

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Využití technologie cDNA vakcín
pro imunizaci vybranými proteiny
klíštěcích slin**

Diplomová práce

Bc. Karolína Šubrtová

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Jindřich Chmelař

Šubrtová, K. 2009. Využití technologie cDNA vakcín pro imunizaci vybranými proteiny klíštěcích slin. (Immunization against proteins from tick saliva using cDNA vaccine technology) – 69 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Annotation:

The aim of this work was to use the cDNA vaccine technology to raise antibodies against proteins from tick saliva. Four tick saliva proteins of the serpine superfamily and one protein from the Collagen-like secreted proteins family were selected for immunization. Plasmid vectors for cDNA vaccination were prepared and vaccination process was optimized (the immunization dose, scheme of vaccination, antibody detection method, optimal mouse line). Finally the immunological response to cDNA vaccination against individual proteins was tested and results from three different mouse strains were compared.

Abstrakt:

Cílem této práce bylo pomocí cDNA vakcinace získat protilátky proti proteinům klíštěcích slin. Pro imunizaci byly vybrány 4 proteiny ze serpinové rodiny a jeden protein ze skupiny Collagen-like secreted proteins, z jejich cDNA byly připraveny plazmidové konstrukty pro vakcinaci a vakcinační proces byl optimalizován (imunizační dávka, vakcinační schéma, metoda k detekci protilátek a vhodný kmen myší). Nakonec byla testována imunitní odpověď na vakcinaci proti jednotlivým proteinům a výsledky reakcí sér získaných e tří různých myších kmenů byly porovnány.

Tato práce byla financována z grantu č. 590/3034 Grantová agentura České republiky, řešitel doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.

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 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

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. za zadání zajímavého tématu diplomové práce a cenné rady během jejího vypracovávání.

Můj největší dík patří mému školiteli-specialistovi RNDr. Jindrovi Chmelařovi. Děkuji mu nejen za odborné vedení a za všechny revize diplomové práce, ale především za velkou ochotu, trpělivost a vytvoření skvělého pracovního prostředí.

PhD Jiřímu Salátovi a RNDr. Heleně Horké děkuji za pomoc při práci s laboratorními zvířaty. Všem zaměstnancům a studentům laboratoře děkuji za vytvoření příjemné pracovní atmosféry. Rovněž bych chtěla poděkovat celé své rodině za všestrannou podporu a Jiříkovi, protože bez něj by tato práce vůbec nevznikla.

1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1 Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>)	2
2.2 Obrana hostitele, účinky klíštěcích slin a SAT	2
2.2.1 Hemostáze	3
2.2.1.1 Antihemostatické molekuly klíštěcích slin	4
2.2.2 Imunitní odpověď proti klíšťatům a imunomodulační účinky klíštěcích slin.....	5
2.2.2.1 Nespecifická imunitní odpověď	6
2.2.2.2 Specifická imunitní odpověď	6
2.2.3. Slinami aktivovaný přenos	8
2.3 Identifikace proteinů z klíštěcích slin a protiklíštěcí vakcína	9
2.3.1 Vakcinace skrytými a exponovanými antigeny.....	10
2.3.2 Proteinová nadrodina serpinů.....	11
2.3.3 Budoucnost protiklíštěcích vakcín.....	12
2.4 DNA vakcíny.....	13
2.4.1 Odpověď imunitního systému na DNA vakcinaci.....	14
2.4.2 Imunizace expresní knihovnou.....	15
3. Cíle práce:	18
4. Materiál a metody	19
4.1 Příprava DNA vakcín.....	19
4.1.1 Konstrukce cDNA vakcín	19
4.1.2 PCR amplifikace vybraných cDNA.....	20
4.1.3 Izolace PCR produktů kitem JETQUICK Gel Extraction Spin Kit (Genomed)	20
4.1.4 Ligace produktů PCR do plazmidu VR2001	21
4.1.5 Izolace pozitivních klonů <i>E.coli</i> transformovaných plazmidovou DNA.....	21
4.1.6 Izolace plazmidů kitem JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed).....	22
4.1.7 Izolace plazmidů kitem JETSTAR 2.0 Plasmid Maxi LFU Plasmid Purification Kit (Genomed).....	22
4.1.8 Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test QCL-1000 (Cambrex)	23
4.2 Získávání klíštěcích slin.....	24
4.2.1 Měření koncentrace proteinu metodou podle Bradfordové	24
4.3 Vakcinace myší	24
4.4 Získávání myších sér	25

4.5 Příprava rekombinantních proteinů	25
4.5.1 Příprava rekombinantních proteinů v CHO buňkách	25
4.5.2 Exprese rekombinantních proteinů v bakteriálním systému	26
4.6 Testování imunity vyvolané cDNA vakcínami	26
4.6.1 Western blot	26
4.6.2 Nepřímá ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay).....	28
4.7 Statistické zhodnocení naměřených dat	29
5. Výsledky	30
5.1 Příprava cDNA vakcín.....	30
5.1.1 Příprava konstruktů pro cDNA vakcinaci.....	30
5.1.2 Příprava jednotlivých cDNA vakcín.....	32
5.2. Vakcinování myší.....	34
5.2.1 Imunizace vacC14, vacIRS-1 a vacGFP	34
5.2.2 Imunizace vacIRS-1, vacIRS-2, vacIRS-4 , vacIRS-8 a vacVR2001	35
5.3 Testování imunity vyvolané cDNA vakcínami	35
5.3.1 Vakcinace myší CD-1 a BALB/c - metoda Western blot	35
5.3.2 Vakcinace myší CD-1, C3H/HeN, C57BL/6	36
5.3.2.1 Výsledky vakcinace myší kmene CD-1	37
5.3.2.2 Výsledky vakcinace myší kmene C3H/HeN.....	41
5.3.2.3 Vakcinace myší C57BL/6	43
6. Diskuze.....	47
6.1 Příprava cDNA vakcín.....	47
6.1.2 Kandidáti pro cDNA vakcinaci	48
6.2 Injikace klíštěcích slin	49
6.3 Optimalizace procesu cDNA vakcinace	50
6.4 Testování imunitní odpovědi vyvolané cDNA vakcínou	51
6.5 Výsledky imunizace serpinovými cDNA vakcínami	52
6.5.1 Porovnání výsledků reakcí sér kmenů CD-1, C3H/HeN a C57BL/6	53
7. Souhrn.....	54
8. Citovaná literatura.....	55
Příloha 1 Sekvence použitých genů	64
Příloha 2 Sekvence použitých primerů.....	67

1. Úvod

V posledních desetiletích přispělo detailní studium hematofágních členovců nejen k odhalení nových biologických zákonitostí, ale i k objevu některých farmakologicky účinných látek. Rozvoj nových experimentálních metod umožnil dokonce charakterizaci některých konkrétních molekul, které se podílí na interakci parazitů s hostiteli a přenášenými patogeny (Chmelař a spol., 2008).

Hostitelé krevsajících klíšťat přicházejí do kontaktu především s ústním ústrojím a slinami těchto členovců, a proteiny slin a další obdobné látky (např. cement) jsou tedy hlavními antigeny v imunitní odpovědi hostitele. Hematofágové si jako obranu před imunitními a hemokoagulačními mechanismy hostitele vyvinuli mnoho různých faktorů a jejich sliny jsou směsí molekul s protizánětlivými, imunosupresivními a antihemostatickými účinky (Gillespie a spol., 2000).

Proteomické, molekulárně biologické a bioinformatické metody nám umožňují tyto látky lépe prozkoumat, charakterizovat a případně dále farmakologicky využít. Například imunosupresivní protein klíštěte *Ixodes scapularis* Salp15 byl identifikován jako tzv. SAT (Saliva activated transmission) faktor, který usnadňuje přenos bakterie *Borrelia burgdorferi* ze sajícího klíštěte do hostitele (Ramamoorthi a spol., 2005). U molekuly Salp15 bylo prokázáno selektivní inhibiční působení na hostitelovy T lymfocyty, což by mohlo být využito v případech, kdy je tato imunosuprese potřebná (například při alogenních transplantacích) (Motameni a spol., 2004). Popsané účinky nově objeveného proteinu byly již dokonce využity k úspěšnému potlačení experimentálně vyvolaného alergického astmatu u myši (Paveglio a spol., 2007).

Výzkum celých sialomů (transkriptomů ze slinných žláz) klíšťat poskytuje tedy bohatý zdroj nových potenciálně farmakologicky využitelných molekul. Sialomové projekty byly vypracovány na klíštěti *Amblyomma variegatum* (Nene a spol., 2002), *Ixodes scapularis* (Valenzuela a spol., 2002; Ribeiro a spol., 2006), *Ixodes pacificus* (Francischetti a spol., 2005) a *Dermacentor andersoni* (Alarcon-Chaidez a spol., 2007).

Má magisterská práce navazuje na projekt, který poprvé zmapoval transkriptom slinných žláz evropského klíštěte *Ixodes ricinus* (Chmelař a spol., 2008). Cílem práce byla optimalizace nové metody cDNA vakcinace, kterou by bylo možné získat protilátky proti proteinům klíštěcích slin využitelné pro další výzkum získaného unikátního souboru genů Laboratoře interakcí vektor-hostitel.

2. Literární přehled

2.1 Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

Nejběžnějším zástupcem čeledi Ixodidae v České republice je klíště obecné (*Ixodes ricinus*). Je to krevsající ektoparazit suchozemských obratlovců, patří mezi tzv. tvrdá klíšťata do řádu Ixodida (Metastigmata). Vyskytuje se v mírném pásu po celé Evropě na pastvinách, vlhkých loukách a v křovinách až do nadmořské výšky 1100 m. n. m. (Materna a spol., 2008).

Ixodes ricinus má tři vývojová stádia - larvu, nymfu a dospělé, každé stádium parazituje na jiném hostiteli a musí nasát dostatečné množství krve, aby mohlo úspěšně pokračovat ve vývoji. Larva a nymfa tedy pokročí k vyššímu vývojovému stádiu, dostatečně nasátá dospělá samice klade vajíčka (až několik tisíc). Po vykladení vajíček dospělec umírá. Celý životní cyklus klíštěte trvá 2-3 roky, ale za nepříznivých vnějších podmínek se může prodloužit i na 6 let (Gardiner a Gettinby, 1981). Na člověku parazitují hlavně dospělci a nymfy, kteří na něj během sání mohou přenést řadu závažných onemocnění; jedná se o zoonózy jako je lymeská borelióza, klíšťová encefalitida, erlichioza a další. Klíště se většinou nakazí v larválním stádiu sáním na infikovaných hlodavcích či ptácích (Gray a spol., 1999; Olsén a spol., 1995) a takto získaný patogen se následně s klíštěcími slinami dostává do obratlovce.

Vzájemné interakce mezi klíštětem (vektorem), hostitelem a patogenem tedy tvoří trojúhelník, ve kterém je každá strana ovlivněna zbývajícími dvěma členy. Při sání klíštěte je patogen přenášen z klíštěte do hostitele, hostitel si vyvíjí mechanismy k odvrhnutí sajícího klíštěte, a klíště se těmto obranným hostitelským mechanismům brání (Nuttall, 1998).

2.2 Obrana hostitele, účinky klíštěcích slin a SAT

Sání klíštěte na hostiteli je dlouhodobý (3 až 10 dní) a komplexní proces. Po nalezení vhodného místa se ektoparazit přichytí pomocí hypostomu v kůži hostitele. Už od počátku sání sekretuje klíště ze slinných žláz tzv. cement, který slouží k ukotvení v tkáních napadeného obratlovce, a sliny obsahující mnoho farmakologicky aktivních molekul (Kaufman, 1989; Gillespie a spol., 2000). Obratlovci se hematofágním členovcům brání třemi účinnými systémy: hemostází, zánětem a specifickou imunitní odpovědí.

2.2.1 Hemostáze

K hemostázi dochází u hostitele brzy po přisátí klíštěte. Tento proces sloužící k zastavení krvácení je odstartován narušením cév. Skládá se ze tří souvisejících částí: vazokonstrikce, koagulační kaskády a agregace a degranulace krevních destiček (Law a spol., 1992; Ribeiro a Francischetti, 2003).

Konstrikce cév je krátkodobý, ale významný děj, který v postižené oblasti zpomaluje průtok krve. Navíc zúžení cévy stlačí protilehlé endotelové výstelky cév proti sobě, a to způsobí že k sobě přilnou. Vazokonstrikce a přilnutí stěn cév je nicméně účinné po delší dobu pouze v úplně nejmenších cévách mikrocirkulace. Spolehlivá zástava krvácení je především úkolem dvou zbývajících procesů: koagulace krve a tvorby destičkové zátky (Windmaier a spol., 2006).

Koagulační kaskáda může být spuštěna vnitřní i vnější aktivační cestou. Vnější cesta koagulace je aktivována při kontaktu krve s tkáňovým faktorem (TF, tkáňový tromboplastin), proteinem obsaženým v membráně buněk cévní stěny, který se uvolňuje při jejím poškození. Oproti tomu prvním krokem vnitřní dráhy koagulační kaskády je aktivace faktoru XII, ke které dochází kontaktem s určitým typem povrchu (vlákna kolagenu uvolněná při porušení cévního endotelu) (Law a spol., 1992; Windmaier a spol., 2006).

Oba typy aktivace jsou na sobě nezávislé, přesto ale obě dvě cesty vedou ke štěpení faktoru X na faktor Xa, klíčovou molekulu nezbytnou k úspěšnému srážení krve. Serinová proteáza faktor Xa totiž přeměňuje protrombin na trombin, enzym, který štěpí fibrinogen na fibrin. Molekuly fibrinu tvoří síť, na kterou se váží další krevní komponenty (destičky). Na konci celého procesu vzniká sraženina, která uzavírá místo poranění (Law a spol., 1992; Windmaier a spol., 2006).

