, patří do skupiny Kunitz BPTI/ inhibitorů (Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitors – označeny červeně v tabulce č.1). Tato rodina BPTI /Kunitz inhibitorů je rozdělena podle prostorové struktury na malé jednodoménové inhibitory serinových proteáz (skupina Monolaris), dvoudoménové (skupina Bilaris) a komplexní vícedoménové molekuly, jejichž typickým zástupcem je protein Penthalaris (Francischetti et al., 2005) (obr.2).



OBR. 2. Struktura členů rodiny BPTI
Převzato z Francischetti et al., 2005

Typický zástupce skupiny Monolaris má délku řetězce kolem 60 aminokyselinových zbytků a je stabilizován třemi disulfidickými můstky. O této skupině se více zmíním dále.

Bilaris, skupina proteinů slinných žláz s dvěma Kunitzovými doménami, se dělí na nejméně čtyři podskupiny (Ribeiro et al., 2005). Molekulárně charakterizován byl zatím jen Ixolaris z rodiny TFPI „Tissue factor pathway inhibitor“ (Francischetti et al., 2002). Tento protein inhibuje Faktor VIIa v dráze srážení krve a interaguje s prothrombinázovým komplexem.

Zástupce proteinů ze slinných žláz s více Kunitzovými doménami je Penthalaris z rodiny TFPI, který také inhibuje srážení krve specifickou inhibicí Faktoru VIIa (Francischetti et al., 2004).

1.3.1. Toxiny ze skupiny Monolaris

Pro proteiny skupiny Monolaris je typická přítomnost jedné Kunitzovi domény, sekvenční podobnost a molekulová hmotnost menší než 12 kDa. Kromě velmi účinných inhibitorů serinových proteáz, např. trypsinu (Pritchard & Dafton, 1999), patří do této skupiny i toxiny. Tyto toxiny, např. dendrotoxiny, izolované z jedu mamby *Dendroaspis angusticeps* jsou schopny blokace draslíkových kanálů (Harvey, 1997). Další z toxinů z této rodiny, konkunitzin-S1, byl izolován z jedu homolice *Conus striatus* (Dy et al., 2006), plže žijícího na mořském dně, který paralyzuje svou kořist vstříknutím jedu z přeměněného ústního ústrojí do tvaru harpuny. Skupina blokátorů draslíkových kanálů byla izolována i z mořské sasanky *Anemone sulcata* (Castaneda et Harvey, 2009; Schweitz et al., 1995) či z jedu hadů rodu *Bungarus* (bungarotoxiny) (Oswald & Freeman, 1981). Molekuly připravené podle struktury těchto proteinů se používají jako alternativní imunosupresiva (Damjanovich et al., 2004) při léčbě srdečních a autoimunních onemocnění a roztroušené sklerózy.

Při screeningu cDNA knihovny ze slinných žláz klíštěte *I. ricinus* byly nalezeny proteiny rodiny BPTI/Kunitz inhibitorů, sekvenčně podobné kalicludinům ze sasanky *A. sulcata*, inhibujícím draslíkové kanály (Schweitz et al., 1995). Podle těchto toxinů byly nazvány Ixoccludiny. Ve své bakalářské práci jsem se zabývala formou Ixoccludinu 1, v této diplomové práci jsem se pokusila o expresi rekombinatního Ixoccludinu 2.

Cíle práce:

1. Získání celé sekvence genu kódujícího Ixocladine 2.
2. Profil transkripce genu pro Ixocladinu 2 pomocí RT-PCR.
3. Příprava aktivního rekombinantního proteinu a ověření jeho funkce.

2. Materiál a metody

TABULKA 2: Použité roztoky, média, chemikálie, kity a software

Roztoky, média a chemikálie	
Název	Složení
Elektroforéza v agarózovém gelu	
1x TAE pufr	40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
6x Loading Dye	0,25% bromfenolová modř, 0,25% xylencyanol, 30% glycerol, 1,2% SDS, 60 mM fosfát sodný (MBI Fermentas)
PCR H ₂ O	filtrovaná, destilovaná, autoklávovaná voda (Millipore)
DNA standard	GeneRuler™ 100bp DNA ladder (MBI Fermentas)
dNTP mix	směs dNTP à 2,5 mM (MBI Fermentas)
Použité primery – genově specifické	
IxC1- S	5'-GGG CCT ACC TTG ATG TTT ACT TCT-3'
IxC1-GSP-1	5'-TCT GGA ACC TTT GAT GAA GCC -3'
IxC1-GSP-2	5'-GAT CCT TTT GCG GAC CAC AGA -3'
IxC1-GSP-3	5'-AAT TTC TCG GCT TTG GTT TGT-3'
Kun2Pet100-S	5'-cacc CGA AGA GAA CGT CCT AGG A-3'
Kun2Pet100-AS	5'- CGG GAA CCT TTG ATG AAG CG -3'
Kun2-17b-F	5'-gc tct aga CGA AGA GAA CGT CCT AGG A-3'
Kun2-17b-R	5'-tcc teg agT CAA TTT CTC GGC TTT GGT TTG TAG CGT CT-3'
Kun2HAM-S	5'-aga gga tcc ATG AAA CCA AAA ATG CAG-3'
Kun2HAM-AS	5'-tct acc ggt CTT CTT TCA ATT TCT CGG CTT TG-3'
KunPich-S	5'-tct ctc gag aaa aga CGA AGA GAA CGA CGT CCT AGG A-3'
KunPich-AS	5'-tc tct aga ACA GAA CTT CTT TCA ATT TCT -3'
Použité primery – sekvenační, na 5'RACE PCR	
CMV	5' -GAC GCA AAT GGG CGG TAG- 3'
forward-T7	5'-TAA TAC GAC TAC CTA TAG GG-3'
reverse-T7	5'-TAG TAA TTG CTC AGC GGT GG-3'
M13-S	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
AOX1- Forward	5'- GAC TGG TTC CAA TTGACA AGC-3'
AAP	5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT GG
AUP	5'- CUA CUA CUA CUA GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC – 3'
SDS-PAGE a Western blot	
5x Elektroforetický pufr	0,125 M Tris, 0,96 M glycin, 0,5% SDS
5x Vzorkový redukující pufr	0,75 M Tris-HCl, pH 6,8, 5% SDS, 50% glycerol, 0,5% dithiotreitol, 0,25% bromfenolová modř
5x Gelový pufr	1,875 M Tris-HCl, pH 8,8
Odbarvovací roztok	25% metanol, 10% kyselina octová
Proteinový standard - LMW	LMW Electrophoresis Calibration Kit (Amersham)
Barvicí roztok - coomassie	0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% metanol, 10% kyselina octová
PBS-Tween	1x PBS; 0,05 % Tween 20
Blotovací pufr	0,125 M Tris; 0,96 M glycin; 0,1% SDS, 20% metanol

Blokovací pufr	5% sušené mléko v PBS-Tween 20
Sekundární protilátka	SwAR-PX (Serapharma)
Substrátový roztok - DAB	~10 mg diaminobenzidín, 50 µl H ₂ O ₂ , v 100 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 7,8
Expres, purifikace a refolding rekombinantního proteinu z bakteriálního expresního systému	
LB médium	25 g na 1 l dH ₂ O LB broth (Amresco), autoklávováno
LB agar	10 g LB broth, 6 g Agar Bacteriological Grade (Amresco), 400 ml dH ₂ O, autoklávováno
SOC médium	2% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 10 mM NaCl, 0,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20mM glukóza, autoklávováno
IPTG zásobní	100 mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
Lytický pufr	0,4 M NaCl, 0,1 M KCl, 10% glycerol, 0,5% Triton X-100, 10 mM imidazol
Resuspendační pufr	20 mM Tris/HCl, pH 8,0
Izolační pufr	2 M močovina, 20 mM Tris/HCl, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol, 1 mM 2-merkaptóetanol, 2% Triton X-100, pH 8,0
Pufr A	8 M urea, 10 mM Tris/HCl; pH 8
Pufr B	8 M urea, 10 mM Tris/HCl; 0,5 M imidazol, pH 8
Stripovací roztok	50 mM EDTA
Roztok niklové soli	50 mM NiSO ₄
10x PBS	80g NaCl, 2g KCl, 14,4g Na ₂ HPO ₄ , 2,4g KH ₂ PO ₄ , pH 7,4, 1 l H ₂ O
Expres rekombinantního proteinu v buňkách křeččích ovarii	
Kultivační médium	D-MEM, 5%BOFES, 1% Antibiotic/Antimycotic (PAA), 1% glutamin
Benzotrypsin	0,1g chelaton III, 6ml zásobního trypsinu, 500 ml PBS, filtrováno
PEI	Polyetyleninín, 1 mg/ml v H ₂ O
Zásobní trypsin	1,5% trypsin v PBS, filtrováno
D-MEM	D-MEM Hight Glucose (4,5 g/l) (PAA)
G-MEM	G-MEM Hight Glucose (4,5 g/l) (PAA)
Trypanová modř	0,5% Trypan Blue (Sigma)
IMDM s glutaminem	IMDM with glutamin (PAA)
Expres rekombinantního proteinu v kvasinkách <i>P. pastoris</i>	
YPD médium	1% kvasinkový extrakt, 2% peptone, 2% dextróza
Draslíkový pufr	86,8% 1 M KH ₂ PO ₄ , 13,2% 1M K ₂ HPO ₄ , pH 6
Expresní médium	10% YNB, 10% draslíkový pufr, 1% metanol, 0,02% biotín, 10% glycerol
Získání slin ze samic <i>I. ricinus</i>	
Pylokarpin	5 mg pylokarpinu v 150 µl ethanolu
Inhibice trypsinu	
Pufr AB (assay buffer)	100 mM Tris/HCl, pH 8,0
BAPNA	2,6 mg N- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroalanine (Sigma) rozpuštěno v 100 µl DMSO (Sigma) a 900 µl H ₂ O
Trypsin	20 µg/ml trypsinu v 0,025 M Na-acetátu, pH 5,0

Kity	
Metoda	Název soupravy
5'-RACE-PCR	5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen)
Expres rekombinantního proteinu	Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen)
Sekvence DNA	CEQ™ DTCS - Quick Start KIT (Beckman-Coulter)
Izolace plazmidu	JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed)
Čištění PCR produktu z reakce	Gene Elute™ PCR Clean-up Kit (Sigma)
Čištění PCR produktu z agarózového gelu	QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
Klonování PRC produktu do vektoru	TA Cloning 2.1 Original (Invitrogen)
Čištění reakce po restrikci	PCR Purification Spin Kit/250 (Genomed)

Software	
Použití	Název softwaru
Predikce signálního peptidu	SignalP 3.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)
Editace DNA sekvencí	Editseq (DNA star, LaserGene)
Clustal W	MegAlign (DNA star, LaserGene)
Fotodokumentace	AlpfaDigiDoc RT (Kodak)
Editace obrázků	Corel 11.0 (Corel Corporation), Adobe Photoshop 7,0 (Adobe)
Navrhování primerů	PrimerSelect (DNA Star, LaserGene)

Přístroje	
Použití	Název přístroje
Centrifugace	Multifuge 3 S-R (Heraeus)
Elektroforéza	Hofer SE250 (Pharmacia Biotech)
Blotting	TE series transphor electrophoresis unit (Hofer scientific Instruments)
Chelatační kolona	BioLogic LB (Biorad)
UV spektrofotometr	UV-1601 (Shimazu)
Destičkový spektrofotometr	Infinite M200 (Tecan)
PCR amplifikace	Mastercycler gradient (Eppendorf)
Elektroporátor	ECM630 (BTX®)

2.1. Klíšťata a pitva tkání

Samice *I. ricinus* byly krmeny na morčatech a chovány při teplotě 24° C a vzdušné vlhkosti vyšší než 90 %.

Vypreparované tkáně byly promývány ve fyziologickém pufru PBS (phosphate buffered saline) a následně přesunuty do roztoku RNAlater™ nebo PBS.

2.1.1. Získání slin klíštěte *I. ricinus*

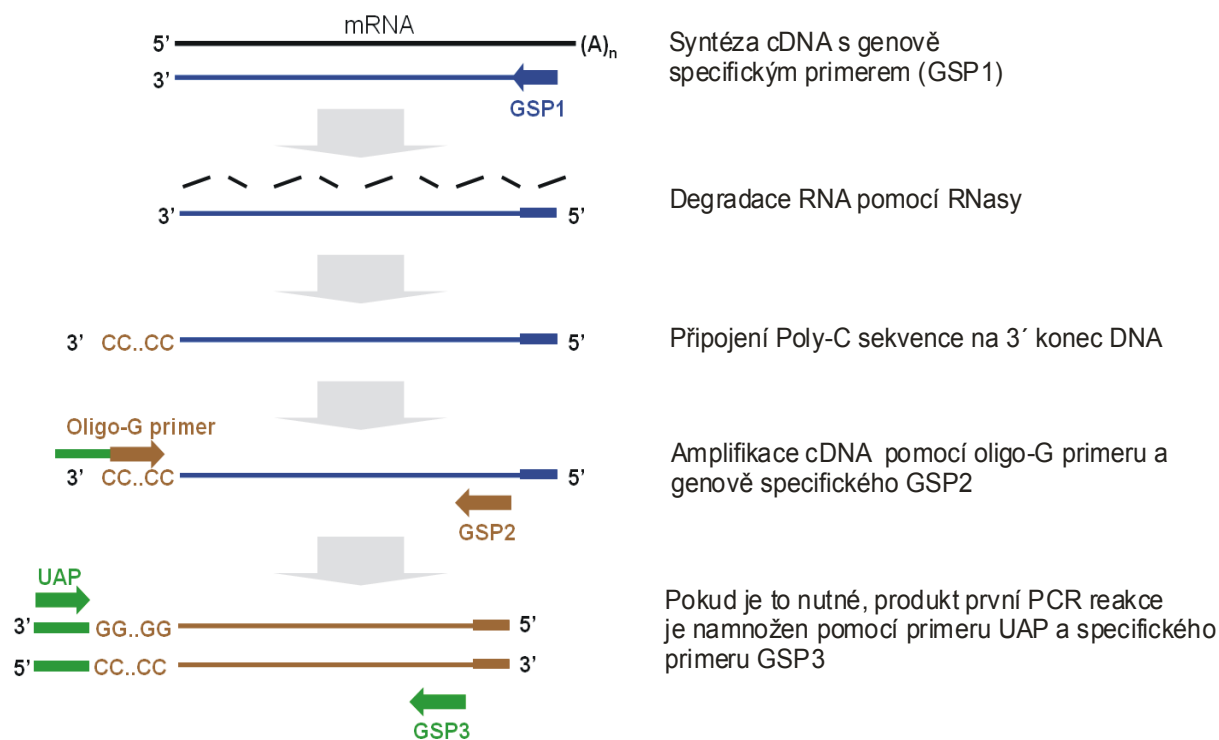
Bylo použito 23 klíšťat lepenkou upevněných na laboratorní skla. Sliny byly jímány do kapiláry, která byla k podložce přichycena plastelínou. Tělo každé samice bylo potřeno 1 μ l pylokarpinu. Klíšťata byla za častých kontrol ponechána ve vlhké komůrce v 37°C po 5 hodin.