Primárním a nejrychlejším mechanismem k uzavření poškození cévní stěny je však agregace a degranulace destiček. Tento děj může být opět zprostředkován třemi různými způsoby: přes kolagen, trombin a ADP (adenosin difosfát). Poškození cévní stěny narušuje endotel a z pojivové tkáně je tak uvolňován kolagen. Destičky se váží na kolagen prostřednictvím von Willebrandova faktoru. Vazba destičky-kolagen spouští v krevních destičkách degranulaci jejich sekrečních vezikul a navíc dochází k syntéze nových efektorových molekul. Z destiček se tak uvolňuje několik aktivních látek, mezi nimi ADP, serotonin a tromboxan A₂. Tromboxan A₂ a serotonin způsobují vazokonstrikci cév. Ostatní molekuly, především ADP a trombin (který je produktem koagulační kaskády) aktivují další destičky a působí jako mediátory agregace, při které nové adherují na původní a rychle tak vzniká destičková zátka (Law a spol., 1992; Windmaier a spol., 2006).

Všechny tři části procesu hemostáze jsou tedy vlastně vzájemně propojené, molekuly vzniklé v rámci jednoho procesu působí na další složku. V organismu je však nutné nejen hemostázi rychle odstartovat a bezchybně provést, ale také je nutná její inhibice, jinak by se sraženina mohla rozšiřovat i do nepoškozených míst. Proto v tomto komplexním procesu vznikají i molekuly s inhibiční funkcí. PGI₂ (prostaglandin I₂) a NO (oxid dusnatý) jsou produkovány buňkami endotelu a přímo inhibují funkce destiček, čímž podstatně zmenšují rozsah celé sraženiny. K nim se ještě připojuje inhibice tkáňového faktoru, inhibice proteinem C a antitrombinem III. Po ukončeném hemostatickém procesu je pak samotná sraženina rozložena fibrinolytickým systémem (Windmaier a spol., 2006).

2.2.2.1 Antihemostatické molekuly klíštěcích slin

Klíšťata si vyvinula široké spektrum antihemostatických opatření, která jsou nezbytná pro úspěšné sání na hostiteli a v podstatě tedy pro samotné přežití krevsajícího členovce (Maritz-Olivier a spol., 2007). Krev hostitele musí zůstat tekutá a to nejen v místě sání, ale i v ústním ústrojí a ve střevech klíštěte (Bowman a spol., 1997). Ve slinách klíšťat byly objeveny molekuly s vazodilatačními účinky, inhibitory agregace destiček i antikoagulanty. Stejně jako hemostáze obratlovců, i antihemostatika klíštěcích slin tvoří redundatní a komplexní systém (Law a spol., 1992), a tak není jednoduché tyto molekuly přesně rozdělit do funkčních skupin, protože jejich účinky jsou často pleiotropní.

Příkladem mohou být proteiny z antitrombinovou aktivitou, které následkem jeho inhibice zamezují i agregaci destiček (viz. dále). Do roku 2007 bylo identifikováno 17 klíštěcích molekul, které nějakým způsobem funkci trombinu (klíčového enzymu hemostázy) narušují. Názvy těchto účinných molekul jsou většinou odvozeny od druhového označení klíštěte, ve kterém byly detekovány: ornithodorin, amblin, boophilin, savignin a další (Maritz-Olivier a spol., 2007).

Vazodilatátory hematofágních členovců nejenže rozšiřují cévy, ale navíc i zvyšují průtok krve v místě sání, a tak ho vlastně urychlují (Champagne, 1994). Ve slinách klíšťat skupiny Ixodidae byly detekovány vysoké koncentrace prostaglandinů (PGE₂, PGF_{2α}, PGI₂), u kterých byly prokázány nejen účinky vazodilatační, ale rovněž inhibiční vliv na agregaci destiček (Champagne, 1994, Bowman a spol., 1997). U PGE₂ byly také zkoumány účinky na specifickou imunitu hostitele (Gillespie a spol., 2000).

Látky z klíštěcích slin jsou zaměřeny i proti koagulační kaskádě. Vnitřní cesta koagulační kaskády je klíšťaty inhibována pomocí proteinů patřících mezi tzv. Kunitz-serpiny.

Mezi tyto molekuly patří BmTI-A (*Boophilus microplus* trypsin inhibitor A), RsTIQ2 (*Rhipicephalus sanguineus* trypsin inhibitor Q2), působící na systém kallikrein-kinin (Tanaka a spol., 1999; Azzolini, 2003) a také haemaphysalin (z *Haemaphysalis longicornis*), který inhibuje vzájemnou aktivaci kallikreinu a faktoru XIIa (Kato a spol., 2005).

Jak bylo již zmíněno, klíčovou molekulou vnější i vnitřní cesty koagulační kaskády je faktor Xa (u kterého se právě obě dráhy sbíhají), a tato serinová proteáza tak vytváří pro klíšťata atraktivní cíl k inhibici celého koagulačního procesu. Dosud byly u klíšťat objeveny například FX inhibitor Ixolaris; TF inhibitor Pethalaris (TFPI, tissue factor pathway inhibitor), který inhibuje komplex faktoru VIIa a tkáňového faktoru; FXa inhibitory Salp14 a zatím nejlépe charakterizovaný TAP (tick anticoagulant peptide) z klíšťáka *Ornithodoros moubata*. Mnoho klíštěcích antikoagulačních molekul strukturně patří mezi inhibitory serinových proteáz s Kunitzovou doménou (Maritz-Olivier a spol., 2007).

Pro sajícího hematofága je obzvláště důležité zablokovat funkce destiček, protože nástup jejich účinku je velice rychlý. U všech dosud zkoumaných hematofágních členovců včetně klíšťat byl objeven enzym apyráza (ADP/ATP difosfohydroláza), který odstraňuje ADP (ATP) z místa sání a zabraňuje tak agregaci destiček (Champagne 1994; Champagne 2005). V klíštěcích slinách byly objeveny mimo prostaglandinů a apyrázy i jiné molekuly s podobným účinkem. U klíštěte *Ornithodoros moubata* moubatin, disagregin a TAI (Tick adhesion inhibitor) a u *Dermacentor variabilis* variabilin (Bowman a spol., 1997), *Ornithodoros savignyi* savignygrin (Mans a spol., 2002) a savignin (Nienaber a spol., 1999).

2.2.2 Imunitní odpověď proti klíšťatům a imunomodulační účinky klíštěcích slin

Klíšťata rodu *Ixodes* potřebují oproti většině krevsajících členovců sát delší dobu (3-10 dní), aby se nasála dostatečně (Gillespie a spol., 2000). Výsledkem toho je, že klíšťata musí čelit také specifické imunitní odpovědi hostitele. Tato odpověď může mít za následek snížení množství krve nasáté klíštětem, snížení jeho plodnosti, může ovlivnit svlékání, a nakonec způsobit jeho předčasné odpadnutí. Klíště tak může zahynout vyhladověním a vyschnutím (Wikel, 1996; Gillespie a spol., 2000). Obecně lze hostitele rozdělit na přirozené, kteří nejsou schopni klíště odvrhnout, a nepřirozené, kteří toho schopni jsou. Imunitní reakce nepřirozeného hostitele může být jak nespecifická (Wheeler a spol., 1989) tak i specifická (Brossard a Fivaz, 1982) a je zaměřena proti antigenům slin (Wikel, 1984).

Přestože byl již popsán rozvoj rezistence i u přirozeného hostitele (Dizij a Kurtenbach, 1995), převládá hypotéza, že v přirozených podmínkách došlo k jisté koevoluci klíšťat, hostitelů a klíšťaty přenášených patogenů a tento proces by mohl být z části řízen vývojem imunopresivních faktorů klíštěcích slin (Gillespie a spol., 2000).

2.2.2.1 Nespecifická imunitní odpověď

Na místě přichycení ektoparazita vzniká v důsledku mechanického narušení tkání lokalizovaná zánětlivá odpověď (Brossard a Fivaz, 1982), která se typicky projevuje bolestí, otokem, zvýšenou teplotou a zarudnutím. Na místo sání infiltrují neutrofilové, monocytové, makrofágové, bazofilové a eosinofilové (Kovář, 2004). Z hostitelových buněk a tkání jsou uvolňovány mediátory hemostázy a zánětu jako je ATP, histamin, serotonin a bradykinin (Ribeiro, 1989). Histamin a serotonin inhibují sání, histamin může způsobit až odpadnutí klíštěte z hostitele (Paine a spol., 1983). Dochází i aktivaci komplementu alternativní cestou a uvolnění anafylatoxinů, které dále stimulují imunitní buňky (Ribeiro, 1987).

U většiny hostitelských buněk a efektorových molekul, které se podílejí na nespecifické imunitní odpovědi proti sajícímu hematofágovi, byla pozorována jejich inhibice nějakým klíštěcím faktorem. Ze slin byly popsány například histamin vázající proteiny (Paesen a spol., 1999), inhibitory komplementu (inhibují aktivaci komplementu alternativní cestou) (Ribeiro, 1987; Valenzuela a spol., 2000), inaktivátory anafylatoxinu (Ribeiro a Spielman, 1986) a karboxypeptidáza štěpící bradykinin (Ribeiro a Mather, 1998). Byla pozorována inhibice různých funkcí neutrofilů (Ribeiro a spol., 1990). U makrofágů potom snížená produkce NO a prozánětlivých cytokinů (Ramachandra a Wikel, 1992; Urioste a spol., 1994; Kopecký a Kuthejlová, 1998) a potlačení cytotoxického účinku NK (natural killer cells) buněk (Kopecký a Kuthejlová, 1998).

Klíště tedy ve výsledku může potlačit bolest a svědění varující hostitele a celkově snížit infiltraci efektorových buněk na místo sání (Ribeiro a Mather, 1998; Kovář, 2004).

2.2.2.2 Specifická imunitní odpověď

Specifická imunitní odpověď hostitele začíná v lokálních mízních uzlinách prezentací klíštěcích antigenů Langerhansovými buňkami T lymfocytům (Allen a spol., 1979). Následně dochází ke vzniku cytotoxických Tc a pomocných Th lymfocytů, Th lymfocyty se diferencují na subpopulace Th1 a Th2, které se odlišují produkcí cytokinů (Mosmann a Coffman, 1989).

Účinnou odpovědí proti sání klíštěte je tzv. kožní bazofilní hypersenzitivita, forma DTH reakce (oddáleného typu přecitlivělosti) která je zprostředkovávána Th1 subpopulací (Allen, 1973). Th1 lymfocyty produkují IL (interleukin)-2, IL-3, IFN (interferon)- γ a TNF (Tumor necrosis factor)- α (Mosmann a Coffman, 1989). Produkované chemokiny následně přitahují další imunitní buňky jakými jsou neutrofilny, monocyty, makrofágy, eozinofily a bazofily. V místě sání dochází k zánětlivé reakci a k produkci protilátek IgG a IgE (Brown, 1985), které senzibilizují infiltrované bazofily a lokální žírné buňky. Degranulací aktivovaných buněk jsou uvolňovány efektorové molekuly jako je např. histamin a serotonin.

K obranné reakci proti klíšťatům rovněž přispívá aktivace komplementu klasickou cestou cirkulujícími imunokomplexy. Komplementová složka C5a je chemotaktickým faktorem pro monocyty, makrofágy a další bazofily (Gordon a Allen, 1991).

Kromě inhibice nespecifických imunitních složek a efektorových buněk popsané výše, je klíště schopné ovlivňovat i získanou specifickou obranu hostitele. Složky klíštěcích slin ovlivňují migraci dendritických buněk (Oliveira a spol., 2009), snižují humorální odpověď lymfocytů B (Fivaz, 1989; Wikel, 1985) i proliferaci T lymfocytů po aktivaci mitogenem (Ribeiro a spol., 1985; Ramachandra a Wikel, 1992). Někteří autoři připisovali tuto funkci prostaglandinu PGE₂, ale existují práce, které tento názor zase vyvracejí. Například u klíštěte *Dermacentor andersoni* byl objeven glykoprotein Da-p36 inhibující proliferaci T lymfocytů stimulovaných konkalininem A, ale jeho přesný imunopresivní mechanismus nebyl dosud objasněn (Bergman a spol., 2000).

Ve slinách klíšťat byly dále objeveny imunoglobuliny vázající proteiny (IGBP, IgG binding proteins), ale tyto látky slouží pravděpodobně spíše pro ochranu samotného parazita před poškozením jeho orgánů hostitelovými protilátkami, které se dostávají do střev sajícího členovce spolu s hostitelovou krví (Wang a Nuttall, 1994).

U různých klíšťat bylo rovněž pozorováno ovlivnění profilu sekretovaných hostitelských cytokinů (Gillespie a spol., 2000). Zdá se, že klíště má schopnost modulovat imunitní reakci od Th1 lymfocytové odpovědi (vedoucí k DTH a odvrhnutí sajícího ektoparazita) směrem k méně účinné Th2 (Kopecký a spol., 1999). Byla popsána inhibice Th1 a dalších prozánětlivých cytokinů (produkovaných makrofágy) jako jsou IL-2, IL-6, IL-8, IFN- γ a TNF- α a naopak vzrůst produkce Th2 cytokinu IL-4, který potlačuje proliferaci Th1 subpopulace. V případě dalšího Th2 cytokinu IL-10 nejsou výsledky tak jasné, byl popsán jak nárůst tak i pokles jeho produkce (Ribeiro a spol., 1985; Christie a spol., 1996, Ramachandra a Wikel, 1992).

Jedním z faktorů odpovědných za posun cytokinové exprese a celkové inhibice proliferace lymfocytů by mohl být protein izolovaný z klíštěte *Ixodes ricinus* nazvaný Iris (*Ixodes ricinus* immunosuppressor), u kterého byla prokázána inhibice produkce IL-6, IFN- γ a TNF- α (Leboulle a spol., 2002). Další zajímavou molekulou je Salp15 inhibující proliferaci Th (CD4+) lymfocytů. Díky tomuto proteinu je celkový vývoj Th buněčné odpovědi hostitele zpomalen a produkce IL-2 se snižuje (Anguita a spol., 2002). Klíště navíc ještě produkuje IL-2 vázající proteiny, a tak je specifická imunitní obrana hostitele významně potlačována (Gillespie a spol., 2001).

2.2.3. Slinami aktivovaný přenos

Výše popsany imunoaktivní protein Salp15 byl první konkrétní molekulou, u které byla prokázána účast na fenoménu SAT. Slinami aktivovaný přenos (saliva activated transmission, SAT) byl objeven v roce 1989 na arboviru Thogoto. Tento jev je charakterizován tím, že přenášené patogeny využívají imunomodulačních účinků klíštěcích slin (Jones a spol., 1989).

V experimentu, kde byl tento virus injikován do morčat společně s extraktem ze slinných žláz (salivary gland extract, SGE) neinfikovaných klíšťat, se infikovalo desetkrát více klíšťat sajících na těchto zvířatech v porovnání s klíšťaty, která sála na zvířatech bez injikovaného SGE. Pokud dochází k SAT efektu, nemusí být splněna podmínka vysoké parazitémie hostitele, aby došlo k přenosu patogenů mezi klíšťaty sajícími společně na hostiteli (Jones a spol., 1992). K přenosu patogena může dojít dokonce i v případě, že je hostitel vůči němu imunní (Labuda a spol., 1997).

SAT byl prokázán u dalších patogenů přenášených klíšťaty, například u viru klíšťové encefalitidy (Labuda a spol., 1993) a u bakterie *Anaplasma phagocytophilum* (Ogden a spol., 2002). Z klíštěcích slin bylo popsáno mnoho faktorů ovlivňujících obranné mechanismy hostitele, poměrně dlouhou dobu ale nebyl znám žádný konkrétní SAT faktor, který by přímo zvýhodňoval přenášeného patogena.

Průlomový protein Salp15 byl izolován v roce 2005 z klíštěte *Ixodes scapularis*. Bylo prokázáno, že tato molekula je indukována ve slinách klíštěte boreliovou infekcí, váže se na povrch bakterie *Borelia burgdorferi*, a tím ji před imunitou hostitele chrání (Ramamoorthi a spol., 2005).

2.3 Identifikace proteinů z klíštěcích slin a protiklíštěcí vakcína

S rozvojem nových molekulárních metod v posledních letech se parazitologický výzkum posunul ze zkoumání farmakologických účinků klíštěcích slin na popis jednotlivých molekul. Oproti klasickému proteomickému přístupu, při kterém je postupováno od proteinu ke genu, se začal prosazovat nový high-throughput přístup, využívající postup od genu k proteinu. Tato metoda kombinuje rozsáhlé sekvenování vysoce kvalitních full-length cDNA knihoven slinných žláz, izolaci genů kódujících sekretované proteiny a bioinformatické zpracování jejich sekvencí. Náhodně provedeným výběrem klonů z cDNA knihovny je možno získat soubor stovek různých genů, které jsou podle četnosti a homologie s již známými sekvencemi rozděleny do klastrů.

Nový protein se stává vhodným kandidátem pro další výzkum, pokud je u něj zjištěna homologie s nějakou molekulou s již popsányými imunomodulačními účinky nebo pokud je výrazně zvýšena jeho exprese po přisátí. Lze jej rekombinantně připravit a následně otestovat jeho předpokládanou biologickou aktivitu, nebo proti němu získat protilátky využitelné pro další funkční testy (Valenzuela, 2002). Tento postup byl již využit při zkoumání sialomu (transkriptomu ze slinných žláz) mnoha druhů klíšťat, jako např. *Amblyomma variegatum* (Nene a spol., 2002), *Ixodes scapularis* (Valenzuela a spol., 2002; Ribeiro a spol., 2006), *Ixodes pacificus* (Francischetti a spol., 2005), *Dermacentor andersoni* (Aларcon-Chaidez a spol., 2007) a rovněž *Ixodes ricinus* (Chmelař a spol., 2008).

Klasický i nový metodický přístup vedl k identifikaci mnoha nových molekul, z nichž některé jsou vhodnými kandidáty na protiklíštěcí vakcínu. Nové vakcíny by byly vhodnou alternativou k chemickým přípravkům na hubení těchto ektoparazitů, které jsou v dnešní době široce využívány. Samotná infestace hostitele klíšťaty a rovněž infekce přenášenými patogeny (hlavně babezióza a anaplazmóza) způsobují závažné hospodářské ztráty v dobytčářském průmyslu. Přitom nevýhod současně používaných chemických látek přibývá, velkým problémem je rychle se rozvíjející rezistence klíšťat na tyto přípravky a kontaminace životního prostředí (Mulenga a spol., 2000; Fuente a spol., 2007).

Imunizace hostitele klíštěcími molekulami má tedy mnoho nesporných výhod, vedla by totiž nejen k ochraně před infestací ektoparazity, ale i k zamezení přenosu patogenů (Wikel, 1999). Antivektorová „trans-block“ vakcinace by nechránila hostitele pouze před známými patogeny, ale i před těmi dosud neobjevenými (Titus a spol., 2006).

Ideální molekulou pro přípravu vakcíny je ta, která je imunogenní a zároveň vyvolává vznik rezistence. Tyto dvě vlastnosti se bohužel vždy neshodují, protein může sice spustit tvorbu protilátek, ale rezistenci proti klíštěti nevyvolá (Das a spol., 2000).

2.3.1 Vakcinace skrytými a exponovanými antigeny

V pátrání po vhodných kandidátech lze použít dva odlišné přístupy. Příhodnou molekulu lze hledat mezi tzv. exponovanými (exposed) antigeny z klíštěcích slin (se kterými hostitel přichází běžně do kontaktu), anebo mezi skrytými (concealed) antigeny, které jsou exprimovány ve střevech vektora.

Imunizace skrytými antigeny byla využita při vývoji vakcíny GAVAC (TickGARD), která obsahuje protein Bm86 z epitelálních střevních buněk klíštěte *Boophilus microplus*, závažného přenašeče babeziózy v Africe. Je to zatím jediná komerčně vyráběná vakcína proti klíšťatům (Fragoso a spol., 1998). Mechanismus jejího účinku je založen na tom, že během sání se do těla klíštěte dostávají spolu s krví i hostitelské protilátky, které mohou interagovat se střevními klíštěcími antigeny (Nuttall a spol., 2006).

Rovněž byla popsána i imunizace purifikovaným 20 kDa integumentovým antigenem klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* (Rutti a Brossard, 1992) a antihemostatickými proteiny klíštěte *Haemophysalis longicornis* HLS-2 (*H. longicornis* serpin-2) z hemolymfy a HLS-1 (*H. longicornis* serpin-1) ze střeva (Mulenga a spol., 2000).

Dnes se ovšem zdá, že vhodnějším a účinnějším přístupem je použití antigenů exponovaných, protože imunizace skrytými antigeny nemusí zabránit přenosu patogena. Navíc bylo pozorováno vytvoření rezistence sáním neinfekčních klíšťat. U hostitelů vakcinovaných těmito antigeny není potřeba k udržení vysoké hladiny protilátek opakovaná imunizace, protože přicházejí do styku s klíštěcími proteiny přirozeně při sání parazitů (Mulenga a spol., 2000; Fuente a Kocan, 2007).

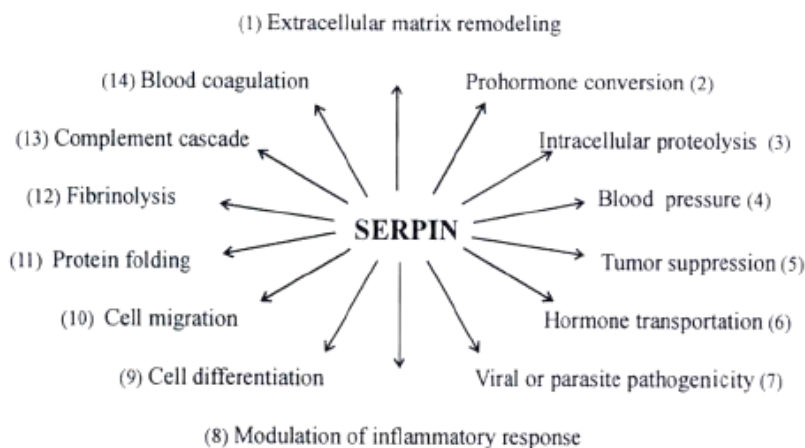
Imunomodulátor ze slin klíštěte *Ixodes scapularis*, sialostatin L2 při vakcinačních pokusech zamezil klíštěti plně se nasát, prodloužil dobu sání a umožnil hostiteli rozvinout zánětlivou odpověď (Kotsyfakis a spol., 2008). Problémem při výzkumu exponovaných antigenů je, že proteiny klíštěcích slin s imunosupresivními účinky, nebudou pravděpodobně příliš imunogenní (Mulenga a spol., 2000). Nadějnými kandidáty na vakcínu se tak stávají molekuly s antihemostatickými a protizánětlivými účinky; mezi mnoha možnými antigeny se v současné době zdají být nejzajímavější serpiny a cementové proteiny (například RIM36 imunodominantní 36 kDa protein a 64TRP 15 kDa protein z klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus*) (Maritz-Olivier a spol., 2007; Imamura a spol., 2009; Trimnell a spol., 2005).

2.3.2 Proteinová nadrodina serpinů

Název serpin vznikl původně jako akronym pro inhibitory serinových proteáz (SERine Protease INhibitor), které se v organismu podílejí na regulaci mnoha fyziologických procesů (viz. Obr.1) (Potempa a spol., 1994). Tyto proteiny se dělí podle přítomnosti určitých strukturních domén do několika skupin, existují například serpiny s Kunitzovou či Kazalovou doménou. U klíšťat jsou známy například BPTI–Kunitz trombinové inhibitory (Salp14 a trypsinové inhibitory z *Boophilus microplus*) (Maritz-Olivier a spol., 2007).

Slovo serpin však také může odvozeně označovat protein z nadrodiny strukturně konzervovaných molekul (označení použité v této práci), který nemusí mít vůči serinovým proteázám prokázanou inhibiční aktivitu (Gettins, 2002).

Serpiny jsou 40-60 kDa glykoproteiny s tzv. serpinovým jádrem (základ jejich terciární struktury), jehož velikost (360 až 390 aminokyselin) je víceméně shodná u všech serpinů. Oproti tomu se v rámci nadrodiny proteiny odlišují přítomností dlouhých aminokyselinových úseků na N nebo na C konci proteinů. Dalším variabilním úsekem serpinových molekul je RCL (Reactive center loop, reaktivní smyčka), která je exponována na povrchu molekuly a slouží k navázání cílového proteinu (serinové proteázy) (Gettins, 2002).



Obr. 1. Výčet fyziologických procesů organismu s účastí serpinů.

Převzato z Potempa a spol., 1994.

U členovců bylo objeveno několik proteinů patřících právě do serpinové nadrodiny (superfamily). U serpinů izolovaných z klíšťat (hemolymfy a slin) se předpokládá, že jejich funkcí je narušování obrany hostitele a udržování homeostázy samotných hematofágů. Tyto glykoproteiny tak tvoří zajímavý cíl právě pro vývoj protiklíštěcí vakcíny (Imamura a spol,

2005). Je však otázkou jestli imunizace proteiny, které se účastní mnoha fyziologických procesů, nemůže způsobit zkříženou reaktivitu (Maritz-Olivier a spol., 2007).

U různých druhů klíšťat bylo již identifikováno několik molekul z nadrodiny serpinů například u klíštěte *Haemophysalis longicornis* (HLS-1 a 2) (Maritz-Olivier a spol., 2007; Imamura a spol., 2005), *Rhipicephalus appendiculatus* (RAS-3 a 4, *R. appendiculatus* serpin 3 a 4) (Imamura a spol., 2009), a *Ixodes ricinus* (Leboulle a spol., 2002).

2.3.3 Budoucnost protiklíštěcích vakcín

Z výše uvedených faktů vyplývá, že by výběr klíštěcích antigenů pravděpodobně tedy neměl záviset na tom, jestli jsou skryté či exponované, ale na tom, jakou mají funkci. Dají se očekávat experimenty provedené se směsí různých antigenů. Výběr vhodné molekuly bude pravděpodobně záviset na tom, jestli je schopná hostitele ochránit nejen před infestací klíšťaty, ale hlavně před infekcí přenášenými patogeny (Mulenga a spol., 2000; Maritz-Olivier a spol., 2007). Ideální protiklíštěcí vakcína by rovněž měla být účinná proti více druhům a různým vývojovým stádiím klíšťat (Nuttall a spol., 2006).

Skupina S. Imamury vytvořila směs rekombinantních proteinů klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* RAS-3, RAS-4 a RIM36. U skotu vakcinovaného touto směsí byla detekována protektivní imunita, která u dospělých stádií klíštěte způsobila smrt. Rovněž bylo zjištěno, že u imunizovaných zvířat dochází ke zpomalení infekce prvokem *Theileria parva*, který klíšťata přenášejí (Imamura a spol., 2008).

Další klíštěcí protein nazvaný subolesin (4D8, viz. dále) prokázal v experimentech protektivní charakter proti všem vývojovým stádiím klíštěte *Ixodes scapularis*, nedávné pokusy potvrdily tento efekt i u *Dermacentor variabilis* a *Amblyomma americanum*. Navíc u nymf *I. scapularis* sajících na imunizovaných zvířatech byla o 30% snížena jejich infekce bakterií *Anaplasma phagocytophilum* (Fuente a Kocan, 2007).