2.2. Izolace totální RNA

Tkáně (střevo, slinné žlázy, vaječníky, malphigické trubice a tracheje) samice klíštěte *I. ricinus* 5 dní po nasátí byly homogenizovány v mikrozkuhavce pomocí plastového homogenizátoru v TRI Reagent™ roztoku (Sigma), 1 ml na 50 - 100 mg čerstvé tkáně. Homogenát byl centrifugován 16 000 g/10 min/4°C. Supernatant obsahující RNA byl převeden do zkumavky, kde byla izolace dále prováděna dle protokolu TRI Reagent™. Kvalita výsledné totální RNA byla ověřena elektroforeticky na TBE agarózovém gelu. Koncentrace RNA byla zjištěna z naměřené absorbance při $\lambda = 260$ nm.

2.3. 5' - RACE PCR

Pro získání celé kódující sekvence Ixoccludinu 2 byla použita metoda 5' RACE PCR - Rapid Amplification of cDNA Ends (5'RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Invitrogen). Princip této metody je schematicky znázorněn na obr. 3



OBR. 3: Schéma principu metody 5' RACE PCR

Syntéza prvního vlákna z totální RNA byla provedena v několika krocích. Nejprve byla RNA denaturována 10 min v 70°C v 0,5 ml zkumavkách:

primer IxCl2-GSP1 (20 µl/ml)	1 µl
totální RNA	3 µg
DEPC H ₂ O	do 15,5 µl

Po stočení a zchlazení 1 min na ledu byly přidány další reagenty:

10x PCR pufr	2,5 µl
25 mM MgCl ₂	2,5 µl
10 mM dNTP mix	2,5 µl
0,1 M DTT	2,5 µl

Po centrifugaci byla reakce inkubována 52 min v 42°C, přičemž po 2 min byl přidán 1 µl reverzní transkriptázy SuperScriptTM II RT (Invitrogen). Reakce byla ukončena inkubací 15 min při 70°C. Po přidání 1 µl RNase mixu byl RNA templát odstraněn inkubací 30 min při 37°C. Reakce byla přečištěna pomocí GenEluteTM PCR DNA Purification Kitu (Genomed).

Následně byla na 3' konec (polyA) připravené cDNA navázána sekvence cytosinů. V 0,5 ml zkumavce byla následující reakce inkubována 2-3 min při 94°C:

DEPC H ₂ O	6,5 µl
5x tailing pufr	5,0 µl
2 mM dCTP	2,5 µl
cDNA	10,0 µl

Po zchlazení na ledu byl do zkumavky přidán 1 µl enzymu TdT (terminal deoxynucleotidyl transferáza) a ponechán 10 min při 37°C. Transferáza byla deaktivována inkubací 10 min při 65°C.

Připravená cDNA byla následně použita jako templát pro PCR reakci s primery AAP (5' RACE Abriged Anchor Primer) a IxC12-GSP2 a po přečištění produktu (GenEluteTM PCR DNA Clean-up Kit, Sigma) následovala další – „nested PCR“ s primery UAP (Universal Amplification Primer) a IxC12-GSP3.

PCR produkt byl po ligaci do vektoru TA Cloning 2.1 Original (Invitrogen) zaklonován pomocí metody „heat shock“ do kompetentních One Shot[®] TOP 10 *E.coli* buněk (Invitrogen). Pomocí PCR amplifikace (primery IxC1-S a IxC1-GSP-3) a sekvenace (M13 primery) byly identifikovány pozitivní klony. Sekvenace byla provedena na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3130xl od firmy Applied Biosystems v Laboratoři genomiky, ÚMBR AV ČR.

2.4. RT-PCR

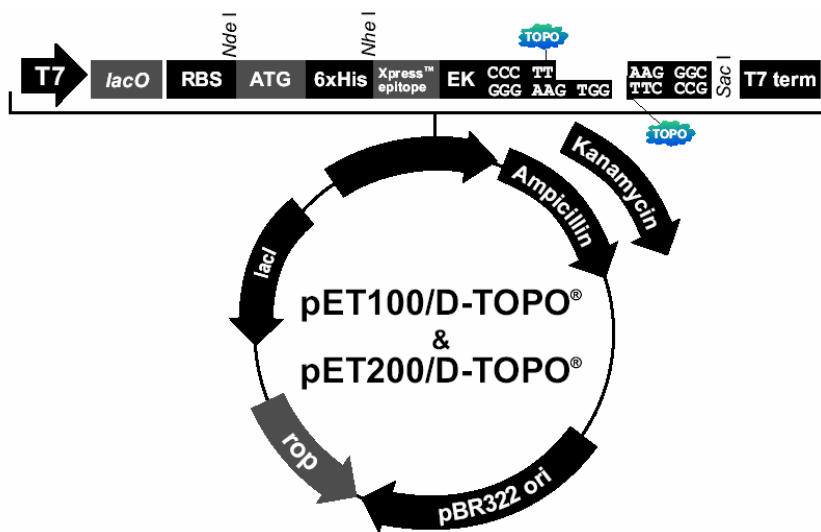
Pro analýzu tkáňového profilu transkripce byly pitvou v 1x PBS pufru izolovány slinné žlázy, střevo, tracheje, malphigické trubice a vaječníky ze samic klíštěte *I. ricinus*. Pro určení časového průběhu transkripce byla totální RNA izolována ze slinných žláz samic klíšťat krmených 1, 3, 5 a 7 dní na laboratorním morčeti. RNA byla získána pomocí TRI ReagentTM roztoku (Sigma). První vlákno (first strand) cDNA bylo připraveno reverzní transkripcí totální RNA za použití reverzní transkriptázy SUPERSRIPT IITM (Gibco) a standartního oligo (dT) primeru (Sigma).

Analýza transkripce genu byla provedena pomocí PCR amplifikace (primery Kun2PET100-S a KUN2PET100-AS). Vizualizace vzorků na agarózovém gelu byla provedena pomocí fotodokumentačního zařízení Kodak a editována v programu AlpaDigiDoc RT.

2.5. Exprese proteinu v bakteriálním systému za použití vektoru pET100/D-TOPO[®]

2.5.1. Příprava expresního vektoru

Pro expresi proteinu byl použit plazmidový vektor pET100/D-TOPO[®] (Invitrogen - obr.4). Histidinová kotva je syntetizována na N-konci translatovaného proteinu. Insert byl amplifikován pomocí PCR amplifikace s gen-specifickými primery (Kun2Pet100-S a Kun2Pet100-AS), jako templát pro reakci byla užitá cDNA ze slinných žláz klíštěte *I. ricinus* po 5 dnech sání. PCR produkt byl po přečištění z gelu (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) zaligován do vektoru pET100/D-TOPO[®] (Invitrogen). Pro kontrolu sekvence a možnost opakovaného namnožení byl plazmidový konstrukt transformován do kompetentních One Shot[®] TOP 10 chemically competent *E.coli* (Invitrogen) a pozitivní klony byly sekvenovány.



OBR. 4: Plazmidový vektor pET100/D-TOPO[®] (Invitrogen)

2.5.2. Exprese proteinu

Ověřené plazmidy byly transformovány do expresních buněk BL21 Star (DE3) OneShot[®] *E. coli* (Invitrogen). Transformace proběhla podle návodu Champion™ pET Directional TOPO[®] Expression Kit (Invitrogen). Byla provedena selekční kultivace v 10 ml LB mediu s carbenicillinem (50 µg/ml) v 37°C přes noc. Tímto inokulem byl naočkován

objem 200 ml kultivačního SOC média, kultivován v 37°C, 4 - 6 hodin a po dosažení $OD_{600} \approx 2$ byla kultura separována centrifugací (3 000 g/ 5 min/ 4° C). Bakteriální pelet byl opakovaně promyt v LB mediu a centrifugován, následně byla kultura resuspendována v 200 ml LB media s 1mM IPTG a kultivována v 37°C přes noc.

Izolace jednotlivých frakcí (cytoplazmatické proteiny, membránové proteiny a inkluzní tělíška) byla provedena opakovanou sonikací v resuspendačním, resp. izolačním pufru, mezi jednotlivými sonikacemi byl pelet stočen 15 000 g/10 min/4°C. Pro úplné rozpuštění inkluzních tělíšek byl zbytek peletu 60 min míchán na magnetické míchačce v solubilizačním pufru.

Analýza jednotlivých frakcí byla provedena pomocí polyakrylamidové elektroforézy (SDS-PAGE) v přítomnosti dodecylsírany sodného podle zavedeného protokolu (Kopáček et al., 1995). SDS-PAGE elektroforéza byla provedena v gradientovém gelu (5-17%) při konstantním napětí 200 V. Vzorky byly před elektroforézou smíchány s vzorkovým redukcí pufrům v poměru 4:1 a denaturovány 3 min při 100° C. Jako marker molekulových hmotností byl použit proteinový standard (LMW, Amersham).

2.5.2.1. Purifikace rekombinantního proteinu

Pro purifikaci rekombinantního proteinu byla použita chromatografie na Ni^{2+} chelatační koloně v prostředí 8 M močoviny. Vzorek z inkluzních tělíšek byl připraven centrifugací (15 000 g/5 min/4°C) a filtrací přes 0,22 μ m membránový filtr Millex[®] GP (Millipore). Kolona byla ekvilibrována pufrům A (8 M urea, 10 mM Tris/HCl, pH 8), poté byl nanesen vzorek a navázané proteiny byly z kolony eluovány lineárním gradientem imidazolu (0-0,5M) v pufru A.

2.5.2.2. Diluční refolding

Po identifikaci frakce obsahující rekombinantní protein pomocí SDS-PAGE byl tento refoldován postupným rozkapáním 5 ml vzorku z kolony do 100 ml refoldovacího roztoku (10% glycerol, 0,1% merkaptoethanol, 0,01% Triton, 100 mM Tris/HCl (pH 7,8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) a ponechán a dialyzován proti refoldovacímu roztoku přes noc při 16°C. Po zakoncentrování odpařením na vakuové centrifuze (SPEED-VAC) byl protein zamražen v -20°C.

2.6. Příprava protilátek

Z králíka bylo odebráno preimunní sérum a následně byl imunizován roztokem 0,5 ml Ixocladine 2 (koncentrace 145 µg/ml) s 0,5 ml nekompletního Freundova adjuvans. Imunizace byla prováděna 4x v intervalu 14 dní (Kopáček et al 2003). Získané imunní sérum bylo označeno Ra x Ix2.

2.7. Test aktivity rekombinantního proteinu - inhibice trypsinu

Do jedné jamky z 96 jamkové destičky bylo nanášeno 50 µl rekombinantního proteinu a jeho koncentrace (145 µg/ml) byla snižována dvojkovou řadou. Do každé jamky bylo přidáno 100 µl pufru AB a 50 µl roztoku trypsinu (konečná koncentrace 1 µg na jamku). Reakce byla iniciována přidáním 50 µl BAPNA (konečná koncentrace 1,2 mM). Všechny kombinace měření byly provedeny v triplicátech. Na destičkovém spektrofotometru byl průběh reakce měřen pomocí změn absorbance při vln. délce $\lambda = 405$ nm po dobu 30 minut (Infinite M200, Tecan).

2.8. Detekce proteinu ve slinách pomocí metody Western Blot

Slinné žlázy ze samice *I. ricinus*, sající 5 dní na laboratorním morčeti, byly rozsuspendovány, na gel byl nanášen supernatant (+ 150 µl H₂O) i pelet (+ 40 µl H₂O). Sliny pro analýzu byly získány vysliněním 23 samic klíšťat a na gel nanášeny vzorky o ředění 1, 10 a 100. Analýza byla provedena pomocí redukující SDS-PAGE.

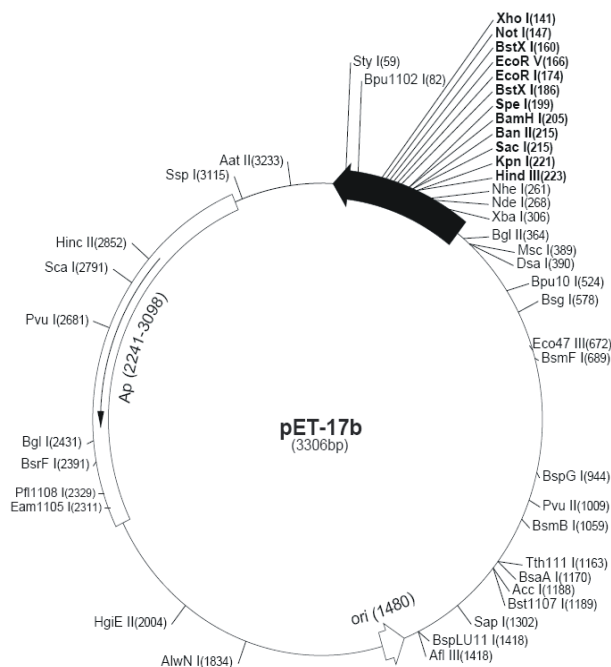
Rozdělené proteiny byly elektroforeticky přeneseny na PVDF membránu. Antigeny byly detekovány připravenou protilátkou Ra x Ix2 a jako sekundární protilátky byla použity SwAR/Px (Sevapharma a. s.). Výsledek byl vizualizován v 100 ml 0,1 M Tris/HCl (pH = 7,5) pomocí 0,6 % 3,3'-diaminobenzidinu a 50 µl H₂O₂.