Velmi nadějná vakcína, založená na imunizaci cementovým proteinem 64TRP z klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus*, účinkuje dvěma způsoby: jednak je vyvolanou zánětlivou a imunitní odpovědí hostitele oslabeno sání klíštěte, a navíc specifické anti-64TRP protilátky reagují s antigeny klíštěcího střeva, poškozují ho a sající klíště tak usmrcují (Labuda a spol., 2006). V následných experimentech s 64TRP byla objevena zkřížená reaktivita i s antigeny dalších druhů klíšťat (*Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus*, *Amblyomma variegatum* a *Boophilus microplus*), a to u dospělců i nymf (Trimnell a spol., 2005).

Vakcinace myši tímto proteinem navíc zabránila přenosu viru klíšťové encefalidy (TBEV, Tick-borne encephalitis virus) přenášeným *I. ricinus*. Experiment s infekcí TBEV byl rovněž proveden s komerčně dostupnou protiklíštěcí vakcínou založenou na antigenu Bm86. Při srovnání výsledků Bm86/64TRP vyšlo najevo, že ochrana myši před přenosem viru TBE („transmission blocking effect“) z nakažených klíšťat je u obou použitých vakcín srovnatelná. Na rozdíl od Bm86 však imunizace 64TRP chrání zvíře i před letální infekcí virem klíšťové encefalidity (Labuda a spol., 2006).

Nové technologie jako RNAi (RNA interference), výzkum celých sialomů a bioinformatické zpracovávání dat objevování nových proteinů, případných kandidátů na vývoj protiklíštěcí vakcíny, velice urychlují. Do výzkumu klíšťat byla rovněž zavedena poměrně nová metodika k rychlému a efektivnímu získávání protilátek, DNA vakcinace.

2.4 DNA vakcíny

Přestože první zpráva o pokusech s injikací DNA molekul do tkáně živého organismu byla publikována již roku 1962 (Atanasiu, 1962), byl rozvoj této technologie odstartován až studií Wolffa a spol. vydanou v časopise Science roku 1990.

Principem DNA vakcinace je vnesení plazmidového (či virového) vektoru kódujícího protektivní antigen do savčích buněk, který v těchto buňkách vyvolá expresi kódovaného proteinu (Ivory a Chadee, 2004). Tento výsledek byl velikým překvapením, protože se obecně předpokládalo, že plazmidová DNA nemůže *in vivo* vstoupit do buňky bez nějakého podpůrného systému (nosiče jako např. kationických lipidů). Následující studie navíc prokázaly, že plazmid zůstává v buňce extrachromozomálně, nedochází k jeho replikaci ani k integraci do genomu transfekovaného zvířete.

Tato zjištění naznačila, že DNA vakcíny mohou být novou, užitečnou a bezpečnou technikou k expresi exogenních proteinů v savčích buňkách (Montgomery a spol., 1997) a mohly by tedy být využity k vyvolání imunitní odpovědi proti antigenům různých patogenů (Tang a spol., 1992).

Experiment s vakcinací myši chřipkovým nukleoproteinem prokázal, že metoda je schopná u vakcinovaného organismu úspěšně vyvolat protektivní imunitu (Ulmer a spol., 1993). Po této demonstraci se nová technologie začala v 90. letech zkoušet na dalších zvířecích modelech proti mnoha známým cílovým patogenům. Z virů například proti viru hepatitidy B, viru herpes simplex a viru HIV, z bakteriálních patogenů potom proti

Mycoplasma pulmonis či *Mycobacterium tuberculosis*, a také proti protozoárním parazitům jakými jsou *Plasmodium yoelii* a *Leishmania major* (Montgomery a spol., 1997). Nové vakcíny se začaly vyvíjet i proti autoimunitním chorobám, alergii a některým druhům rakoviny (Ulmer a spol., 2006).

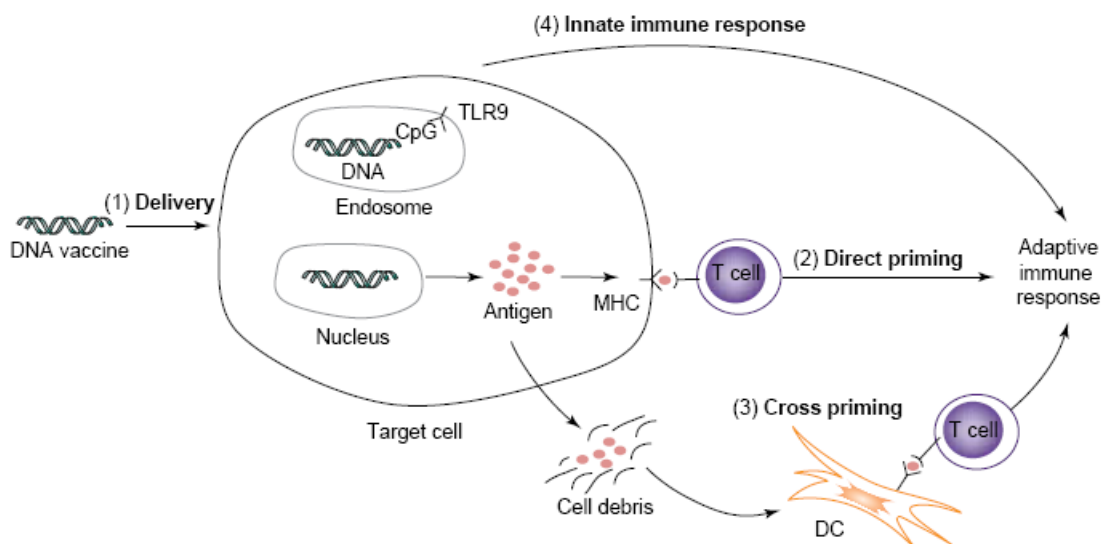
Inovativní technologie genetické imunizace má širokou využitelnost, protože je levná, poměrně snadno dostupná a je schopná vyvolat jak buněčnou tak i humorální imunitní odpověď (oproti subjednotkovým polysacharidovým vakcínám) (Barry a spol., 2004; Talaat a Stemke-Hale, 2005). Navíc s sebou nenese riziko potenciální nežádoucí replikace patogenů, jak je tomu v případě živých atenuovaných vakcín (Talaat a Stemke-Hale, 2005).

2.4.1 Odpověď imunitního systému na DNA vakcinaci

Přesný mechanismus účinku DNA vakcín byl dlouho zkoumán, současný pohled na něj shrnuje Obr. 2. Krok 1: Buňky mohou přijmout „nahé“ molekuly DNA buď samotné nebo pomocí nějakého nosiče (adjuvans, mikročástice). Když se molekuly dostanou do APC (antigen presenting cells, antigen prezentující buňky), kódované proteiny jsou zde exprimovány, v cytoplazmě degradovány na peptidy, které jsou poté přes endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát exportovány ven z buňky a na jejím povrchu prezentovány pomocí MHC třídy I (major histocompatibility complex, hlavní histokompatibilní komplex) přímo naivním T lymfocytům (Krok 2: „direct priming“). Vzniká buněčná imunitní odpověď (cytotoxické T lymfocyty). Další možností je, když jsou antigeny uvolněné z transfekovaných buněk (např. apoptózou) pohlceny okolními specifickými APC (dendritickými buňkami) a ty je pak prezentují na povrchu spolu se svými MHC molekulami třídy II (Krok 3: „cross priming“). Vzniká protilátková imunitní odpověď.

Určité CpG motivy z DNA bakteriálních plazmidových vektorů mohou dále interagovat s TLR9 (Toll like receptor 9) na membráně endozomu dendritických a jiných imunitních buněk (Krok 4), což vede k další stimulaci imunitního systému.

Celý proces tak vede k vývoji silné imunitní odpovědi proti antigenu kódovanému DNA vakcínou (Ulmer a spol., 2006; Montgomery a spol., 1997). Určitým designem DNA vakcíny se navíc dá docílit zesílení humorální či buněčné složky obranného systému imunizovaného organismu (Barry a spol., 2004).



Obr. 2. Mechanismus účinku DNA vakcín.

Převzato z Ulmer a spol., 2006

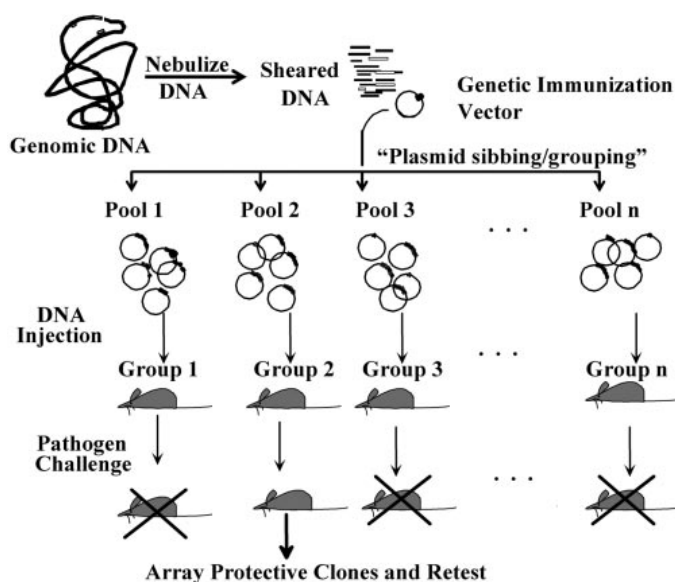
2.4.2 Imunizace expresní knihovnou

Přes mnoho různých problémů, které se objevily, se vývoj nové technologie posunuje stále dál. V současnosti jsou již komerčně dostupné přinejmenším čtyři veterinární DNA vakcíny s licenci. Prvním přípravkem uvedeným na trh byla vakcína proti koňskému viru West Nile (EWNV, equine West Nile virus), za ní těsně následovala vakcína proti viru infekční hematopoetické nekrózy (IHNV infectious hematopoietic necrosis virus) u jeseterovitých ryb, dostupný je také produkt doplňující prasečí růstový hormon (GHRH growth hormone-releasing hormone) (Frelin a Sällberg, 2009; Ulmer a spol., 2006).

Značným zlepšením metodiky DNA vakcín bylo zavedení protokolu ELI, high-throughput přístupu, který je založen na imunizaci expresní knihovnou (Expression library immunization) (Barry a spol., 1995). Přestože je genetická imunizace účinná, vyžaduje znalost genů kódujících protektivní antigenní proteiny. Proto u mnoha patogenů, jejichž genomy nebyly prozkoumány a neznáme vhodné antigeny, je tento fakt překážkou při přípravě DNA vakcíny. Aby bylo překonáno toto omezení byl využit samotný imunitní systém vakcinovaného zvířete ke screeningu potenciálních vakcinačních kandidátů z celého genomu patogena (Barry a spol., 2004).

ELI protokol (viz. schéma na Obr. 3) může v zásadě zredukovat jakýkoliv genom patogena (osekvenovaný i dosud neosekvenovaný) na několik antigenů, které vyvolávají protektivní imunitní reakci. Hlavní myšlenkou tohoto přístupu je využití hostitelského

imunitního systému k identifikaci nejlepších kandidátů pro vakcínu. Celý genom je rozdělen na menší fragmenty, zaklonován do vektorů (s eukaryotickým promotorem), a takto vytvořená knihovna může exprimovat všechny čtecí rámce (ORF, Open reading frames) patogena. Knihovna je rozdělena do subgenomových souborů („pool“) klonů, plazmidová DNA je purifikována, a injikována do pokusných zvířat. Zvířata jsou imunizována všemi genovými soubory a zaklonované antigeny patogena u nich vyvolají imunitní odpověď. Imunizovaná zvířata jsou poté vystavena infekci. Z výsledků imunitních testů je v závěru jasné, která skupina klonů vyvolala protektivní imunitu. Takto vybrané pozitivní soubory mohou být dále rozděleny a opět testovány. Po několika opakováních ELI protokolu můžeme získat jednotlivé protektivní antigeny, vhodné kandidáty na vývoj vakcíny (Talaat a Stemke-Hale, 2005).



Obr. 3. Schéma ELI protokolu.

Převzato z Talaat a Stemke-Hale, 2005.

Metoda imunizace expresní knihovnou byla využita při screenování genomu několika parazitů, například u *Leishmania donovani*, *Taenia crassiceps*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* a dalších (Talaat a Stemke-Hale, 2005).

V klíčícím výzkumu byla ELI využita Almazánovou a kol. pro identifikaci protektivních antigenů z klíšťe *Ixodes scapularis*. Nejprve byla připravena cDNA expresní knihovna z buněčné linie IDE8 (odvozené ze zárodečných stádií *I. scapularis*). Jednotlivé soubory cDNA klonů byly vystaveny několika imunizačním testům. Na vakcinovaných a kontrolních myších pak sály klíšťecí larvy. Imunita proti infestaci klíšťaty byla určena jejich

nedostatečným nasátím a případným přechodem do stádia nymfy. Jednotlivé klony ze souborů, které prokázaly imunogení účinky, byly částečně osekvenovány, a následně rozděleny do skupin na základě jejich předpokládané funkce. Tímto screeningem bylo identifikováno několik antigenů vyvolávajících protektivní imunitu proti infestaci klíštěte *Ixodes scapularis* (Almazán a spol., 2003).

Pro hlubší charakterizaci byly vybrány tři: 4F8 (s homologií k nukleotidáze), 4D8 a 4E6 (s neznámou funkcí). Bylo zjištěno, že všechny tři antigeny jsou exprimovány ve všech vývojových stádiích klíštěte a mají tkáňovou lokalizaci. Konzervovaná sekvence a exprese 4D8 byla objevena u dalších šesti druhů klíšťat (*Ixodes ricinus*, *Ixodes pacificus*, *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, *Boophilus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*). Všechny tři klíštěcí polypeptidy byly rekombinantně vyrobeny. S připravenými proteiny byly provedeny další imunizační testy na myších a později i na ovcích s infestací larvami, nymfami i dospělci *Ixodes scapularis*. Zvířata byla vakcinována jednotlivými proteiny i jejich směsí. Získaná protilátková odpověď ovlivnila u klíšťat produkci vajíček a v případě 4D8 a 4F8 signifikantně zredukovala infestaci ektoparazity (Almazán a spol., 2005a; Almazán a spol., 2005b).

Nejlépších výsledků bylo však dosaženo při imunizaci rekombinantním proteinem 4D8. Tento protein byl nazván subolesin a pomocí RNAi bylo zjištěna jeho funkce při sání a reprodukci klíšťat (Fuente a spol., 2006). Analýzy kódující DNA a proteinové sekvence objevily podobnost s proteiny jedenácti dalších druhů klíšťat skupiny *Ixodida*. Subolesin je tedy vysoce konzervovaným proteinem, při imunizaci vyvolává u zvířat protektivní odpověď, a navíc byla při experimentech s infekcí bakterií *Anaplasma phagocytophilum* prokázána jeho role při přenosu patogena na sající klíšťata (Fuente a Kocan, 2007).

Celý výše popsáný proces dokázal, že technologie DNA vakcín (ELI protokol) může být účinným nástrojem při výzkumu klíštěcích molekul.

3. Cíle práce:

Cílem této práce bylo optimalizovat a využít technologii DNA vakcín k získání protilátek proti proteinům ze slin klíštěte *Ixodes ricinus*.

1. Příprava cDNA vakcín

Z cDNA knihovny vybrat kandidáty vhodné pro imunizaci a připravit konstrukty pro cDNA vakcinaci.

2. Optimalizace metody cDNA vakcinace

Pomocí prvních experimentů optimalizovat vakcinační dávku a vakcinační schéma, vybrat nejvhodnější kmen myši a nejvýhodnější metodu k testování vyvolané imunity.

3. Testování účinnosti metody cDNA vakcinace

Otestovat imunitní odpověď na jednotlivé cDNA vakcíny a detekované reakce porovnat.

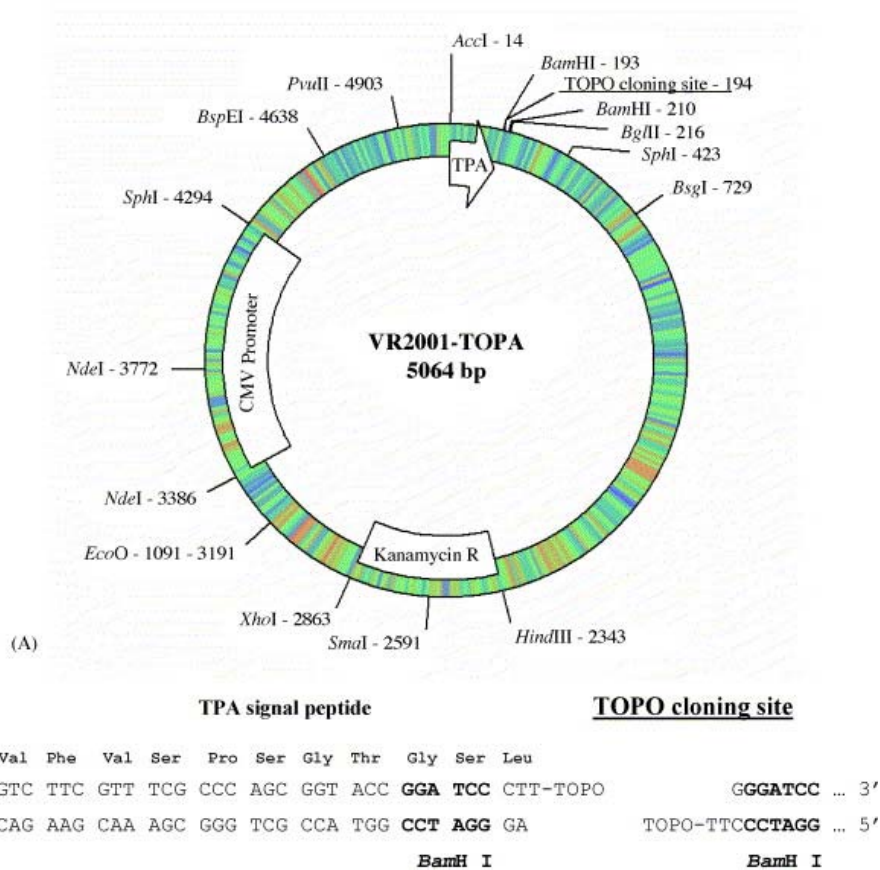
4. Materiál a metody

4.1 Příprava DNA vakcín

4.1.1 Konstrukce cDNA vakcín

Ze známých genů získaných sekvenací cDNA knihovny byly vybrány geny Contig14 (dále c14), IRS (*Ixodes ricinus* serpin)-1, IRS-2, IRS-4 a IRS-8. Tyto cDNA byly zaklonovány do plazmidu VR2001, který byl speciálně navržen v laboratoři J. G. Valenzuely (Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Health/ National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA) a vyroben firmou Invitrogen.

Plazmid VR2001 obsahuje gen pro rezistenci na kanamycin, lidský cytomegalovirový (CMV) promotor a signální peptid pro lidský TPA (tissue plasminogen activator, aktivátor tkáňového plasminogenu). VR2001 umožňuje přímé TOPO zaklonování amplifikovaných genů pomocí adeninových převisů.



Obr. 5 : Mapa plazmidu VR2001.

4.1.2 PCR amplifikace vybraných cDNA

Primery specifické pro jednotlivé geny z cDNA knihovny byly navrženy manuálně podle sekvence vybraného genu bez signálního peptidu. Sekvence všech použitých primerů jsou uvedeny v Příloze 2. Složení PCR směsi bylo následující:

- 0,5 µl vzorku
- 2 µl forward primeru (100 µM)
- 2 µl reverse primeru (100 µM)
- 10 µl 2 x Master mixu (MBI Fermentas)
- 5,5 µl ddH₂O

PCR amplifikace byla provedena v termocykleru (Applied biosystems) za použití následujícího programu:

1. počáteční denaturace: 93 °C, 3 minuty
 2. denaturace: 93 °C, 30 sekund
 3. annealing: teplota specifická pro každý gen, 45 sekund
 4. elongace: 72 °C, 1 minutu
 5. extenze: 72 °C, 7 minut
- } 30 cyklů

Krok č. 5 umožní vytvoření adeninových převisů. Výsledek reakce byl zkontrolován elektroforézou při napětí 100 V v 1% agarózovém gelu (1% agaróza v TAE pufru) obsahujícím ethidium bromid (1 µl na 100 ml gelu). 10 µl PCR reakce bylo smícháno se 2 µl 6x Loading Dye Solution (MBI Fermentas). Pod UV lampou byla určena velikost produktu porovnáním s DNA standardem GeneRuler 100bp DNA ladder (MBI Fermentas).

TAE pufr	40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, zásobní 10x
Ethidium bromid	10 mg/ml

4.1.3 Izolace PCR produktů kitem JETQUICK Gel Extraction Spin Kit (Genomed)

PCR produkt byl před ligací do plazmidu VR2001 purifikován z agarózového gelu, při izolaci bylo postupováno podle firemního návodu, všechny uvedené centrifugační kroky byly provedeny při 13 000 RPM po dobu 1 minuty a při laboratorní teplotě. Pomocí kitu byla

izolována amplifikovaná DNA a všechny nežádoucí nečistoty (např. ostatní složky PCR reakce) byly odstraněny. Izolovaný a přečištěný PCR produkt byl rozpuštěn ve 40 μl ddH₂O. Poté byla spektrofotometricky stanovena jeho koncentrace (Biophotometer 1.2., Eppendorf).

4.1.4 Ligace produktů PCR do plazmidu VR2001

Ligace do vektoru VR2001 byla provedena podle standardního protokolu pro TOPO TA cloning kit (Invitrogen). Byla připravena následující ligační reakce:

- 0,5 μl plazmidu VR2001
- 1 μl Salt solution (Invitrogen)
- 3,5 μl PCR produktu

Ligační reakce probíhala 5 minut při laboratorní teplotě.

4.1.5 Izolace pozitivních klonů *E.coli* transformovaných plazmidovou DNA

Kompetentní bakterie *E.coli* OneShot TOP10 (Invitrogen) byly transformovány následujícím postupem: Alikvot kompetentních buněk (50 μl) byl ponechán 5 minut na ledu, pak k němu byly přidány 4 μl ligační směsi. Buňky s ligační reakcí byly opatrně promíchány pipetovou špičkou a ponechány dalších 30 minut na ledu. Poté byly buňky vystaveny po dobu 1 minuty teplotnímu šoku (42 °C) a ihned zchlazeny na ledu. K transformovaným bakteriím bylo přidáno 250 μl SOC média a suspenze byla kultivována 90 minut (37 °C, 230 RPM).

Pro získání jednotlivých klonů bylo 20 μl suspenze rozetřeno na Petriho misku s LB agarem a kanamycinem (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a ponecháno při 37 °C přes noc. Z narostlých (nesoucích vektor VR2001) kolonií bylo náhodně vybráno větší množství klonů, to bylo dále přeočkováno na novou plotnu a otestováno na přítomnost insertu metodou PCR za použití gen-specifických primerů a na správnou orientaci za použití vektorového 5' primeru a gen-specifického 3' primeru. Petriho misky s narostlými koloniemi byly pro případné další použití uchovávány při 4 °C.

Na základě obou následných PCR reakcí bylo vybráno několik pozitivních klonů, ze kterých byly vyizolovány plazmidy (viz kapitola 4.1.6). Správnost sekvencí byla ověřena sekvenační analýzou. Bakteriální kolonie se správně zaklonovaným plazmidem byly přeočkovány do 200 ml LB média s kanamycinem (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a kultivovány přes noc (37 °C,

230 RPM). Plazmid byl vyizolován pomocí JETSTAR 2.0 Plasmid Maxi LFU Plasmid Purification Kit (Genomed, viz kapitola 4.1.7).

SOC médium	2 % bacto-trypton; 0,5 % bacto-yeast extract; 0,05 % NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glukóza; pH 7,0
LB (Luria-Bertani) médium	1 % bacto-trypton; 0,5 % bacto-yeast extract; 0,5 % NaCl; pH 7,0
LB agar	1,5 % bacto-agar v LB médiu
Kanamycin	zásobní roztok 50 mg/ml H ₂ O

4.1.6 Izolace plazmidů kitem JETQUICK Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed)

Pro ověření zaklonovaného genu sekvenováním v sekvenační laboratoři byly plazmidy izolovány miniprepovým kitem. Při izolaci bylo postupováno podle firemního návodu (všechny centrifugační kroky probíhaly při 12 000 g a laboratorní teplotě). K izolaci byly použity 2 ml narostlé bakteriální kultury. Pomocí kitu byla izolována plazmidová dvouvláknová DNA, zatímco RNA, proteiny a další případné nežádoucí nečistoty byly odstraněny. Plazmidová DNA byla eluována 50 µl ddH₂O, její koncentrace byla následně stanovena spektrofotometricky (Biophotometer 1.2., Eppendorf). Vyizolované plazmidy byly uchovávány při -20 °C.

4.1.7 Izolace plazmidů kitem JETSTAR 2.0 Plasmid Maxi LFU Plasmid Purification Kit (Genomed)

Pro přípravu cDNA vakcíny bylo třeba velké množství koncentrované DNA, proto byla plazmidová DNA izolována kitem JETSTAR 2.0 Plasmid Maxi LFU Plasmid Purification Kit (Genomed), kterým byla zároveň odstraněna většina bakteriálního endotoxinu (lipopolysacharid, LPS), aby jeho výsledná koncentrace ve vakcinační dávce byla co nejmenší a pokud možno nepřesáhla pyrogenní hranici (1 EU/kg váhy). Bylo postupováno podle firemního návodu. K izolaci bylo použito 200 ml narostlé bakteriální kultury. Buňky byly získány centrifugací (10 minut, 7000 RPM, 4 °C), supernatant byl kompletně odstraněn. Promytí bakteriálního lyzátu na LFU (lysate filter unit) koloně promývacím roztokem E5 bylo oproti předepsanému postupu provedeno dvakrát. Plazmidová DNA byla z kolony vymyta 15 ml elučního pufru E6. Získaná DNA byla z roztoku vysrážena isopropanolem (70 %

objemu výsledku izolace) po dobu 10 minut při laboratorní teplotě, a zcentrifugována (30 minut, 12 000 g, 4 °C). Pelet obsahující plazmidovou DNA byl 2x promyt 70% ethanolem, ze kterého byl nakonec získán centrifugací (5 minut, 12 000g, 4 °C). Získaný pelet byl ponechán k vyschnutí 30 minut ve sterilním boxu při laboratorní teplotě. Získaná plazmidová DNA byla eluována ve 100-200 µl ddH₂O. U vyizolovaných plazmidů byla spektrofotometricky stanovena koncentrace DNA (Biophotometer 1.2., Eppendorf) a pomocí LAL testu i koncentrace obsaženého LPS. Takto připravené plazmidy byly uchovávány při -20 °C a dále použity jako cDNA vakcíny.

4.1.8 Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Test QCL-1000 (Cambrex)

V cDNA vakcínách, připravených podle výše uvedeného postupu, bylo stanoveno množství bakteriálního LPS LAL testem. Bylo postupováno podle firemního návodu. Metoda byla provedena za užití endotoxine-free laboratorního vybavení a LAL reagenční H₂O. Všechny roztoky byly předehřáty na 37 °C. Byla připravena čtyřbodová standardní endotoxinová ředící řada (C = 1,0; 0,5; 0,25; 0,1 EU/ml). 50 µl testovaného vzorku bylo smícháno s 50 µl chromogenního lyzátu z amébocytů ostrorepa *Limulus polyphemus*. Směs byla inkubována 10 minut při 37 °C na termobloku, poté se k ní přidalo 100 µl substrátového roztoku, po dalších 6 minutách byla reakce zastavena přidáním 100 µl stop-roztoku. Vzorky byly přepipetovány do 96-jamkového panelu a na vertikálním spektrofotometru (Labsystems Multiskan MCC/340) byla změřena jejich absorbance při 405 nm. Naměřená absorbance je přímo úměrná množství LPS ve vzorku, takže jeho přesná koncentrace byla zjištěna porovnáním se získanou kalibrační standardní křivkou.