Protein detekovaný ve slinných žlázách byl purifikován na MonoQ koloně v prostředí 0,05 M Tris/HCl (pH 7,5) a eluován gradientem 0-1 M NaCl. Jednotlivé frakce byly analyzovány metodou DOT-BLOT a Western blot.

2.9. Exprese proteinu v bakteriálním systému za použití vektoru pET-17b

2.9.1 Příprava expresního vektoru

Pro expresi proteinu bez histidinové kotvy byl použit plazmidový vektor pET-17b od firmy Novagen (obr. 5). Insert byl vytvořen pomocí PCR amplifikace s gen-specifickými primery (Kun2-17b-S a Kun2-17b-AS), jako templát pro reakci byla užita cDNA ze slinných žláz klíštěte *I. ricinus*, po 5 dnech sání. PCR produkt byl po amplifikaci naštípán restriktázami XbaI a XhoI (Fermentas), stejně jako vektor, do něhož byl insert následně zaligován (4°C, přes noc, T4 DNA ligase, Invitrogen). Další postup přípravy plazmidu byl stejný jako u vektoru pET100/D-TOPO®.



OBR. 5: Plazmidový vektor pET-17b (Novagen)

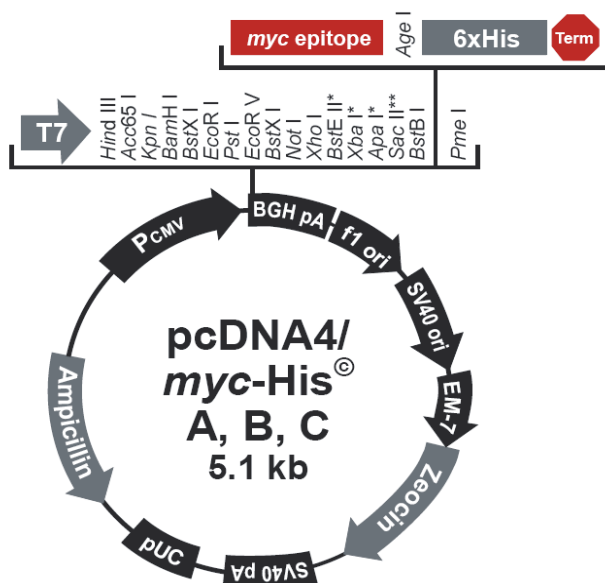
2.9.2. Exprese proteinu

Plazmidový konstrukt ověřený sekvenací byl transformován do expresních buněk Rosseta-gami™ (DE3) competent cells (Novagen) a BL21 Star™ (DE3) One Shot® Chemically competent *E.coli* (Invitrogen). Bakterie byly kultivovány 6 hod v 200 ml LB media s 5 mM glukózou, následně promyty a přes noc ponechány v čerstvém LB mediu s 1mM IPTG. Jednotlivé buněčné frakce byly po izolaci analyzovány metodou SDS-PAGE a Western blot.

2.10. Exprese v buňkách křeččích ovarii

2.10.1. Příprava vektoru

Gen specifické primery (Kun2HAM-S/AS) byly navrženy pomocí Primer Select softwaru. Jako templát pro PCR byla použita cDNA z klíšťat 5 dní krmených na laboratorním morčeti. Po naštípání restriktázami BamHI a AgeI (Fermentas) byl PCR produkt pomocí ligace (T4 DNA ligase, Invitrogen) vložen do vektoru pcDNA4TM myc-HIS[®] A (Invitrogen) (obr. 6).



OBR. 6: Plazmidový vektor pcDNA4TM myc-HIS[®] A (Invitrogen)

Vektor s inzertem byl pomocí metody „heat shock“ transformován do kompetentních One Shot[®] TOP 10 *E.coli* buněk (Invitrogen). Přítomnost inzertu v pozitivních koloniích byla zkontrolována pomocí PCR amplifikace za použití primeru KunHAM-S a KunHAM-AS. Pro sekvenační reakci byl použit forward - CMV primer.

2.10.2. Příprava buněk křeččích ovarii - pasážování

Pro přípravu rekombinantního proteinu byly použity buňky CHO (Chinese hamster ovary, liniové buňky Oddělení imunologie parazitóz). Po kultivaci 2 dny v médiu G-MEM v 37°C a atmosféře s 3,5% CO₂ by měly buňky tvořit monovrstvu. Pro kontrolu možné kontaminace kvasinkami byly kultury po obarvení trypanovou modří (10 μ l + 10 μ l) zkontrolovány v Bürkerově komůrce pod mikroskopem.

Kultivační nádoba s vrstvou buněk byla zbavena média a dvakrát promyta 10 ml sterilního PBS. Po promytí byl do nádoby přidán 1 ml Benzotrypsinu. Po přibližně 5 min bylo k uvolněným buňkám přidáno 9 ml média G-MEM. Z původní kultivační nádoby byla

polovina kultury (5 ml) přepipetována do čerstvé nádoby a k oběma kulturám bylo dodáno odpovídající množství media G-MEM do objemu 20 ml. Celá práce s kulturou probíhala zcela sterilně. Obě kultury byly dále ponechány přes noc v 37°C a atmosféře obsahující 3,5% CO₂.

2.10.3. Transfekce

Do dvou zkumavek o velikosti 15 ml byly napipetovány 4 ml sterilního D-MEM. Do každé z nich bylo přidáno 0,12 µg DNA - vektoru s inzertem Ix2 (koncentrace 749 µg/ml – tedy 40 µl) a kontrolního vektoru s inzertem kódujícím bílkovinu GFP – green fluorescent protein (koncentrace 3800 µg/ml, tedy 7,89 µl) a 150 ng PEI (odpovídající množství 150 µl), DNA: PEI v poměru 1:5. Zkumavky byly ponechány 15 min v pokojové teplotě.

Po promytí buněčných kultur médiem IMDM (5 min) byl do nádob přidán obsah zkumavek s plazmidy, doplněných tímto médiem na objem 20 ml. Buňky byly dále kultivovány přes noc v 37°C.

Pro optimální množství transfekovaných buněk byla nejprve provedena optimalizace metody. Do jednotlivých jamek v destičce byl přidán různý poměr DNA a PEI (3-8:1), byly použity média D-MEM i IMDM, se sérem i bez séra. Jako optimální byla zhodnocena poměr 5:1 (PEI: DNA) a kultivace v médiu D-MEM se sérem.

Po kultivaci přes noc byla zkontrolována úspěšnost transfekce kontrolována pod fluorescenčním mikroskopem. Dva dny po úspěšné transfekci bylo z kultur odebráno médium a zahuštěno ultrafiltrací na objem cca 1 ml pomocí ultrafiltračních zkumavek Amicon (cut-off 5 kDa, Millipore). Před nanesením na akrylamidový gel byla média dialyzována proti roztoku obsahujícím 20 mM NaH₂PO₄ a 500 mM NaCl, pH 7,45. Výsedeček exprese byl analyzován pomocí SDS-PAGE a Western blotu.

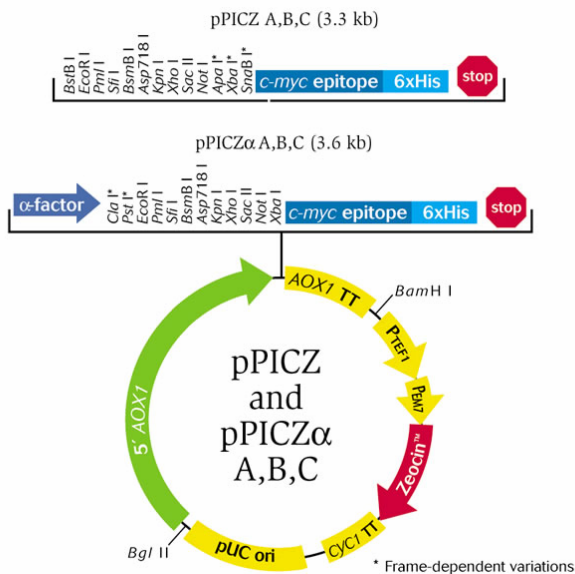
2.11. Exprese ve kvasinkách *Pichia pastoris*

2.11.1. Příprava expresního vektoru

Pro expresi v kvasinkách byl použit vektor pPic2αB (Invitrogen)(obr. 7). Byly navrženy genově specifické primery KunPich-S a KunPich-AS, jako templát pro PCR byla použita cDNA z klíšťat 5 dní krmených na laboratorním morčeti. Nejdříve byl vektor i přečištěný PCR produkt (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) našťipán restrikčními enzymy XhoI a

XbaI (Fermentas) v 10krát vyředěném pufru Tango (Invitrogen). Po ligaci (T4 DNA ligase, Invitrogen) byl konstrukt linearizován (restrikáza BstXI, Fermentas) v 10krát vyředěném pufru NEBuffer 3 (Biolab). Transformace plazmidu do kompetentních buněk One Shot® TOP 10 *E.coli* buněk (Invitrogen) i kontrola pozitivních klonů pomocí PCR amplifikace byla provedena obdobně, jako u přípravy vektoru pro expresi v křeččích ovarii. Sekvence byla provedena pomocí primeru AOX1 - Forward.

Figure 1 - EasySelect™ vector maps (pPICZ, pPICZα)



OBR. 7: Plazmidový vektor pPiczaB (Invitrogen)

2.11.2. Elektroporace do buněk *P. pastoris*

Před elektroporací expresního plazmidu byli prázdné kvasinky *P. pastoris* (klon Xp 33 - Invitrogen) nejprve kultivovány v 10 ml media YPD v 30°C přes noc. Následně byly 2krát promyty MiliQ H₂O o teplotě 4°C, stočeny při přetížení 3 000 g/10 min/4°C a opět 2krát promyty 1M roztokem Sorbitolu vychlazeného na teplotu 4°C. Samotná elektroporace byla provedena v objemu kultury 80 μl (v 1M Sorbitolu) s přidaným expresním vektorem (5 μl), při odporu 12 Ω a napětí 1,5 kV. Hned po elektroporaci byl ke kvasinkám přidán 1ml 1M Sorbitolu, a byly ponechány 30 min v 30°C v 15 ml zkumavce. Po této krátké kultivaci byly kvasinky vysety na YPD-agarové plotny se zeocinem (200 μg/ml, Invivogen) a kultivovány přes noc při 30°C.

2.11.3. Kultivace

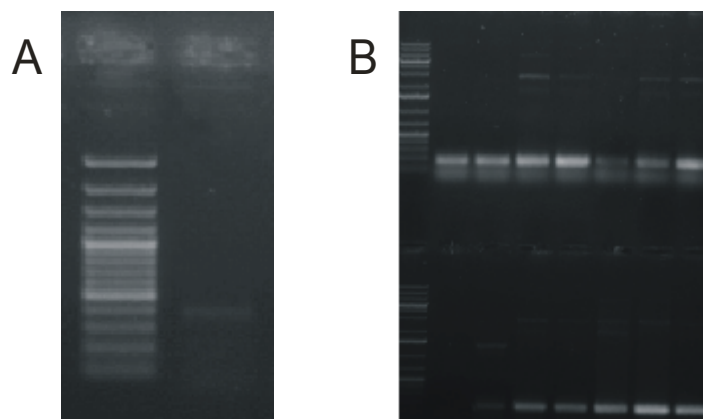
Jednotlivé nejlépe rostoucí kolonie kvasinek byly postupně přeneseny na YPD-agarové plotny se zvyšující se koncentrací zeocinu (200 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml). Nejlépe rostoucí kolonie byla použita k expresi rekombinantního proteinu. Kultura byla přenesena nejprve do 10 ml, poté do 200 ml expresního média. Expres rekombinantního proteinu byla indukována přidáním metanolu, a to ráno (1 ml), v poledne (1 ml) i večer (2 ml) po dobu 5ti dnů. Poté bylo expresní médium se sekretovaným rekombinantním proteinem odděleno od kvasinek centrifugací (3 000 g/10 min/4°C) a poté již ve zkumavce bez peletu kvasinek znovu stočeno při přetížení 10 000 g/10 min/4°C. Před analýzou na akrylamidovém gelu bylo médium přefiltrováno (bakteriální filtr 22 µm - Millipore) a zahuštěno do objemu 1,5 ml ve ultrafiltračních zkumavkách Amicon (cut-off 3 kDa, Millipore).

3. Výsledky

3.1. Izolace genu pro *Ixocladine 2* a jeho sekvence

Pro získání kódujícího 5' konce proteinu byla použita metoda 5'RACE PCR - Rapid Amplification of cDNA Ends. Byly navrženy gen-specifické primery - IxoCl- S, IxoCl-GSP-1, IxoCl-GSP-2 a IxoCl-GSP-3. První vlákno cDNA bylo syntetizováno z totální RNA pomocí reverzní transkriptázy SuperScript™ II RT (Invitrogen). Po přečištění byla na 3' konec cDNA navázána pomocí enzymu TdT (terminal deoxynucleotidyl transferáza) sekvence cytosinů. Připravená cDNA byla následně použita pro PCR reakci s primery AAP (5'RACE Abridged Anchor Primer) a IxoCl2-GSP2 a po přečištění produktu následovala další – „nested PCR“ s primery UAP (Universal Amplification Primer) a IxoCl2-GSP3 (obr. 8).

PCR produkt byl po ligaci do vektoru zaklonován do kompetentních *E.coli* One Shot® TOP 10 (Invitrogen) buněk. Pomocí PCR amplifikace za použití primerů IxoCl- S a IxoCl-GSP-3 byly ověřeny jednotlivé klony, ve dvou z nich byla následně nalezena kompletní sekvence *Ixocladinu 2* s 5' kódující sekvencí.