LAL (Limulus amebocyte lysate)	5x lyofilizovaný lyzát, rozpuštěný v LAL reagenční H ₂ O, uchováván při -20°C
Endotoxin	1x29 EU lyofilizovaného endotoxinu z <i>E.coli</i> , resuspendován v 1 ml LAL reagenční H ₂ O, uchovávat při 4°C
Substrátový roztok (chromogenní)	2 x 7 mg lyofilizovaný substrát; resuspendován v 6,5 ml LAL reagenční H ₂ O; chránit před světlem; uchovávat při 4°C
Převod jednotek EU (endotoxine unit)	1 EU = 0,1 ng lipopolysacharidu (pyrogenní účinek začíná při 1EU/kg hmotnosti)

4.2 Získávání klíštěcích slin

Klíšťata byla nachytána v okolí Českých Budějovic vlnkováním a ponechána sedm dní sát na morčatech. Nasáté samice byly přichyceny na podložní sklíčko lepící páskou, na hypostom a jednu palpu se jim nasunula kapilára, na hřbet klíštěte bylo pipetou rozetřeno podle velikosti klíštěte 1–2 μl 3% (w/v) roztoku pilocarpinu (v 70% ethanolu). Klíšťata byla následně uchovávána při zvýšené koncentraci CO_2 a 37 °C. Každých 15 minut byla klíšťata kontrolována a případně získané sliny byly z kapiláry odstraněny pomocí balónku s hadičkou. Po hodině byla klíšťata potřena 1-2 μl 70% ethanolu, který rozpustil zbytkový pilocarpin. Během celého procesu byly klíštěcí sliny uchovávány na ledu. Po 2-4 hodinách byly všechny kapiláry vyprázdněny a získávání slin ukončeno. Sliny byly přefiltrovány přes 0,22 μm filtr Millex (Millipore). Ve slinách byl změřen obsah celkového proteinu (metodou podle Bradfordové) a pilocarpinu (hmotnostní spektrometrií). Sliny byly před použitím uchovávány při -70 °C.

4.2.1 Měření koncentrace proteinu metodou podle Bradfordové

Koncentrace celkového proteinu v klíštěcích slinách byla změřena metodou podle Bradfordové (1976). Nejprve byla připravena albuminová ředící řada ($C = 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500 \mu\text{g/ml}$). Do dvou jamek bylo napipetováno 5 μl slin. Do všech jamek bylo poté přidáno 100 μl činidla. Absorbance všech vzorků byla změřena na vertikálním spektrofotometru (Labsystems Multiscan MCC/340, Finsko) při 595 nm. Přesná koncentrace proteinu byla zjištěna porovnáním se získanou standardní křivkou albuminu.

4.3 Vakcinace myší

K pokusům byly použity následující kmeny myší: outbrední CD-1 a inbrední BALB/c, C3H/HeN, C57BL/6 (Anlab, ČR). Byly použity samice ve věku 6-8 týdnů. Myši byly chovány ve zvěřinci Parazitologického ústavu Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích za standardních podmínek (teplota vzduchu 22 °C, relativní vlhkost vzduchu 65 %). Myši byly krmeny krmivem pro hlodavce (Racio s.r.o., Břeclav, ČR) a byly napájeny vodou *ad libitum*. Anestezie myší byla provedena inhalační (halothanum Narcotan), později intraperitoneální metodou (injekcí 75 μl narkotizační směsi). Myši byly vakcinovány intradermálně do ucha 10 či 20 μg cDNA vakcíny v 10 μl ddH₂O, případně 12 μl klíštěcích slin o přibližné koncentraci celkového proteinu 850 $\mu\text{g/ml}$.

Směs pro intraperitoneální anestezii	8 ml 5% Narkamon (Spofa), 2 ml 2% Rometar (Spofa), 10 ml PBS
--------------------------------------	--

4.4 Získávání myších sér

Po třech až šesti týdnech od poslední vakcinační dávky byly myši usmrčeny. Získaná krev byla ponechána přes noc při 4 °C, vzniklá krevní sraženina byla odstraněna, sérum bylo získáno centrifugací (10 minut, 2 500 RPM). Vzniklý supernatant (sérum bez krevních komponentů) byl uchováván při -70 °C.

4.5 Příprava rekombinantních proteinů

4.5.1 Příprava rekombinantních proteinů v CHO buňkách

CHO (Chinese Hamster Ovary cells) je savčí buněčná linie využívaná běžně k expresi rekombinantních proteinů. V kultuře buňky adherují ke stěně nádoby. Buňky byly kultivovány při 37 °C, 3,5 % CO₂, pasážovány každé 2-3 dny. Pro expresi v CHO buňkách byly geny zaklonovány do vektoru pcDNA4/TO/*myc*-His pomocí restriktáz *Xho*I a *Age*I.

Před transfekcí připravenými plazmidy byly buňky pasážovány 24 hodin předem, k přípravě rekombinantního proteinu bylo použito 150 ml kultury. Reakce proběhla v médiu D-MEM připraveném bez BOFES. Transfekční směs byla připravena rozpuštěním 30 µg plazmidové DNA, a 150 µl PEI (lineární polyethylenimin, transfekční médium) v 3,5 ml média. Reakce byla ponechána 15 minut při laboratorní teplotě, mezitím byly buňky zbaveny média a 3x promyty. K rozpuštěné plazmidové DNA s PEI bylo po 15 minutách přidáno dalších 15 ml média a transfekční směs byla poté smíchána s připravenou buněčnou suspenzí. K transfekovaným buňkám bylo před kultivací přidáno odpovídající množství antimykotik a antibiotik.

Po 48 hodinách byl z kultury získán supernatant centrifugací (4 °C, 7 minut, 1250 RPM) a dále zpracováván na ledu. Získaný pelet byl odstraněn, supernatant byl přefiltrován přes 0,22 µm filtr. Kolony pro separaci proteinů nad 10 kDa (Amicon Ultra-15, 10NMWL, Millipore) byly 2x promyty ddH₂O a přes připravené kolony byl postupně zcentrifugován (4 °C, 4300 RPM) veškerý získaný supernatant. Konečný objem po zakoncentrování

supernatantu (cca 1 ml) byl opatrně přepipetován z kolony a po přidání azidu (NaN_3) na finální koncentraci 0,05 % (w/v) uchovávan při 4 °C. Při izolaci c14 (5 kDa) byl naopak po centrifugaci přes kolonu uchován pelet.

D-MEM komplet	D-MEM (Sigma) s 5% BOFES, 1 % Antibiotik a Antimykotik (Penicilin, streptomycin, amfotericin B), 1% glutamin, a 0,1% merkptoethanol
---------------	---

4.5.2 Expresse rekombinantních proteinů v bakteriálním systému

Pro expresi testovaných rekombinantních proteinů byl použit i bakteriální expresní systém, konkrétně buňky BL21(DE3)pLysS (Invitrogen) spolu s vektorem pET17 (Novagen). Použité buňky byly připraveny dříve, jejich příprava nebyla součástí této práce.

Ze zásobního glycerol-stocku bylo naočkováno 10 ml LB média s ampicilinem (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a chloramphenicolem (37 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a kultivováno v 37 °C (230 RPM, přes noc). Z narostlé buněčné kultury byly odebrány 2 ml, které byly přeneseny do 200 ml LB média s antibiotiky, kultura se nechala růst a pravidelně byla měřena OD (optical density). Při $\text{OD}_{600} = 0,6$ bylo přidáno IPTG (výsledná koncentrace 1mM) a kultura byla ponechána 3 hodiny při třepání 230 RPM ve 37 °C. Bakterie byly získány centrifugací (8500 RPM, 10 minut, 4 °C).

Zbytky LB média byly odstraněny a pelet byl resuspendován v 10 ml resuspendačního pufru. Buňky byly rozsonikovány ultrazvukem (3 x 15 s) na sonikátoru (Hielscher) Výsledný bakteriální lyzát obsahující rekombinantní proteiny byl před použitím na SDS PAGE dialyzován 1 hodinu proti destilované vodě a poté uchovávan při -20 °C

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (zásobní roztok 1 M)
Resuspendační pufr	20 mM Tris-HCl, pH 8,0

4.6 Testování imunity vyvolané cDNA vakcinací

4.6.1 Western blot

Na SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) byly připraveny polyakrylamidové gradientové gely 5%-17,5%. Polymerizace gelů probíhala přes noc, gely byly uchovávány při 4 °C.

5x Gelový pufr	1,875 M Tris; pH 8,8
Akrylamidový roztok	30% Acrylamid a bisacrylamid
10% (w/v) SDS	Laurylsulfát sodný
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylethylenediamin
10% (w/v) APS	Ammonium persulfát

Proteiny ze zahuštěného supernatantu buněk CHO, případně z bakteriálního lyzátu byly rozděleny podle velikosti pomocí metody SDS-PAGE. Před nanesením na gel bylo 20 µl vzorku smícháno s 5 µl vzorkového redukujícího pufru. Vzorky byly následně denaturovány povařením (5 minut při 100 °C) a celý objem byl nanesen na gel. Elektroforéza proběhla v elektrodoovém pufru nejprve při napětí 100 V a po zarovnání vzorků v gelu bylo napětí zvýšeno na 200 V. Jako proteinový standard byl použit LMW Electrophoresis Calibration Kit (Amersham).

Proteiny rozdělené pomocí SDS-PAGE byly přeneseny metodou Western blot z gelu na nitrocelulózovou membránu. Blotovací sandwich byl složen z vrstvy filtračního papíru, nitrocelulózové membrány, polyakrylamidového gelu a vrstvy filtračního papíru. Všechny součásti blotu mimo gelu byly nejprve promyty v blotovacím pufru. Přenos probíhal po dobu 75 minut při 250 mA. Z nitrocelulózové membrány s přebloťovanými proteiny byla odříznuta část obsahující standard a jeden vzorek z každého proteinu. Tato část membrány byla následně obarvena v 0,1% amidočerni rozpuštěné v odbarvovacím pufru. Barvení bylo zastaveno promytím v odbarvovacím pufru.

Mezi všemi následujícími uvedenými kroky byla membrána důsledně promyta v PBS-Tween (3 x 5 minut) a veškeré inkubace probíhaly při laboratorní teplotě při 230 RPM. Na zbytku membrány byla 1 hodinu blokována nespecifická místa 5% roztokem laktózy v PBS-Tween. Dále byla membrána rozdělena na proužky s jednotlivými proteiny. Ty byly poté inkubovány 1 hodinu v primární protilátce (myší séra) ředěné 1:100 či 1:10 v PBS-Tween a 1 hodinu v sekundární, peroxidázou značené protilátce proti konstantní části

myších IgG (SwAM/Px, SEVAC Praha, ČR, případně Anti-Mouse Polyvalent Immunoglobulins produced in Goat, Sigma) ředěné v PBS-Tween v poměru 1:1000 (SwAM/Px) případně 1:500 (Anti-Mouse Polyvalent Immunoglobulins produced in Goat). Membrána byla obarvena roztokem DAB, reakce byla odstartována přidáním 50 µl H₂O₂. Po úspěšném obarvení byla reakce zastavena destilovanou vodou.

Vzorkový redukující pufr (5x)	2,27 g Tris-HCl; 1,25 g SDS; 12,5 ml glycerol; 0,25% bromfenolová modř; 25 ml ddH ₂ O; pH 6,8 před použitím přidat 1 mg DTT/20 ml
Elektrodotový pufr (10x)	15 g Tris, 72 g glycinu, 5 g SDS, 500 ml ddH ₂ O
Blotovací pufr (10x)	15,5 g Tris; 72 g glycinu; 2,5 g SDS; 500 ml ddH ₂ O; před použitím ředit 50 ml pufru, 100 ml methanolu, 350 ml destilované vody
PBS-Tween	0,05% Tween 20 v PBS
Odbarvovací pufr	25% methanol, 10% kyselina octová
Roztok DAB	10 mg 3,3'-diaminobenzidin; 30 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5

4.6.2 Nepřímá ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

Přítomnost, specifčnost a titer protilátek ze získaných myších sér byla stanovována metodou ELISA, modifikace podle Hollisterové a Canningové (1987).

Do jamek 96-jamkového panelu byly nanášeno 50 µl bakteriálního lyzátu obsahujícího rekombinantní proteiny naředěného ve vazebném pufru na koncentraci 20 µg/ml. Panel byl inkubován přes noc ve vlhké komůrce při 4 °C. Poté byl panel vysušen vyklepnutím na filtrační papír. Nespecifické vazby byly vyblokovány přidáním 200 µl blokovacího roztoku do každé jamky. Destička byla ponechána ve vlhké komůrce 30 minut při 37 °C. Roztok byl poté 3x vymyt promývacím roztokem. Do odpovídajících jamek bylo nanášeno 100 µl zkoumaného myšího séra naředěného v ředícím roztoku. Panel byl ponechán 1 hodinu ve vlhké komůrce při 37 °C a poté 6x promyt promývacím roztokem. Do jamek bylo napipetováno 50 µl peroxidázou značené protilátky proti konstantní části myších IgG protilátek (SwAM/Px, SEVAC Praha, ČR případně Anti-Mouse Polyvalent Immunoglobulins produced in Goat, Sigma) ředěné v ředícím roztoku v poměru 1:2000 resp. 1:1000. Následovala inkubace 1 hodinu ve vlhké komůrce při 37 °C a poté opět promytí destičky 3x

promývacím roztokem. Enzymová reakce byla vyvolána přidáním 100 μ l substrátového roztoku (s 5 μ l 30% H_2O_2 a 5 mg ortofenylendiaminu na 10 ml) do jamky a po 10 minutách inkubace zastavena přidáním 100 μ l 2M H_2SO_4 . Absorbance byla změřena na vertikálním spektrofotometru (Labsystems Multiscan MCC/340) při 490 nm.