OBR. 8. PCR amplifikace

Panel A: „nested PCR“ PCR amplifikace pomocí degenerovaného primeru UAP a gen-specifického primeru IxoCl2-GSP3, očekávaný produkt 407 bp

Panel B: ověření jednotlivých klonů PCR reakcí za použití primerů IxoCl-S a IxoCl-GSP-3, celá sekvence nalezena v klonu 1

Získaná kompletní nukleotidová cDNA a z ní odvozená aminokyselinová sekvence pro *Ixocladine 2* je zobrazena na obr. 9. Obsahuje 416 bp s jedním otevřeným čtecím rámcem kódujícím protein o velikosti 98 AK. 5' - nekódující oblast je tvořena 68 bp a 3' - nekódující oblast tvoří 51 bp. Protein obsahuje predikovaný signální peptid (SignalP 3.0) pro transport do endoplasmatického retikula a sekreci vně buněk. Nejpravděpodobnější místo odštěpení signální sekvence je mezi aminokyselinovými zbytky ETA-R. Molekulární hmotnost proteinu bez signálního peptidu je 9375.94 Da a vypočtený izoelektrický bod (pI) je 9,97. Protein obsahuje jedno místo pro možnou N-glykosylaci v pozici N-54.

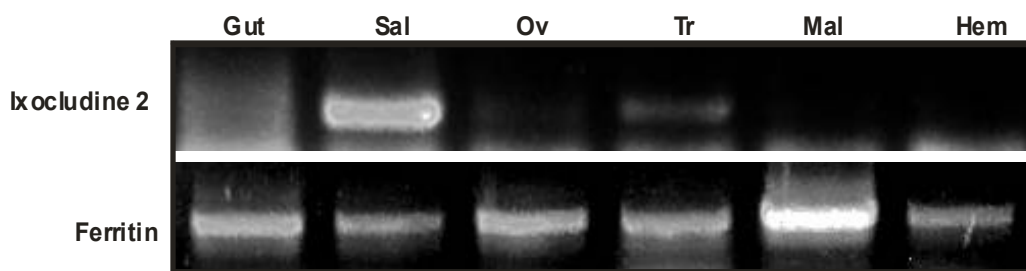
gggggggggggggggggggggggggggggggagacatctgggagctttaaata - 23
 24 - ttcgacgcttcaaaaatatttagttgctagtcaccggcaagcgag - 68
 69 - **atg**aaaccaaataatgcagttgctcttcgcagtgcccttggtcatt - 113
 M K P K M Q L L F A V A L V I
 114 - ttggcatgcatcgtggtggagacagcacgaagagaacgctcctagg - 158
 L A C I V V E T A R R E R P R
 159 - atgccgaggagatgctcgtcagcgtccgggtgaaggacgatgca**gg** - 203
 M P R R C R Q R P G E G R C R
 204 - **gcctaccttgatg**tttacttctataacaacacaaaaaggaggtgc - 248
 A Y L D V Y F Y **N N T** K R R C
 249 - caaaagtttcacgaacgtggttgcgccgctcgagggaatggattt - 293
 Q K F H E R G C P L E G N G F
 294 - tgggatatggaggagtgccgaacgatatgccaagataacaggaga - 338
 Q D M E E C R T I C E D N R R
 339 - cgct**acaaaccaaagccgagaaattga**aagaagt**tctgtggtccg** - 383
 R Y K P K P R N *
 384 - **caaaaggatctg****cgcttcatcaaaggttcccga** - 416

OBR. 9: Kompletní nukleotidová a aminokyselinová sekvence genu pro *Ixoclude 2*
 Start a stop kodon jsou zvýrazněny tučně, predikovaná signální sekvence peptidu modře.
 Barevně jsou označeny primery **IxCI-S**, **IxGSP-3**, **IxGSP-2**, **IxGSP-1**. Cysteiny tvořící
 pravděpodobné disulfidické můstky jsou zbarveny modře. Žlutě je vyznačeno místo možné N-
 glykosylace. Nekódující části sekvence jsou vyznačeny kurzívou, přisyntetizovaná sekvence
 dGTP je podtržena.

3.2. RT-PCR analýza transkripce genu pro *Ixoclude 2*

3.2.1. Analýza tkáňového profilu

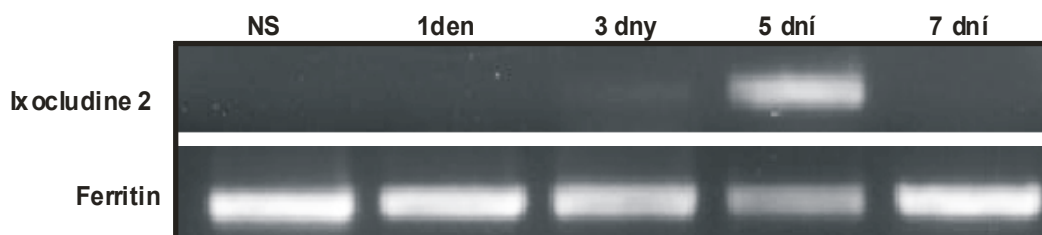
Po získání celé sekvence *Ixoclude 2* byly navrženy specifické primery (Kun2Pet100-S/AS), pro analýzu expresního profilu genu. Dvoukroková RT-PCR byla použita pro lokalizaci transkripce genu pro *Ixoclude 2* v jednotlivých tkáních (obr. 10). Pro amplifikaci byly použity jednořetězcové cDNA templáty z jednotlivých tkání dospělých samic *I. ricinus* pět dní sajících na laboratorním morčeti. K transkripci genu dochází zejména ve slinných žlázách a řádově méně v trachejích. Důvodem tvorby PCR produktu z cDNA izolované z trachejí může být jejich kontaminace částmi slinných žláz během pitvy. Jako templátová kontrola byly použity primery pro intracelulární Ferritin - “housekeeping gene“ (Kopáček et al., 2003), jehož exprese se ve všech vývojových stádiích ani během sání nemění.



OBR. 10: RT-PCR analýza tkáňového profilu transkripce genu pro *Ixocladine 2*
Gut – střevo, *Sal* – slinné žlázy, *Ov* – vaječníky, *Tr* – tracheje, *Mal* – malphigické trubice, *Hem* – hemocyty; *Ferritin* byl použit jako templátová kontrola.

3.2.2. Analýza transkripce v průběhu sání

Se stejnými primery byla provedena analýza transkripce genu pro *Ixocladine 2* v průběhu sání (obr. 11). Jako templát pro PCR reakci byla použita cDNA z slinných žláz dospělých samic *I. ricinus* odebraných různou dobu po začátku sání. Transkripce genu byla prokázána mezi 3. a 5. dnem, což je čas, kdy klíště přechází z režimu „pomalého sání“ (slow feeding period), do „rychlého nasátí“ (rapid engorgement), při kterém během dvou dní nasaje až 1 ml krve. Jako templátová kontrola byly opět použity primery pro *Ferritin*.

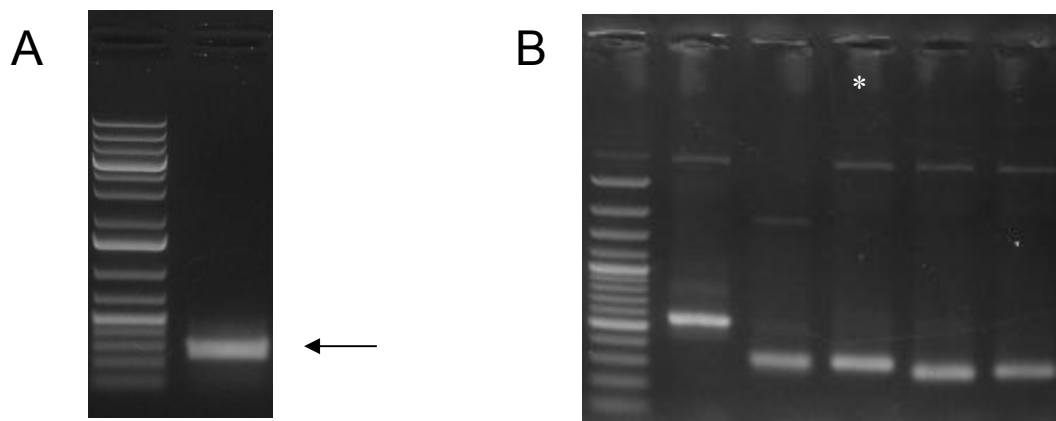


OBR. 11: RT-PCR analýza průběhu transkripce genu pro *Ixocladine 2* během sání
1 den - 7 dní – čas, po který bylo klíště přisáté na laboratorním morčeti, *NS* – nenasátá samice; *Ferritin* byl použit jako templátová kontrola

3.3. Exprese proteinu v bakteriálním systému za použití vektoru *pET100/D-TOPO*[®]

Pro expresi rekombinantního proteinu byl nejdříve použit bakteriální systém *E. coli* a expresní vektor *pET100/D-TOPO*[®] (Invitrogen) s LacO operátorem, který vazbou lac represoru pomáhá zamezit bazální expresi. Z cDNA připravené ze slinných žláz byl pomocí PCR se specifickými primery Kun2Pet100-S a Kun2Pet100-AS amplifikován fragment DNA o velikosti 279 bp. (obr. 12.) Produkt byl přečištěn, zaklonován do expresního vektoru *pET100/D-TOPO*[®] a transformován do kompetentních buněk *E. coli* One Shot[®] TOP 10

(Invitrogen). Ověřené plazmidové konstrukty (obr. 13) byly transformovány do expresních buněk BL21 Star (DE3) OneShot[®] *E. coli* (Invitrogen). Protokol byl optimalizován prekultivací selektované bakteriální kultury v médiu s obsahem glukózy (SOC), kde nulová bazální exprese umožňovala lepší růst kultury.



OBR. 12: Příprava konstruktů pro expresi rekombinantního proteinu s využitím vektoru pET100/D-TOPO[®]

Panel A: PCR amplifikace za použití primeru Kun2Pet100-S/AS, očekávaná velikost PCR produktu 279 bp

Panel B: Ověření přítomnosti inzertu v jednotlivých koloniích, sekvenováním nalezena celá sekvence Ix2 v klonu 3 označeném hvězdičkou

```

.....ttgtttaactttaagaaggagatatacat

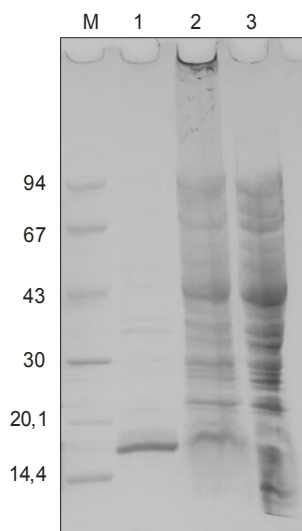
1 - atgCGGGGTTtctcatcatcatcatcatcatggatggctagcatg - 45
  M R G S H H H H H G M A S M
46 - actggTGGACAGCAAatgggtcgggatctgtacgacgatgacgat - 91
  T G G Q Q M G R D L Y D D D D
92 - aaggatcatcccttCACCCGAAGAGAacgTcctaggaTgCCGagg - 137
  K D H P F T R R E R P R M P R
138 - agatgtcgtcagcgtccgggtgaaggacgatgcagggcctacctt - 183
  R C R Q R P G E G R C R A Y L
184 - gatgtttacttctataacaacacaaaaaggaggtGCCAAAagttt - 229
  D V Y F Y N N T K R R C Q K F
230 - cacgaacgtggTtgcccgctcgagggaaatggatttcaggatattg - 275
  H E R G C P L E G N G F Q D M
276 - gaggagtGCCGAACGATatgcgaagataacaggagacgctacaaa - 321
  E E C R T I C E D N R R R Y K
322 - ccaaagccgagaaatTgaagaagttctgtggTccgcaaaaggat - 367
  P K P R N *
368 - ctgCGTtcatCAAAGGttCCCGaaggGCGAGctcaacgatccgg - 390
  ctgctaac .....

```

OBR. 13: Sekvence rekombinantního Ixocladine 2

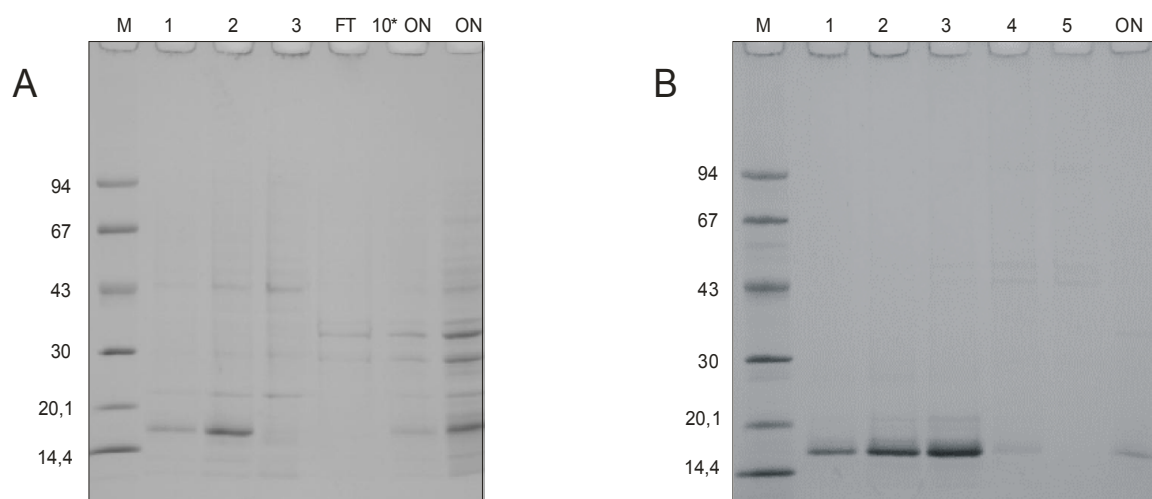
Červenou plochou je označena sekvence vektoru, zeleně sekvence 6ti histidinů tvořící His-tag, tučně PET primery Kun2Pet100-S/AS, kurzívou sekvence vektoru. Start a stop kodon jsou zvýrazněny červeně. Teoretická molekulová hmotnost je 13 501 Da.