Vazebný pufr	1,59 g Na_2CO_3 ; 2,93 g NaHCO_3 ; 1l H_2O ; pH 9,6
Blokovací roztok	5% BOFES v PBS
Promývací roztok	0,05% Tween 20 v PBS
Ředící roztok	2% BOFES v PBS
Substrátový roztok	1,84 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,51 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$; ve 100 ml H_2O pH 5,0

4.7 Statistické zhodnocení naměřených dat

Získaná data byla statisticky zhodnocena jednocestnou analýzou variance (jednocestná ANOVA), post hoc comparison (Tukey HSD test) v programu Statistica 6.0 (StatSoft). Standardní odchylky byly stanoveny v programu Excel (Microsoft). Byly použity hladiny významnosti 0,05 a 0,01.

5. Výsledky

5.1 Příprava cDNA vakcín

5.1.1 Příprava konstruktů pro cDNA vakcinaci

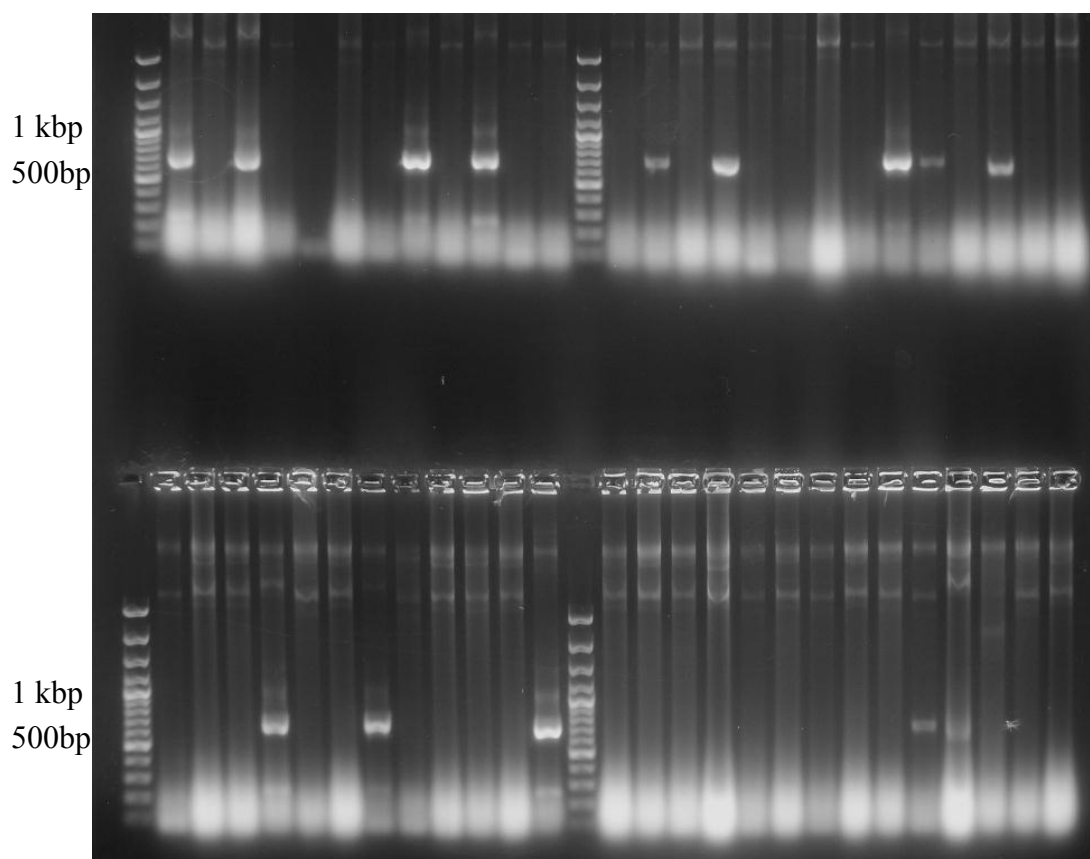
Celkem 6 genů bylo zaklonováno do vektoru VR2001 – GFP, c14, IRS-1, IRS-2, IRS-4 a IRS-8. Sekvence těchto genů jsou uvedeny v Příloze 1. Připravené konstrukty byly následně transformovány do kompetentních buněk TOP10 (postup je uveden v kapitole 4.1.). Jako příklad přípravy cDNA vakcíny je uveden výsledek z přípravy GFP konstruktů, který byl využit v prvních pokusech pro vakcinaci kontrolních skupin.

Selekce úspěšně transformovaných (obsahujících vektor VR2001) klonů byla provedena pomocí antibiotika kanamycinu, na který nese plazmid VR2001 rezistenci. U pozitivních klonů byla ověřena přítomnost zaklonovaného genu pomocí PCR s gen-specifickými primery, jejichž sekvence je uvedena v příloze 2. Vektor VR2001 se liguje pomocí TOPO technologie, proto se mohou spojit dohromady i konce prázdného plazmidu. Z tohoto důvodu bylo třeba ověřit pomocí PCR s gen-specifickými primery velké množství klonů, jak je vidět z Obr. 6. V případě GFP se jednalo o 52 kolonií. Vektor VR2001 navíc neumožňuje direkcionální klonování. S pozitivními klony byla proto provedena další PCR pomocí vektorového 5' primeru a gen specifického 3' primeru. PCR produkt mohl tedy vzniknout pouze v případě, že insert byl zaklonován ve správné orientaci. Tímto způsobem bylo ze souboru klonů z první PCR reakce (u GFP z 15 klonů) dále vybráno 4-5 klonů (viz Obr. 7). Správnost jejich sekvence byla ověřena sekvenací v Laboratoři genomiky na přístroji ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems). Pro další práci byl vybrán jeden správný klon. Stejným postupem byly připraveny i všechny ostatní konstrukty.

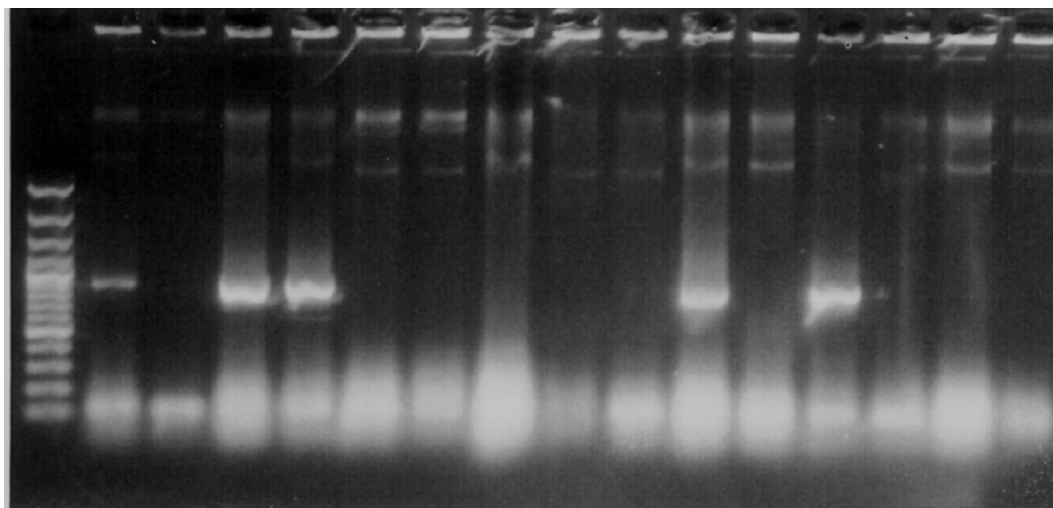
Pro první testy k optimalizaci celého vakcinačního procesu byly připraveny konstrukty genů pro IRS-1, c14 a GFP. Pro další experimenty byly připraveny cDNA vakcíny s geny pro IRS-1, IRS-2, IRS-4, IRS-8 a s prázdným plazmidem VR2001, který byl použit k přípravě negativního séra. V následujícím textu budou všechny cDNA vakcíny uvedeny pod zkratkou vac s označením zaklonovaného genu (seznam zkratek všech použitých cDNA vakcín uvádí Tabulka 1).

Tabulka 1: Seznam zkratk používaných v textu pro jednotlivé cDNA vakcíny.

cDNA vakcína	Insert ve vektoru VR2001
vacC14	Contig14
vacGFP	GFP
vacIRS-1	IRS-1
vacIRS-2	IRS-2
vacIRS-4	IRS-4
vacIRS-8	IRS-8
vacVR2001	Bez insertu



Obr. 6: PCR z klonů transformovaných konstruktem VR2001- GFP s primery pro GFP. Z původních 52 klonů bylo na základě této reakce vybráno 15 pozitivních klonů (PCR produkt o velikosti 720 bp) obsahujících konstrukt se zaklonovaným GFP genem.



Obr. 7: PCR 15 klonů (s ověřenou přítomností genu GFP) s VR2001 forward a GFP reverse primerem. Na základě této amplifikace bylo vybráno 5 klonů, které obsahovaly vektor VR2001 s GFP zaklonovaným ve správné orientaci.

5.1.2 Příprava jednotlivých cDNA vakcín

Množství plazmidové DNA potřebné pro vakcinaci bylo izolováno z 200 ml bakteriální kultury pomocí kitu Maxiprep LFU Plasmid Isolation kit (Jetstar 2.0, Genomed). Koncentraci izolované dvouvláknové DNA jednotlivých cDNA vakcín uvádí Tabulka 2, poměr absorbance 260/280 byl u všech připravených cDNA vakcín v rozmezí 1,6-1,8.

Tabulka 2: Výsledná koncentrace izolované DNA připravených cDNA vakcín.

cDNA vakcína	Koncentrace izolované DNA [µg/ml]
vacC14	2 040
vacGFP	2 600
vacIRS-1	První izolace 2 560 Druhá izolace 4 050
vacIRS-2	4 560
vacIRS-4	První izolace 1 410 Druhá izolace 2 270
vacIRS-8	4 650
vacVR2001	4 700

Vakcíny vacC14, vacIRS-1 a vacGFP byly pro první imunizační experimenty naředěny na koncentraci 1 µg/µl. Z důvodu zvýšení účinnosti vakcinace byly v dalších pokusech vacIRS-1, vacIRS-2, vacIRS-4, vacIRS-8 použity v koncentraci 2 µg/µl.

Pomocí použitého izolačního kitu byla z izolované DNA eliminována většina LPS, které může u obratlovců i při nízkých koncentracích způsobit orgánové selhání. Množství LPS v připravených cDNA vakcínách bylo ještě pro jistotu stanoveno pomocí LAL testu (QCL-1000, Cambrex), aby bylo zajištěno, že jedna vakcinační dávka bude obsahovat méně než 1 ng LPS. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Množství LPS v jednotlivých cDNA vakcínách naměřené LAL testem.

cDNA vakcína	Množství LPS ve vakcinační dávce [ng]
vacC14	0,2
vacGFP	0,3
vacIRS-1	0,5
vacIRS-2	0,3
vacIRS-4	0,5
vacIRS-8	0,6
vacVR2001	0,1

5.2. Vakcinování myší

5.2.1 Imunizace vacC14, vacIRS-1 a vacGFP

Pro první imunizační testy k optimalizaci metody cDNA vakcinace byly použity dva kmeny myší: outbrední kmen CD-1 a inbrední BALB/c. Myši byly imunizovány třemi cDNA vakcínami: vacC14, vacIRS-1 a vacGFP (kontrola). Každá skupina obou kmenů obsahovala 5 myší. Myši byly vakcinovány dvěma dávkami cDNA vakcín (10 μ g DNA v 10 μ l ddH₂O) intradermálně do pravého ucha. Bylo použito následující vakcinační schéma:

1. dávka: cDNA vakcína do pravého ucha myši
pauza 14 dní
2. dávka: cDNA vakcína do pravého ucha myši
pauza 14 dní
(3. dávka: klíštěcí sliny do levého ucha myši)

Po třech týdnech po injekci klíštěcích slin byly myši usmrceny. Získaná séra byla testována na přítomnost protilátek při ředění 1:100 a 1:10 metodou Western blot. Jako antigen bylo použito zakoncentrované médium buněk CHO obsahující odpovídající rekombinantní proteiny.

U skupiny myší CD-1 imunizovaných vacIRS-1 byla při ředění 1:10 detekována slabá reakce proti IRS-1. U skupin vakcinovaných vacC14 a vacGFP nebyla detekována v predikované velikosti žádná reakce. U inbredních myší BALB/c jsme nedetekovali reakci v žádné pokusné skupině.

Cílem injekce klíštěcích slin provedené v rámci tohoto pokusu bylo zjistit zda imunizace vacC14 či vacIRS-1 nevyvolá u myší imunitní odpověď proti antigenům klíštěcích slin. Injekce klíštěcích slin do levého ucha myši simulovala sání klíštěte na hostiteli. Předpokládali jsme, že se na pravém uchu myši vytvoří zánět, který potvrdí přítomnost imunitní odpovědi vyvolané cDNA imunizací. Vznik zánětlivé odpovědi však nebyl pozorován.

5.2.2 Imunizace vacIRS-1, vacIRS-2, vacIRS-4 , vacIRS-8 a vacVR2001

Další experimenty byly provedeny opět s outbredním kmenem myši CD-1, který v předchozím pokusu vykazoval odpověď na vakcinaci a dále pak s inbredními kmeny C3H/HeN a C57BL/6. Myši těchto tří kmenů byly imunizovány čtyřmi serpinovými cDNA vakcínami vacIRS-1, vacIRS-2, vacIRS-4, vacIRS-8 a kontrolní skupiny vacVR2001.