Po stočení byl buněčný pelet postupně rozdělen do tří frakcí – membránové proteiny, cytoplasmatické proteiny a frakce obsahující buněčné inkluze. Pro purifikaci rekombinantního Ixocladine 2 byla použita rozpuštěná inkluzní tělíska, kde byl poměr Ixocladine 2 vůči ostatním proteinům výrazně vyšší (obr. 14).



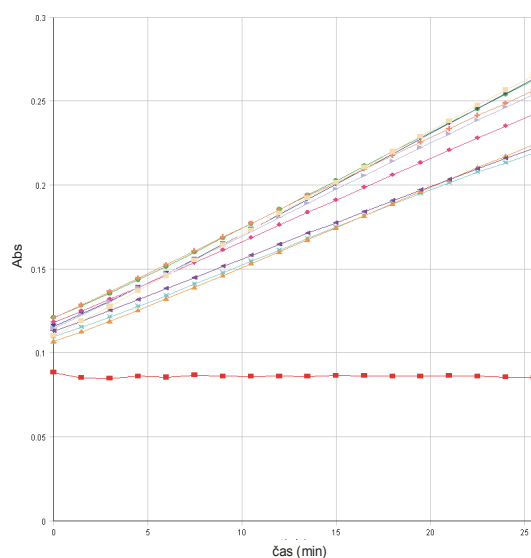
OBR. 14: SDS-PAGE analýza jednotlivých izolačních frakcí
Ve frakci z inkluzních tělísek byl rekombinantní protein exprimován. M – marker, 1 – frakce inkluzních tělísek, 2 – frakce membránová, 3 – frakce cytoplasmatická

Pro purifikaci rekombinantního proteinu byla použita chromatografie na Ni^{2+} chelatační koloně v prostředí 8 M močoviny, protein byl z kolony vymyt zvyšující se koncentrací imidazolu (obr. 15, panel A). Frakce obsahující rekombinantní protein byla po dialýze rechromatografována (obr. 15, panel B), získaný protein o vysoké koncentraci byl refoldován pomocí dilučního refoldingu a byl použit na přípravu protilátek imunizací králíka.



OBR. 15: Chromatografie na Ni^{2+} chelatační koloně analyzována pomocí SDS-PAGE
Panel A: *Ve frakci 2 se podařilo získat větší množství rekombinantního proteinu. ON – vzorek nanesený na kolonu, M – marker, hodnoty uvedeny v kDa, 1. – 3. – jednotlivé jímání frakce, FT – proteiny nezachycené na koloně, 10* ON - vzorek nanesený na kolonu 10krát vyředitelný, ON – vzorek nanesený na kolonu*
Panel B: *Opakovaná chromatografie vzorku obsahující rekombinantní protein. M – marker molekulových hmotností 1. – 5. – jednotlivé jímání frakce, ON – vzorek nanesený na kolonu*

Inhibiční schopnosti Ixoccludinu 2 byly testovány proti trypsinu (obr. 16). Tento test neprokázal očekávanou inhibiční aktivitu rekombinantního proteinu s His-tagem vůči trypsinu. Jako člen rodiny inhibitorů serinových proteáz by měl být schopen trypsin inhibovat, což by ukázal postupný pokles aktivity trypsinu (detekované pomocí substrátu BAPNA) se vzrůstající koncentrací inhibitoru. Podařilo se tedy připravit rekombinantní protein solubilní, nicméně zřejmě neaktivní. To mohlo být způsobeno špatným složením terciální struktury kvůli histidinové kotvě o velikosti 4,1 kDa, jež je ve srovnání s velikostí nativního proteinu (9,4 kDa) poměrně velká.



OBR. 16: Analýza účinnosti inhibitoru v závislosti na jeho koncentraci
 Inhibiční schopnosti rekombinantního Ixoccludinu 2 nebyly prokázány, až + - zvyšující se koncentrace rekombinantního Ixoccludinu 2,
 ◆ - kontrola 1 samotný trypsin),
 ■ - kontrola 2 (bez substrátu)

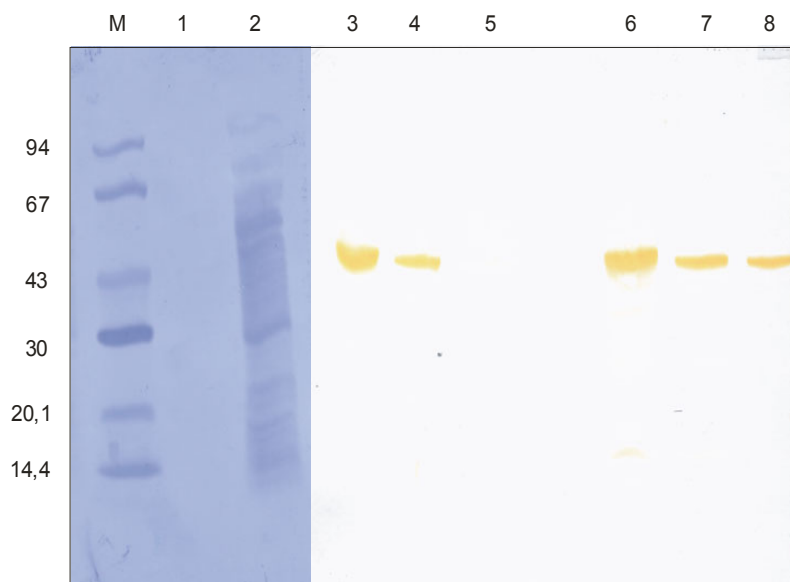
3.4. Identifikace Ixoccludinu 2 ve slinných žlázách a slinách klíštěte *I. ricinus*

S připravenými králičími protilátkami jsme se pokusili ověřit přítomnost nativního Ixoccludinu 2 ve slinných žlázách a slinách klíštěte.

Nejprve jsme se pokusili protein detekovat pomocí metody Western Blot ve slinných žlázách ze samice *I. ricinus*, sající 5 dní na laboratorním morčeti. Připravené protilátky citlivě reagovali na protein o velikosti 57 kDa (obr. 17).

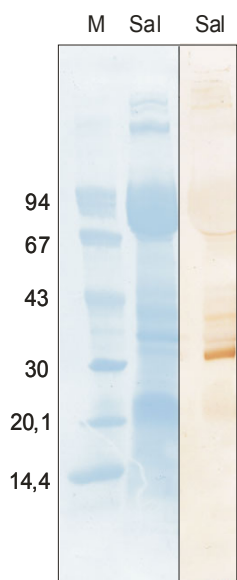
Vzhledem k zhruba 5-ti násobné molekulární hmotnosti jsme se domnívali, že by se mohlo jednat o Penthalaris (Francischetti et al., 2004). Na tento protein, inhibující faktor VIIa ve dráze srážení krve a složený z pěti Kunitzových domén, by mohly protilátky proti Ixoccludinu 2 teoreticky reagovat. Pro ověření této teorie byl protein purifikován na MonoQ koloně a přebílen na PVDF membránu, která byla odeslána do Ústavu Organické chemie a biochemie. Analýza N-terminální sekvence protein jednoznačně identifikovala jako Calreticulin. Všeobecně je tento protein znám jako chaperon endoplazmatického retikula regulující intracelulární homeostázu iontů Ca^{2+} a hrající roli i v embryonálním vývoji

(Michalak et al, 2009). Avšak sekretován má další patogenní a fyziologické funkce – je např. schopen vázat se na složku C1 komplementu a inhibovat jím způsobenou hemolýzu (Schroeder et al, 2009). Důvod, proč na něj reagovaly protilátky proti Ixoccludinu 2, není jasný.



OBR. 17: Detekce Ixoccludinu 2 ve slinných žlázách *I. ricinus* na PVDF membráně
V očekávané velikosti 9,3 kDa nebyl žádný protein protilátkami detekován. Barveno Coomassie Blue: M – marker, hodnoty uvedeny v kDa, 1. – supernatant 10 μ l, 2. – pelet z centrifugovaného homogenátu ze slinných žláz 10 μ l, barveno DAB (Western Blot, primární protilátky Ra x Ix2 1:100): 3.-5. – supernatant v množství 20 μ l, 10 μ l a 5 μ l, 6.-8.- pelet v množství 20 μ l, 10 μ l a 5 μ l na jamku

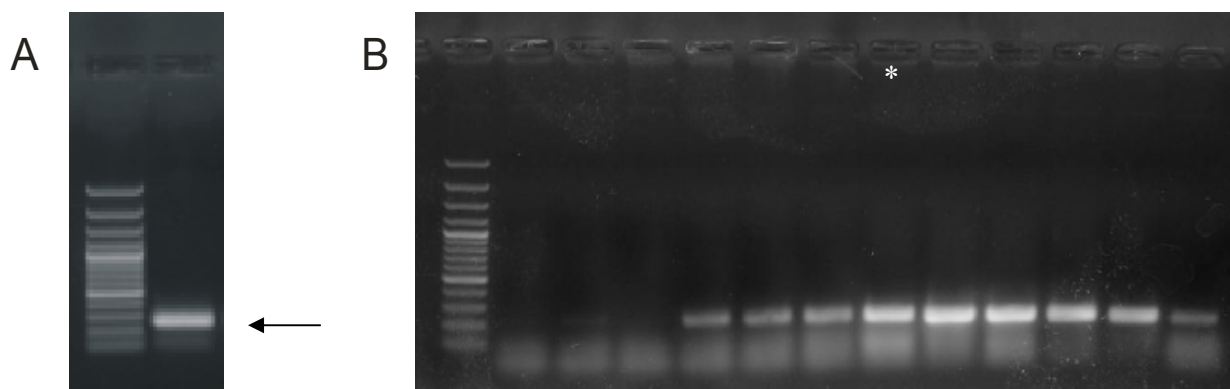
Následně byly pro detekci proteinu použity klíštěcí sliny z 23 samic *I. ricinus* po 5 dnech sání. Na Western blotu reagovaly protilátky pouze na protein o velikosti přibližně 35 kDa, který nebyl blíže identifikován (obr. 18). Důvodem, proč se ani v klíštěcích slinách nepodařilo nativní Ixoccludin 2 detekovat, může být jeho příliš nízká koncentrace.



OBR. 18: Detekce Ixoccludinu 2 ve slinách *I. ricinus* na PVDF membráně
M – marker, hodnoty v kDa
*Sal – sliny klíštěte *I. ricinus* (20 μ l)*
Barveno Coomassie Blue a DAB (Western blot, protilátky Ra x Ix2, 1:100)

3.5. Expres proteinu v bakteriálním systému za použití vektoru pET-17b

Pro expresi proteinu bez histidinové kotvy byl použit plazmidový vektor pET-17b (Novagen). Insert byl vytvořen pomocí PCR amplifikace s gen-specifickými primery Kun2-17b-F a Kun2-17b-R, jako templát pro reakci byla užita cDNA ze slinných žláz klíštěte *I. ricinus* (obr 19). Po restrikci insertu i vektoru (restriktázami XbaI a XhoI, Fermentas), byla provedena ligace (T4 DNA ligase, Invitrogen) a transformace do kompetentních buněk *E. coli* One Shot® TOP 10 (Invitrogen).



OBR. 19: Příprava konstruktů pro expresi rekombinantního proteinu ve vektoru pET 17b
Panel A: PCR amplifikace za použití primeru Kun2-17b-F/R, očekávaná velikost PCR produktu 225 bp

Panel B: Ověření přítomnosti insertu v jednotlivých koloniích, *Ixocladine 2* nalezen v kolonii 7 (označený hvězdičkou)

```

... .ttccctctagacgaagagaacgtcctagg

1 - cgaagagaacgtcctaggatgccgaggagatgtcgtcagcgtccg - 45
   R R E R P R M P R R C R Q R P
46 - ggtgaaggacgatgcagggcctaccttgatgtttacttctataac - 90
   G E G R C R A Y L D V Y F Y N
91 - aacacaaaaaggaggtgccaaaagtttcacgaacgtggttgcccg - 135
   N T K R R C Q K F H E R G C P
136 - ctcgagggaaatggatgggatggaggagtgccgaacgata - 180
   L E G N G F Q D M E E C R T I
181 - tgcgaagataacaggagacgctacaaaccaagccgagaaatga - 225
     C E D N R R R Y K P K P R N *

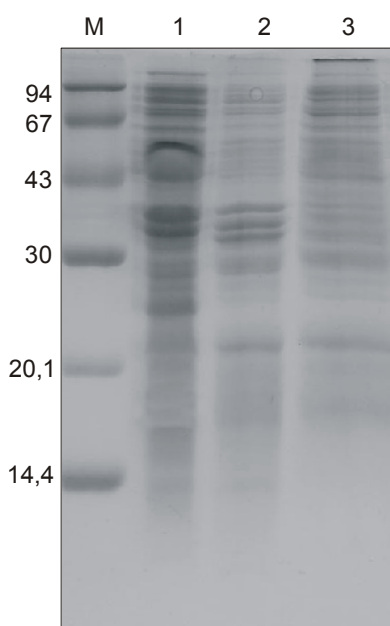
ctcgagcagataaggctggct.....

```

OBR. 20: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence rekombinantního proteinu ve vektoru pET-17b

Start a stop kodon jsou zvýrazněny červeně, tučně jsou označeny primery Kun2-17b-F/R. Sekvence vektoru je vyznačena kurzívou.

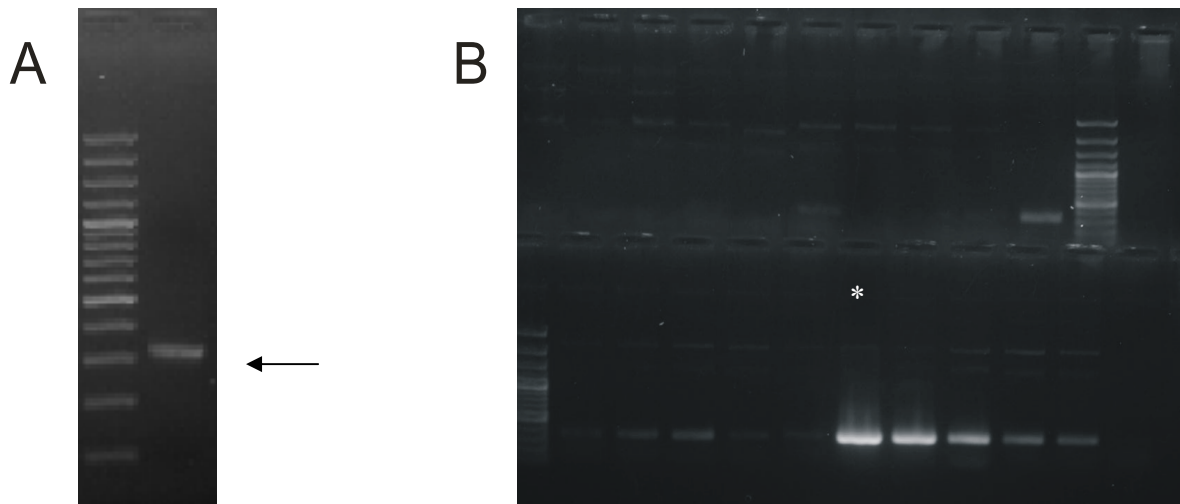
Plazmidový konstrukt (obr. 20) byl transformován do expresních buněk Rosseta-gami™ (DE3) competent cells (Novagen) a BL21 Star™ (DE3) One Shot® Chemically competent *E. coli* (Invitrogen). Bakterie byly kultivovány v LB mediu s glukózou, následně v LB mediu s IPTG. Jednotlivé izolační frakce byly analyzovány metodou SDS-PAGE (obr. 21) a Western blot. Po neúspěšném pokusu o expresi byla nalezena chyba v plazmidovém konstruktu - byly špatně zvoleny restriktázy, které vystřihly i sekvenci kodonu počátečního methioninu z vektoru. Z časových důvodů se ale pokračovalo v přípravě rekombinantního proteinu v eukaryotních expresních systémech.



OBR. 21: SDS-PAGE jednotlivých izolačních frakcí
V žádné frakci nebyl rekombinantní protein velikosti 9.3 kDa prokázán. M – marker, hodnoty v kDa 1. – cytoplasmatické proteiny, 2. – inkluzní tělíska, 3. – membránové proteiny

3.6. Expese proteinu v buňkách křeččích ovarii

Pro další pokus o přípravu aktivního rekombinantního proteinu jsme zvolili eukaryotní expresní systém buněk křeččích ovarii. Pomocí PCR amplifikace byl z cDNA ze slinných žláz amplifikován fragment DNA o velikosti 297 bp (obr. 23). Produkt byl přečištěn a po restrikci (BamHI a AgeI, Fermentas) zaklonován do expresního vektoru pcDNA4™ myc-HIS® A a transformován do kompetentních buněk CHO (Chinese hamster ovary). Rekombinantní protein byl pomocí vlastního signálního peptidu transportován do endoplasmatického retikula a následně sekretován vně buněk.



OBR. 23: Příprava expresního vektoru do buněk křeččích ovarii

Panel A: Pomocí PCR amplifikace se specifickými primery Kun2HAM-S a Kun2HAM-AS byl připraven produkt o velikosti 306 bp

Panel B: Ověření přítomnosti inzertu v jednotlivých koloniích, *Ixocladine 2* nalezen v kolonii 16 (označený hvězdičkou)

```

                ....gacaccgggaaccgatccagcctc
                cggactctagcgtttaacttaagcttggtaccgagtcggatcc

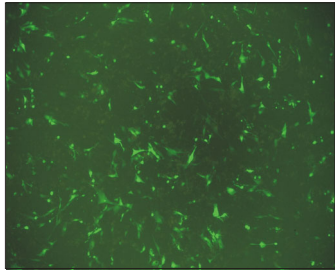
1 - atgaaaccaaaaatgcagttgctcttcgcagtggtccttggtcatt - 45
   M K P K M Q L L F A V A L V I
46 - ttggcatgcatcgtggtggagacagcacgaagagaacgtcctagg - 90
   L A C I V V E T A R R E R P R
91 - atgccgaggagatgtcgtcagcgtccgggtgaaggacgatgcagg - 135
   M P R R C R Q R P G E G R C R
136 - gcctaccttgatggttacttctataacaacacaaaaaggaggtgc - 180
   A Y L D V Y F Y N N T K R R C
181 - caaaagtttcacgaacgtggttgcccgctcgagggaatggattt - 225
   Q K F H E R G C P L E G N G F
226 - tgggatatggaggagtgccgaacgatatgccgaagataacaggaga - 270
   Q D M E E C R T I C E D N R R
271 - cgctacaaaccaaagccgagaaattgaagaagaccggatcatcat - 315
   R Y K P K P R N *
                caccatcaccattgagtttaaacccgct.....

```

OBR. 24: Sekvence *Ixocladinu 2* ve vektoru pcDNA4TM myc-HIS[®] A

Start a stop kodon jsou zvýrazněny červeně, predikovaná signální sekvence peptidu modře. Tučně jsou označeny primery Kun2HAM-S/AS. Kurzívou je vyznačena sekvence vektoru pcDNA4TM myc-HIS[®] A

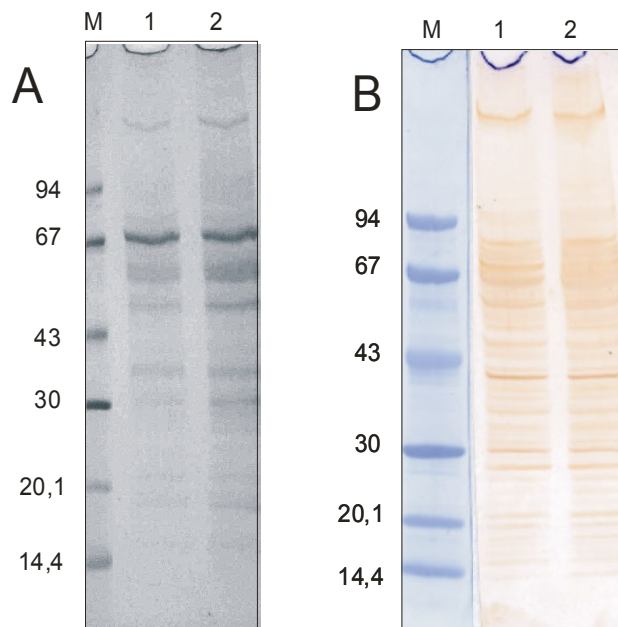
Připravený konstrukt (obr. 24) s inzertem byl transfekován do buněk křeččích ovarii. Jako kontrola úspěšnosti transfekce byl použit vektor s vloženým genem kódujícím protein GFP (Green fluorescent protein).



OBR. 25: Kontrola úspěšnosti transfekce pomocí konstruktů s GFP

Gen kódující GFP byl vložen do buněk křeččích ovarii s úspěšností transfekce přibližně 30-40%

Dva dny po úspěšné transfekci (obr. 25) bylo z kultur odebráno médium, dialyzováno a pro analýzu na akrylamidovém gelu zakoncentrováno pomocí ultrafiltračních zkumavek Amicon (Millipore). Jak je vidět na obr. 26, k expresi rekombinantního proteinu v buňkách a jeho sekreci do média nedošlo, ačkoliv protein GFP se v buňkách exprimoval.



OBR. 26: Analýza média z kultury buněk křeččích ovarii

Přítomnost rekombinantního proteinu v médiu nebyla prokázána.

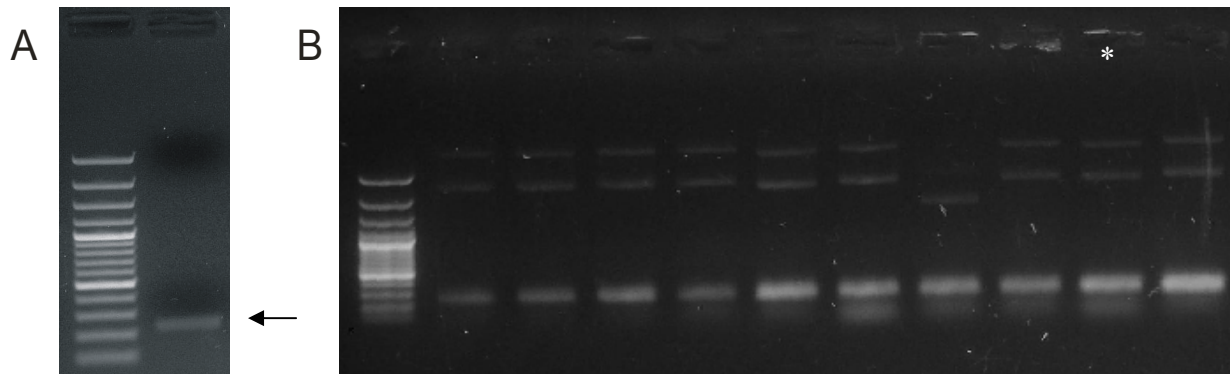
Panel A: SDS-PAGE; M – marker, hodnoty v kDa, **1.** – medium z buněk s inzertem kódujícím *Ixocladine 2.*; **2.** – medium z buněk s inzertem kódujícím GFP

Panel B: Western Blot (primární protilátka Ra x Ix2 1:100): M – marker, hodnoty v kDa, **1.** – medium z buněk s inzertem kódujícím *Ixocladine 2.*; **2.** – medium z buněk s inzertem kódujícím GFP

3.7. Exprese ve kvasinkách

Pro expresi v kvasinkách byl použit vektor pPic2αB (Invitrogen). Při absenci glukózy používá *P. pastoris* jako zdroj uhlíku metanol. AOX promotor kontroluje expresi enzymu alkohol oxidázy, která katalyzuje první krok metabolismu do indukčního média. Tento vektor také obsahuje sekvenci kódující α faktor – sekreční signál, který rekombinantní protein směřuje do růstového média. Pro PCR reakci (primery KunPich-S a KunPich-AS) byla použita cDNA z klíšťat 5 dní krměných na laboratorním morčeti. Po restrikci (XhoI, XbaI; Fermentas) byl PCR produkt (obr. 27) zaligován (TA DNA ligase, Invitrogen) do vektoru pPic2αB (Invitrogen) a transformován do kompetentních buněk *E. coli* One Shot® TOP 10 (Invitrogen)(obr. 28). Ověřený plazmid (obr. 28) byl před elektroporací do *P. pastoris*

linearizován (restriktáza BstX, Fermentas), čímž se jeho prostorová struktura změnila do tvaru kvasinkového chromozomu.



OBR. 27: Příprava konstruktů pro expresi rekombinantního proteinu ve vektoru pPiczaB

Panel A: PCR amplifikace za použití primeru KunPich-S/AS, očekávaná velikost PCR produktu 237 bp

Panel B: Ověření přítomnosti inzertu v jednotlivých koloniích, *Ixocladine 2* nalezen v kolonii 9 (označený hvězdičkou)

```

.....atcaaaaacaactaattatttcgaa
acgatgagatttccttcactttttacagctgttttatttcgcagca
tctccgcattagctgctccagtcacatcaacactacaacagaa
gatgaaacggcacaattccggctgaagctgtcatcggttactca
gatttagaaggggatttcgatttcgatggtgatgtttgccattt
tccaatcgcacaaataacgggttattgtttataaataactactatt
gaaagcattgctgctaaagaagaaggggtatctctcgagaaaaga

1 - cgaagagaacgtcctaggatgccgaggagatgtcgtcagcgtccg - 45
   R R E R P R M P R R C R Q R P
46 - ggtgaaggacgatgcagggcctaccttgatgtttacttctataac - 90
   G E G R C R A Y L D V Y F Y N
91 - aacacaaaaaggaggtgccaaaagtttcacgaacgtggttgcccg - 135
   N T K R R C Q K F H E R G C P
136 - ctcgagggaaatggattttgggatatggaggagtgccgaacgata - 180
   L E G N G F Q D M E E C R T I
181 - tgcgaagataacaggagacgctacaaaccaaagccgagaaatgca - 225
   C E D N R R R Y K P K P R N *
   aagaagtctgtagtctagaacaaaaaactcatctcaga.....

```

OBR. 28: Sekvence *Ixocladinu 2* ve vektoru pPiczaB

Start a stop kodon jsou zvýrazněny červeně, signální sekvence a faktor je vyznačena modře. Primery KunPich-S/AS jsou vyznačeny tučně, sekvence vektoru pPiczaB kurzívou.

Při sekvenování plazmidů klonů rezistentních vůči zeocinu (a po ověření přítomnosti insertu pomocí PCR reakce) bylo nalezeno několik sekvencí dalších vysoce homologních isoformů Ixocladinu 2, patřících do Monolarisů s Kunitzovou doménou a sdílejících strukturu C-X(8)-C-X(15)-C-X(7)-C-X(12)-C-X(3)-C. Aminokyselinové sekvence isoformů jsou uvedeny na obrázku 29. Homologie proteinů Ixocladin 3 - 4 v prvních šesti aminokyselinách může být dána použitím stejných primerů navržených pro Ixocladine 2.

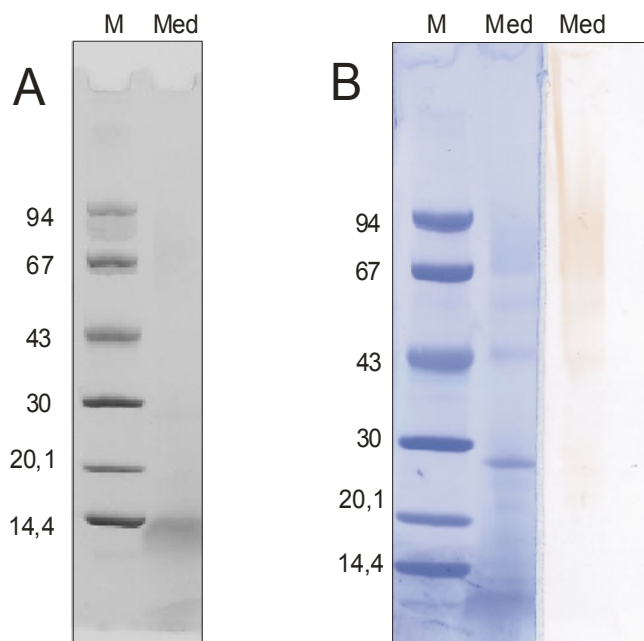
```

Ixocladine 1  1  RKGRPRMPRTIQLQEPGGGRCRASHVILYFYNKTKRRQMSERGCPEGNGFWDMEIDCKTTQEDNRRRYRPKLKN
Ixocladine 2  1  RRERPRMPRRQRQRPGEGRQRAYLDVYFYNTKRRQKFFHERGQFPEGNGFQDMEECRTIQEDNRRRYKPKPRN
Ixocladine 3  1  RRERPRMPRRSRQRPQHGRCRALLDVYFYNTKRRQKFFYKGGPEGNGFSDMEECRTIQEDNRRRYRPKLKN
Ixocladine 4  1  RRERPRMPRRRLRPGQGRQALFDVYFYNTKRRQKFFYQGGPEGNGFSDMEECQTTQEDNRRRYKPKPRN
  
```

OBR. 29: Alignment jednotlivých isoformů Ixocladinu 2

Sekvenací PCR pozitivních klonů při konstruování expresního vektoru byly získány další sekvence isoformů Ixocladinu 2 pojmenované Ixocladine 3-4.

Po elektroporaci expresního plazmidu do kvasinek *P. pastoris* byly tyto vysety na YPD-agarové plotny s antibiotikem (zeocin). Nejlépe rostoucí kolonie byla použita k expresi rekombinantního proteinu, indukované přidáním methanolu do expresního média. Před analýzou na akrylamidovém gelu bylo médium přefiltrováno a zakoncentrováno do objemu 1,5 ml v ultrafiltračních zkumavkách Amicon (Millipore). Přestože analýza metodou SDS-PAGE naznačovala přítomnost rekombinantního proteinu v médiu, protilátkami protein očekávané velikosti (9,4 kDa) detekován nebyl (obr. 30).



OBR. 30: Analýza exprese v systému *P. Pastoris*

Proteinu nebyl do média exprimován.

Med – koncentrované expresní médium

M – marker, hodnoty v kDa

Panel A: SDS-PAGE;

Panel B: PVDF membrána - barveno Coomassie Blue a DAB (Western blot)

4. Diskuze

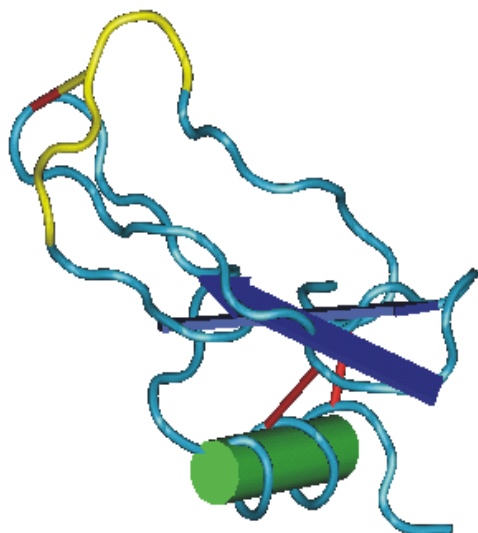
Podnětem této diplomové práce bylo získání části sekvence pro Ixoccludine 2 z cDNA ze slinných žláz *I. ricinus*. Ověřením a doplněním celé sekvence Ixoccludinu 2 jsme ověřili, že patří do skupiny Monolarisů s Kunitzovou doménou společně s dendrotoxiny, bungarotoxiny a blokátory draslíkových kanálů.

Tato skupina se dělí podle sekvenční podobnosti na tři podskupiny (Ribeiro et al., 2005): Monolaris I se strukturou Xn-C-X(5)-C-X(15)-C-X(8)-C-X(11)-C-X(3)-C-Xn , Monolaris II se sekvencí Xn-C-X(8)-C-X(18)-C-X(5)-C-X(12)-C-X(3)-C-Xn , a Monolaris III se sekvencí Xn-C-X(8)-C-X(15)-C-X(7)-C-X(12)-C-X(3)-C-Xn , do které patří i námi nalezené isoformy Ixoccludinů. Všem je společná přítomnost tří disulfidických můstků, spojujících C(1) s C(5), C(2) s C(4) a C(3) s C(6) (obr. 31).

Ix2	RRERPRMERRCRQRPGEGRCRAYDVFYNNTKRRCKEHERGCPFEGNCFQDMEECRTICEDNRRRYKPKPRN	
Kal1	----INKDCLLFMDVGRCRASHFRYYNSSSKRCEKFTYGGCRGNANNFHTLEECVKGVV-----	36.2%
Ves3	----KDLFEICKLEKEPEPCRSYLYFYNSVEHKCQTFHYGGCEGNENRFHTLEECVSTCAE-----	35.6%
coral toxin	---TEEMPALCHLOPDPVKCRGCFYFRYYNPEVGRCEQFTYGGCGGNKNNFVSEACRATC-----IIPL---	32.3%
spider toxin	-----GKDRCLLEKVTCEPKASTTRYYYDKDTRACVEFTYGGCRGNRNNFKRKDECEKACTDH-----	31.0%
snake toxin	----QDRPKFCHLEANPQPCRAITRFYNSDSKQCEKFTYGGCHGNENNFETKDKCHYTCVVGK-----	28.3%
conacun	TLLPKDRPSLCDLEADSSSGTKAEKRIYNSARKQCLREDYTEQGGNENNFRRTYDCQRTCLYT-----	18.8%

OBR. 31: Porovnání Ixoccludinu 2 s toxiny skupiny Monolaris III; procentuální podobnost Ix2 - Ixoccludine 2 (*I. ricinus*), Kal1 - kaliccludine 1 (*Anemonia sulcata*, sasanky) Ves3 – vestiginin (*Demansia vestigata*, hadi), coral toxin – „potassium channel peptide toxin“ (*Stichodactyla haddoni*, korály), spider toxin – „insecticidal toxin from the spider“ (*Araneus ventricosus*, pavouci), snake toxin - „Kunitz/BPTI-like toxin“ (*Austrelaps superbus*, hadi) Concun – Concunitzin (*Conus striatus*, homolice)

Členové rodiny Kunitz/BPTI mají schopnost inhibovat serinové proteázy (Krovarsch et al., 2005). Za inhibici je zodpovědná trojrozměrná struktura tvořící "Trypsin loop" - trypsinovou smyčku (obr. 32). Inhibiční schopnost rekombinantního proteinu byla testována na trypsinu, jedné ze serinových proteáz. Podle získaných výsledků k inhibici nedocházelo, rekombinant nebyl připraven aktivní.

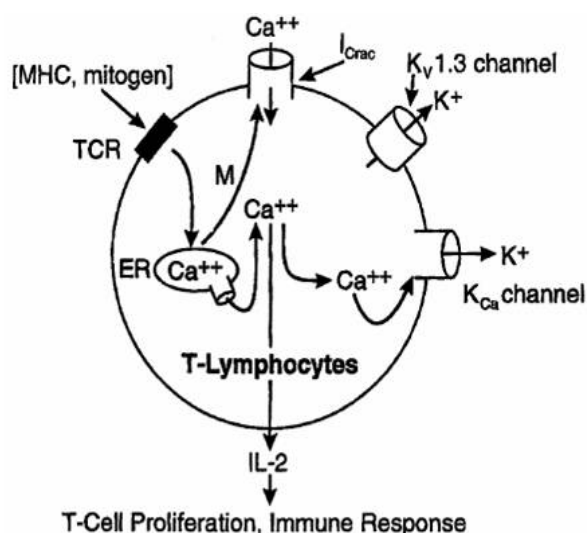


OBR. 32: Terciální struktura Aprotininu z rodiny Kunitz/BPTI inhibitorů (převzato - Zhang et al., 2003)

Zeleným válcem je označena oblast α -šroubovice, modrými šipkami β -skládání list, žlutě **Trypsin inhibition loop** – oblast interagující s proteázami

Kromě schopnosti inhibovat proteázy, se někteří členové této rodiny uplatňují blokací draslíkových kanálů i jako toxiny.

Draslíkové kanály se uplatňují v mnoha různých fyziologických procesech. Draslíkové kanály typu K_v1 , specificky blokované blízkými příbuznými Ixocladine - dendrotoxiny (Rowan, 2001) nebo kaliclidiny (Schweitz et al., 1995), hrají důležitou roli ve fyziologii T-lymfocytů tím, že inhibují jejich proliferaci a snižují produkci cytokinů (obr. 33) (Kem et al., 1999). Někteří členové rodiny Kunitz/BPTI schopní blokovat draslíkové kanály se používají jako alternativní imunosupresiva (Damjanovich et al., 2004).



OBR.33: Iontové kanály na povrchu T-lymfocytů a jejich role v proliferaci a produkci cytokinů (převzato z Kem et al., 1999)

U některých jedů z rodiny Kunitz/BPTI spolupůsobí sekretovaná Fosfolipáza A_2 , která je v případě bungarotoxinů (Rowan, 2001) dokonce spojená disulfidickým můstkem s

podjednotkou Kunitz/BPTI. Fosfolipáza A₂ je schopná vázat Ca²⁺ ionty na neuronových synapsích, toxin z rodiny Kunitz/BPTI pak brání přenosu akčních potenciálů blokací draslíkových kanálů. Aktivita Fosfolipázy A₂ byla popsána v slinách klíštěte *A. americanum* (Bowman et al., 1997), proto je důvod se domnívat, že by tyto dvě molekuly mohly působit společně i v slinách klíštěte.

Příprava rekombinantu v *E. coli* byla úspěšná pouze v případě spojení nativní sekvence proteinu s His- tagem, nicméně tento protein nebyl aktivní. To mohlo být způsobeno špatným složením terciální struktury kvůli histidinové kotvě o velikosti 4,1 kDa, jež je ve srovnání s velikostí nativního proteinu poměrně velká (9,4 kDa).

Během dalších pokusů o expresi v bakteriálním systému bez histidinové kotvy i eukaryotních systémech (buňky křeččích ovarii a *Pichia pastoris*) k expresi již nedošlo.

Molekulárně charakterizované toxiny z rodiny BPTI byly připravovány různě. Kaliccludine (Schweitz et al., 1995) z *Anemone sulcata* byl připraven izolací surového toxinu z jednotlivých sasanek. Konkunitzin (Dy et al., 2006) z *Conus striatus* byl připraven chemickou syntézou dvou zvlášť připravených fragmentů.

Při pokusech o detekci nativního Ixoccludinu 2 v klíštěcích slinných žlázách a slinách nebyl pomocí připravených protilátek protein detekován. Protilátky velmi citlivě reagovaly na Calreticulin, který sekretován do klíštěcích slin je schopen inhibovat způsobenou hemolýzu (Schroeder et al., 2009). Tento protein neobsahuje Kunitzovu doménu, ani žádná jiná sekvenční či strukturní podobnost nebyl nalezena.

Pro další expresi rekombinantního Ixoccludinu 2 by mohl být použit „cell- free“ systém, optimalizovaný pro přípravu toxických či obtížně exprimovatelných proteinů, založený na eukaryotním translačním aparátu pšeničných zrn či lyzátu z králíčích retikulocytů. Dalším expresním systémem je systém baculovirů, kdy se do viru vloží vektorový konstrukt a ten je jím přenesen do hmyzích liniových buněk Sf9 (*Spodoptera frugiperda*). V naší laboratoři se tento osvědčil při přípravě cystatinů – inhibitorů cysteinových proteáz (Salát et al., 2002).

5. Závěr:

Byla získána celá sekvence genu kódujícího Ixocladine 2, proteinu ze slinných žláz klíštěte *I. ricinus*. Tento protein patří do rodiny BPTI – inhibitorů serinových proteáz spolu s toxiny a blokátory draslíkových kanálů. Sekvenčně je protein vysoce podobný toxinu ze sasanky *Anemone sulcata*. Transkripce genu byla pomocí RT-PCR potvrzena pouze ve slinných žlázách, a to pátý den sání klíštěte. Byl připraven rekombinantní protein v bakteriálním expresním systému ve vektoru pET100/D-TOPO[®] a protilátky imunizací králíka. Tento rekombinantní protein byl bohužel neaktivní. Další pokusy o jeho expresi v eukaryotních expresních systémech neuspěly (*P. pastoris*, Chinese hamster ovary). Může to být způsobenou vysokou toxicitou proteinu, jež brání růstu buňkám, jež ho exprimují aktivní (glykosylace, správné složení terciální struktury). Tuto mou hypotézu podporuje i fakt, že připravit se mi podařilo protein podařilo v bakteriálním systému, ve kterém byla na protein (o velikosti 9,3 kDa) navázána histidinová kotva (o velikosti 4,3 kDa), která mohla bránit jeho správnému složení a inhibiční aktivitě.

6. Seznam použité literatury:

- ALJAMALI M., BOWMAN A.S., DILLWITH J.W., TUCKER J.S., YATES G.W., ESSENBERG R.C., SAUER J.R. 2002: Identity and synthesis of prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.), as assessed by radio-immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 331-341.
- BERGMAN D.K., PALMER M.J., CAIMANO M.J., RADOLF J.D., WIKEL S.K. 2000: Isolation and molecular cloning of a secreted immunosuppressant protein from *Dermacentor andersoni* salivary gland. *J. Parasitol.* 83: 516-525.
- BETZ M., FOX B.S. 1991: Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J. Immunol.* 146:108-113.
- BROSSARD M., WIKEL S.K. 1997: Immunology of interactions between ticks and hosts. *Med. Vet. Entomol.* 11: 270-276. Review.
- BOWMAN A.S., GENGLER C.L., SURDICK M.R., ZHU K., ESSENBERG R.C., SAUER J.R., DILLWITH J.W. 1997: A novel phospholipase A2 activity in saliva of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.). *Exp. Parasitol.* 87: 121-132.
- BOWMAN A.S., COONS L.B., NEEDHAM G.R., SAUER J.R. 1997: Tick saliva: recent advances and implications for vector competence. *Med. Vet. Entomol.* 11: 277-285. Review.
- CAMPBELL F., ATWELL R., FENNING A., HOEY A., BROWN L. 2004: Cardiovascular effects of the toxin(s) of the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus*, in the rat. *Toxicon* 43: 743-750.
- DAMJANOVICH S., GASPAR R., PANYI G. 2004: An alternative to conventional immunosuppression: small-molecule inhibitors of kv1.3 channels. *Mol. Interv.* 4: 250-254.
- DICKINSON R.G., O'HAGAN J.E., SCHOTZ M., BINNINGTON K.C., HEGARTY M.P. 1976: Prostaglandin in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 54: 475-486.
- DOYLE D.A., MORAIS CABRAL J., PFUETZNER R.A., KUO A., GULBIS J.M., COHEN S.L., CHAIT B.T., MACKINNON R. 1998: The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77.
- DY C. Y., BUCZEK P., IMPERIAL J. S., BULAJ G., HORWATH M. P. 2006: Structure of conkunitzin-S1, a neurotoxin and Kunitz-fold disulfide variant from cone snail. *Acta Cryst. D62*: 980-990
- EHEBAUER M.T., MANS B.J., GASPAR A.R., NEITZ A.W. 2002: Identification of extrinsic blood coagulation pathway inhibitors from the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp. Parasitol.* 101: 138-148.
- FURMAND, D. AND LOOMIS, E. 1984: The ticks of California (Acari: Ixodida), Berkley, CA: University of California Press.

FRANCISCHETTI I.M., VALENZUELA J.G., ANDERSEN J.F., MATHER T.N., RIBEIRO J.M. 2002: Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 99: 3602-3612.

FRANCISCHETTI I.M., MATHER T.N., RIBEIRO J.M. 2004: Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thromb. Haemost.* 91: 886-898.

FRANCISCHETTI I.M., MY PHAM V., MANS B.J., ANDERSEN J.F., MATHER T.N., LANE R.S., RIBEIRO J.M. 2005: The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 1142-1161.

GORDON J.R., ALLEN J.R. 1991: Factors V and VII anticoagulant activities in the salivary glands of feeding *Dermacentor andersoni* ticks. *J. Parasitol.* 77: 167-170.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

HARVEY A.L. 1997: Recent studies on dendrotoxins and potassium ion channels. *Gen. Pharmacol.* 28: 7-12. Review.

HAWKINS R.I., HELLMANN K. 1966: Factors affecting blood clotting from the tick *Ornithodoros moubata*. *J. Physiol.* 185: 70P

HOCKING B. 1971: Blood-sucking behavior of terrestrial arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 16: 1-26. Review.

HORN F., DOS SANTOS P.C., TERMIGNONI C. 2000: *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Arch. Biochem. Biophys.* 384: 68-73.

CHAMPAGNE D.E. 1994: The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission. *Parasitol. Today.* 10: 430-433.

CHMELARŮ J. 2005: Identifikace imunomodulačních molekul ze slin klíštěte *Ixodes ricinus*. Magisterská práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

IMREDY J.P., MACKINNON R. 2000: Energetic and structural interactions between delta-dendrotoxin and a voltage-gated potassium channel. *J. Mol. Biol.* 296: 1283-1294.

IWANAGA S., OKADA M., ISAWA H., MORITA A., YUDA M., CHINZEI Y. 2003: Identification and characterization of novel salivary thrombin inhibitors from the ixodidae tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Eur. J. Biochem.* 270: 1926-1934.

JONGEJAN F., UILENGERG G. 2004: The global importance of ticks. *Parasitology* 129: Suppl: S3-14.

- JOUBERT A.M., CRAUSE J.C., GASPAR A.R., CLARKE F.C., SPICKETT A.M., NEITZ A.W. 1995: Isolation and characterization of an anticoagulant present in the salivary glands of the bont-legged tick, *Hyalomma truncatum*. Exp. Appl. Acarol. 19: 79-92.
- JOUBERT A.M., LOUW A.I., JOUBERT F., NEITZ A.W. 1998: Cloning, nucleotide sequence and expression of the gene encoding factor Xa inhibitor from the salivary glands of the tick, *Ornithodoros savignyi*. Exp. Appl. Acarol. 22: 603-619.
- KARCZEWSKI J., WAXMAN L., ENDRIS R.G., CONNOLLY T.M. 1995: An inhibitor from the argasid tick *Ornithodoros moubata* of cell adhesion to collagen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 208: 532-541.
- KARCZEWSKI J., ENDRIS R., CONNOLLY T.M. 1999: Disagregin is a fibrinogen receptor antagonist lacking the Arg-Gly-Asp sequence from the tick, *Ornithodoros moubata*. J. Biol. Chem. 269: 6702-6708.
- KELLER P.M., WAXMAN L., ARNOLD B.A., SCHULTZ L.D., CONDRA C., CONNOLLY T.M. 1993: Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation. J. Biol. Chem. 268: 5450-5456.
- KEM W.R., PENNINGTON M.W., NORTON R.S. 1999: Sea anemone toxins as templates for the design of immunosuppressants drugs. Nat. Rev. Drug Discov. 16/17: 111-129.
- KROWARSCH D., ZAKRZEWSKA M., SMALAS A.O., OTLEWSKI J. 2005: Structure-function relationships in serine protease-bovine pancreatic trypsin inhibitor interaction. Protein Pept. Lett. 12: 403-407.
- KOPÁČEK P., WEISE C., GÖTZ P., 1995: The phenoloxidase from the wax moth *Galleria mellonella*: purification and characterization of the proenzyme. Insect Biochem. Mol. Biol. 25: 1081-91.
- KOPÁČEK P., ZDÝCHOVÁ J., YOSHIGA T., WEISE C., RUDENKO N., LAW J.H. 2003: Molecular cloning, expression and isolation of ferritins from two tick species-*Ornithodoros moubata* and *Ixodes ricinus*. Insect Biochem. Mol. Biol. 33: 103-113.
- LABUDA M., JONES L.D., WILLIAMS T., NUTTALL P.A. 1993: Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. Med. Vet. Entomol. 7: 193-196.
- LAI R., TAKEUCHI H., JONCZY J., REES H.H., TURNER P.C. 2004: A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. Gene 342: 243-249.
- LEBOULLE G., CRIPPA M., DECREM Y., MEJRI N., BROSSARD M., BOLLEN A., GODFROID E. 2002: Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. J. Biol. Chem. 277: 10083-10089.
- LEWIS, D. AND YOUNG, E. R. 1980: The transmission of human strain of *Babesia divergens* by *Ixodes ricinus* ticks. J. Parasitol. 66: 359-360
- LYSYK T. J., VEIRA D. M., MAJAK W. 2009: WIS, D. AND YOUNG, E. R. 1980: Cattle can develop immunity to paralysis caused by *Dermacentor andersoni*. J. Med. Entomol 46: 358-66

MANS B.J., COETZEE J., LOUW A.I., GASPAR A.R., NEITZ A.W. 2000: Disaggregation of aggregated platelets by apyrase from the tick, *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). Exp. Appl. Acarol. 24: 271-282.

MANS B.J., LOUW A.I., NEITZ A.W. 2002: Savignygrin, a platelet aggregation inhibitor from the soft tick *Ornithodoros savignyi*, presents the RGD integrin recognition motif on the Kunitz-BPTI fold. J. Biol. Chem. 277: 21371-21378.

MICHALAK M., GROENENDYK J., SZABO E., GOLD L.I., OPAS M. 2009: Calreticulin, a multi-process calcium – buffering chaperone of endoplasmic reticulum. Biochem J. 417(3): 651-666

NARASIMHAN S., KOSKI R.A., BEAULIEU B., ANDERSON J.F., RAMAMOORTHI N., KANTOR F., CAPPELLO M., FIKRIG E. 2002: A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. Insect Mol. Biol. 11: 641-650.

NIENABER J., GASPAR A.R., NEITZ A.W. 1999: Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). Exp. Parasitol. 93: 82-91.

NUTTALL P.A. 1999: Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. Zentralbl Bakteriol. 289: 492-505. Review.

NUTTALL P.A., LABUDA M. 2004: Tick-host interactions: saliva-activated transmission. Parasitology 129: S177-189.

OGDEN, N. H., CASEY, A. N., WONDERHIWET, Z. AND FRENCH, N P. 2003: Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* to *Ixodes ricinus* ticks from sheep in the acute and postacute phases of infection. Infect Immun. 71: 2071-2078

OSWALD R.E., FREEMAN J.A. 1981: Alpha-bungarotoxin binding and central nervous system nicotinic acetylcholine receptors. Neuroscience 6: 1-14. Review.

PETTERSEN E.F., GODDARD T.D., HUANG C.C., COUCH G.S., GREENBLATT D.M., MENG E.C., FERRIN T.E. 2004: UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. J. Comput. Chem. 25: 1605-1612.

PRITCHARD L., DUFTON M.J. 1999: Evolutionary trace analysis of the Kunitz/BPTI family of proteins: functional divergence may have been based on conformational adjustment. J. Mol. Biol. 285:1589-1607.

RAMAMOORTHI N., NARASIMHAN S., PAL U., BAO F., YANG X.F., FISH D., ANGUITA J., NORGARD M.V., KANTOR F.S., ANDERSON J.F., KOSKI R.A., FIKRIG E. 2005: The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. Nature 436: 573-577.

RIBEIRO J.M., MAKOUL G.T., LEVINE J., ROBINSON D.R., SPIELMAN A. 1985: Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. J. Exp. Med. 161: 332-344.

- RIBEIRO J.M., MAKOUL G.T., ROBINSON D.R. 1988: *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. J. Parasitol. 74: 1068-1069.
- RIBEIRO J.M., ENDRIS T.M., ENDRIS R. 1991: Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. Comp. Biochem. Physiol. A. 100: 109-112.
- RIBEIRO J.M., EVANS P.M., MACSWAIN J.L., SAUER J. 1992: *Amblyomma americanum*: characterization of salivary prostaglandins E2 and F2 alpha by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry. Exp. Parasitol. 74: 112-116.
- RIBEIRO J.M. 2005: The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). Insect Biochem. Mol. Biol. 35: 1142-1161.
- RIBEIRO J.M., ALARCON-CHAIDEZ F., FRANCISCHETTI I.M., MANS B.J., MATHER T.N., VALENZUELA J.G., WIKEL S.K. 2006: An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. Insect Biochem. Mol. Biol. 36: 111-129.
- ROWAN E. G. 2001: What does beta-burserotoxin do at the neuromuscular junction? Toxin. 39: 107-118. Review
- SALÁT J., MAJTÁN J., GRUNCLOVÁ L., KOSTYFAKIS M., PERNER J., CHMELARĀ J., ČERNÁ K., PAESEN G., NANN M., 2002: Production of cystsatisins from *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata* in baculovirus expression system. 6th International Conference on Tick and Tick-Borne Pathogens, Buenos Aires, Argentina, Book of Proceedings. P 89
- SCHROEDER H., SKELLY P. J., ZIPFEL P. F., LOSSON B., VANDERPLASSCHEN A. 2009: Subversion of complement by hematophagous parasites. Dev. and Comp. Immun. 33: 5-13
- SCHWEITZ H., BRUHN T., GUILLEMARE E., MOINIER D., LANCELIN J.M., BERESS L., LAZDUNSKI M. 1995: Kalicludines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels. J. Biol. Chem. 270: 25121-25126.
- SONENSHINE D. E., 1993: Biology of tick, Volume 2. Oxford University press, New York.
- VALENZUELA J.G., FRANCISCHETTI I.M., PHAM V.M., GARFIELD M.K., MATHER T.N., RIBEIRO J.M. 2002: Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. J. Exp. Biol. 205: 2843-2864.
- VALENZUELA J.G. 2004: Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. Parasitology 129: S83-94.
- VAN DE LOCHT A., STUBBS M.T., BODE W., FRIEDRICH T., BOLLSCHWEILER C., HOFFKEN W., HUBER R. 1996: The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? EMBO J. 15: 6011-6017.
- VEDANARAYANAN V., SOREY W.H., SUBRAMONY S.H. 2004: Tick paralysis. Semin. Neurol. 24: 181-184. Review.
- WANG X., COONS L.B., TAYLOR D.B., STEVENS S.E. JR., GARTNER T.K. 1996: Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. J. Biol. Chem. 271: 17785-17790.

WAXMAN L., SMITH D.E., ARCURI K.E., VLASUK G.P. 1990: Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science* 248: 593-596.

WIKEL S.K., BERGMAN D. 1997: Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitol. Today*. 13: 383-389.

WIKEL S.K. 1999: Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int. J. Parasitol.* 29: 851-859. Review.

YANOSHITA R., OGAWA Y., MURAYAMA N., OMORI-SATOH T., SAGUCHI K., HIGUCHI S., KHOW O., CHANHOM L., SAMEJIMA Y., SITPRIJA V. 2006: Molecular cloning of the major lethal toxins from two kraits (*Bungarus flaviceps* and *Bungarus candidus*). *Toxicon* 47: 416-424.

ZEIDNER N.S., SCHNEIDER B.S., NUNCIO M.S., GERN L., PIESMAN J. 2002: Coinoculation of *Borrelia spp.* with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific. *J. Parasitol.* 88: 1276-1278.

ZHANG J., MADDEN T.L. 1997: PowerBLAST: A new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. *Genome Res.* 7: 649-656.

ZHANG Z, LINDSTAM M., UNGE J., PETERSON C., LU G. 2003: Potential for dramatic improvement in sequence alignment against structures of remote homologous proteins by extracting structural information from multiple structure alignment. *J. Mol. Biol.* 332: 127-142.

ZHU K., SAUER J.R., BOWMAN A.S., DILLWITH J.W. 1997a: Identification and characterization of anticoagulant activities in the saliva of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.). *J. Parasitol.* 83: 38-43.

ZHU K., BOWMAN A.S., BRIGHAM D.L., ESSENBERG R.C., DILLWITH J.W., SAUER J.R. 1997b: Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). *Exp. Parasitol.* 87: 30-38.