Každá experimentální skupina CD-1 a C3H/HeN se skládala ze 6 myší, skupina C57BL/6 z 5 myší. Všechny myši byly vakcinovány třikrát zvýšenou dávkou 20 µg DNA v 10 µl ddH₂O intradermálně do ucha. Vakcinační schéma bylo při těchto pokusech následující:

1. dávka cDNA vakcína
pauza 14 dní
2. dávka cDNA vakcína
pauza 14 dní
3. dávka cDNA vakcína

Bohužel u myši kmene C3H/HeN došlo k úmrtí mnoha jedinců pravděpodobně kvůli použitému typu anestézie (inhalace Narcotanu), takže pokus nebyl úspěšně dokončen, na konci byla získána séra z několika málo jedinců. U několika myší CD-1 rovněž došlo k této negativní reakci, ale na konci pokusu bylo získáno dostatečné množství vzorků (minimálně 4 z každé skupiny). Kvůli negativní zkušenosti s tímto typem anestézie byla dále u myší C57BL/6 použita anestézie intraperitoneální.

5.3 Testování imunity vyvolané cDNA vakcinací

5.3.1 Vakcinace myší CD-1 a BALB/c - metoda Western blot

První séra získaná imunizací myší CD-1 a BALB/c cDNA vakcínami vacC14, vacIRS-1 a vacGFP byla testována metodou Western blot. Antigenem pro imunodetekci byl zakonzentrovaný supernatant savčí buněčné kultury CHO obsahující odpovídající rekombinantní proteiny. Polyklonální protilátky z myších sér byly nejprve ředěny v poměru 1:100, poté 1:10.

Touto metodou byla detekována při ředění sér 1:10 slabá reakce proti proteinu IRS-1 u skupiny CD-1 myší imunizované vacIRS-1. Všechna polyklonální séra v testu neočekávaně

reagovala s neznámým antigenem ze zahuštěného média buněčné kultury CHO o přibližné velikosti 66 kDa.

5.3.2 Vakcinace myši CD-1, C3H/HeN, C57BL/6

Myši CD-1, C3H/HeN, C57BL/6 byly imunizovány vakcínami vacIRS-1, vacIRS-2, vacIRS-4, vacIRS-8 a vacVR2001. Všechna séra získaná imunizací byla testována nejprve metodou ELISA (v ředění 1:100), na základě které byly vybrány vzorky s nejsilnější odpovědí. U těch byl poté rovněž metodou ELISA zjišťován titr protilátek (ředěním v poměru 1:250, 1:500, 1:1000 a 1:2000) a testována specifita protilátek (zkříženou reakcí s ostatními testovanými serpy). Přítomnost protilátek byla navíc ještě ověřena metodou Western blot při ředění sér 1:100. Jako antigen pro všechny testy byl použit bakteriální lyzát buněk *E. coli* BL21 obsahující exprimované rekombinantní proteiny.

Přítomnost protilátek vytvořených cDNA vakcinací byla použitými metodami detekována u všech tří imunizovaných myších kmenů. Vzhledem k úmrtí mnoha jedinců myši C3H/HeN během pokusu bylo však na konci získáno od tohoto kmene malé množství vzorků (maximálně dvě séra z každé skupiny). Výsledky všech imunizačních pokusů u jednotlivých kmenů myši jsou popsány dále. V následujícím textu jsou experimentální skupiny označovány zkratkami uvedenými v Tabulce 4.

V uvedených grafech jsou označeny statisticky průkazné rozdíly oproti kontrolním sérum skupiny VR označeny jednou (hladina významnosti 0,001) či dvěma hvězdičkami (hladina významnosti 0,05). Titrem protilátek je v následujícím textu označována reakce sér skupin I-1, I-2, I-4 a I-8, která byla při stejném ředění protilátek průkazná (na hladině významnosti 0,05) proti nejsilnějšímu séru skupiny VR.

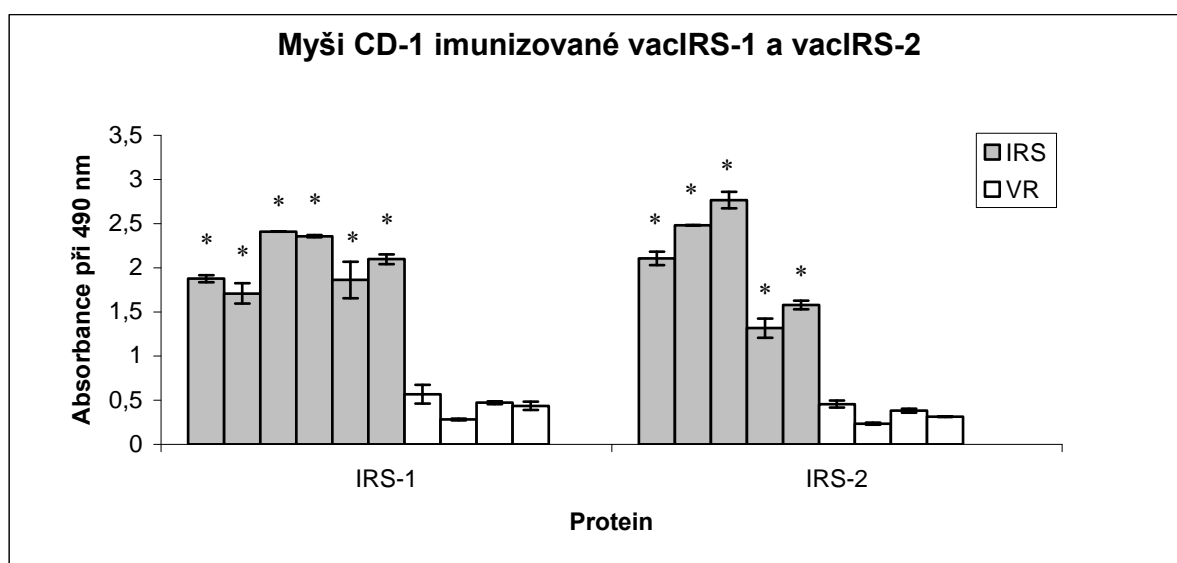
Tabulka 4: Zkratky použité pro označení jednotlivých pokusných skupin myši.

Použitá cDNA vakcína	Označení pokusné skupiny
vacIRS-1	I-1
vacIRS-2	I-2
vacIRS-4	I-4
vacIRS-8	I-8
vacVR2001 (bez insertu)	VR

5.3.2.1 Výsledky vakcinace myši kmene CD-1

U outbredního kmene myši CD-1 byly detekovány protilátky ve všech vakcinovaných skupinách. Během pokusu došlo k úmrtí několika myši z různých skupin. Z původních šesti vzorků tak bylo u skupiny I-2 získáno pět a u skupin I-4, I-8 a kontrolní VR pak čtyři séra.

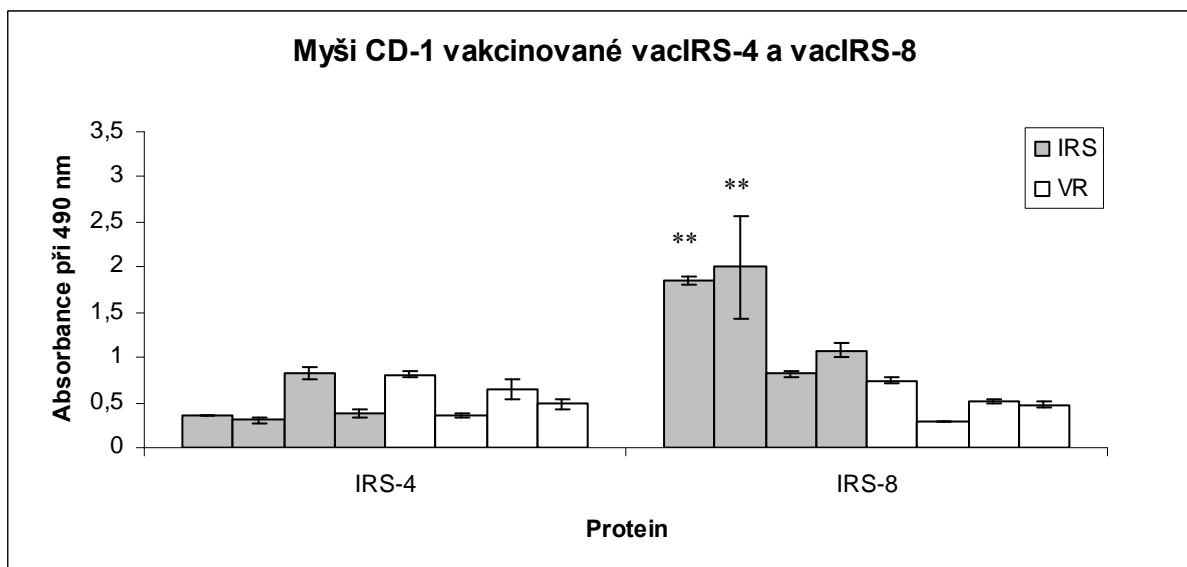
Séra jednotlivých myši se v rámci skupin v protilátkové odpovědi liší. Výsledky reakce jednotlivých sér při ředění 1:100 uvádějí Grafy 1 a 2, ve kterých jsou porovnána všechna séra skupin I-1, I-2, I-4 a I-8 se séry kontrolní skupiny VR.



Graf 1: Testování sér kmene CD-1 (skupiny I-1 a I-2).

Proti serpinům IRS-1 a IRS-2 jsou vynesena jednotlivá séra vakcinovaných myši vždy z odpovídající skupiny. **IRS**-jednotlivá séra myši vakcinovaných vacIRS-1 a vacIRS-2. **VR**-séra myši kontrolní skupiny vakcinované vacVR2001.

Nejsilnější reakce byla zjištěna u polyklonálních sér myši vakcinovaných vacIRS-1 a vacIRS-2 (Graf 1). U nejsilnějšího séra I-1 skupiny byla detekována čtyřnásobně silnější reakce než u nejsilnějšího séra kontrolní skupiny VR. Skupina I-1 navíc vykazovala i největší homogenitu v naměřených hodnotách zatímco u skupiny I-2 byly naměřeny výraznější rozdíly mezi jednotlivými séry. Reakce nejsilnějšího séra ze skupiny I-2 byla oproti nejsilnějšímu séru VR silnější šestnásobně, zatímco reakce nejslabšího séra byla silnější pouze trojnásobně.



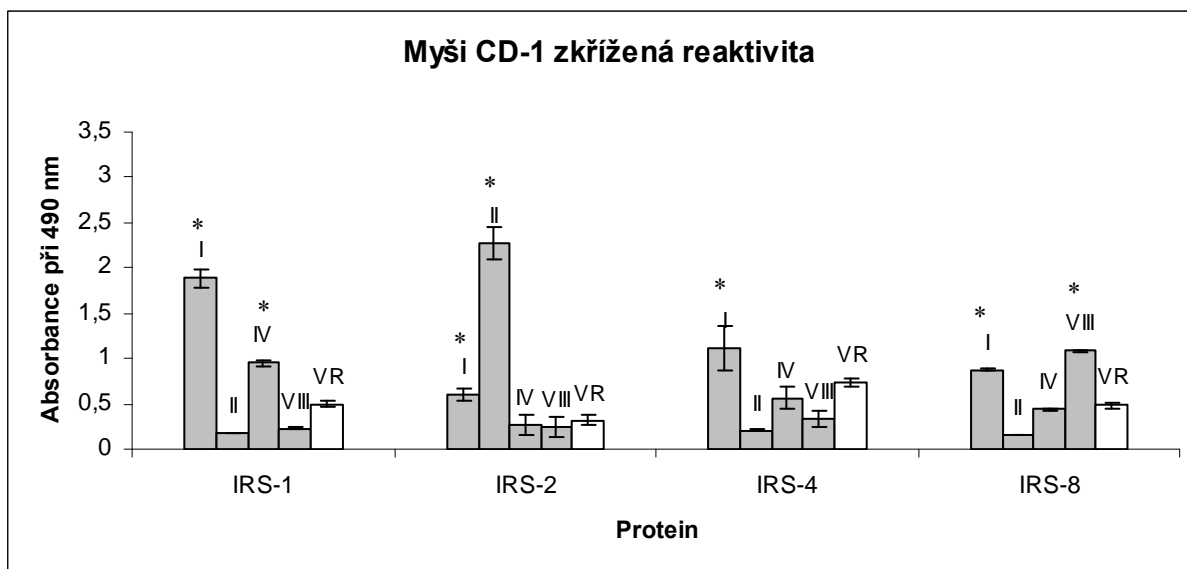
Graf 2: Testování sér kmene CD-1 (skupiny I-4 a I-8).

Proti serpinům IRS-4 a IRS-8 jsou vynesena jednotlivá séra vakcinovaných myši vždy z odpovídající skupiny. **IRS**-jednotlivá séra myši vakcinovaných vacIRS-4 a vacIRS-8. **VR**-séra myši kontrolní skupiny vakcinované vacVR2001.

U všech sér skupiny vakcinované vacIRS-4 (Graf 2) byla detekována jen slabá reakce srovnatelná se séry kontrolní skupiny VR. Výrazné rozdíly mezi jednotlivými séry v rámci skupiny byly pozorovány ve skupině I-8 (Graf 2), kde zvýšenou reaktivitu vykazovala pouze dvě séra ze čtyř, zbývající dvě séra reagovala srovnatelně se vzorkem kontrolní skupiny.

Fakt, že nejvyšší reaktivitu v testu prokázala séra skupin I-1 a I-2 byl podpořen i výsledkem titračního testu, ve kterém byla pozitivní reakce proti IRS-1 a IRS-2 zaznamenána ještě při ředění 1:500, u ostatních skupin byla detekovatelná reakce při ředění 1:100.

Zkřížená reaktivita s ostatními proteiny byla testována za využití sér, která při prvním testování prokázala nejsilnější reakci ze skupiny. Z výsledků, které uvádí Graf 3, vyplývá, že žádné testované sérum nemá striktní specifitu.



Graf 3: Testování sér myši kmene CD-1 na zkříženou reaktivitu.

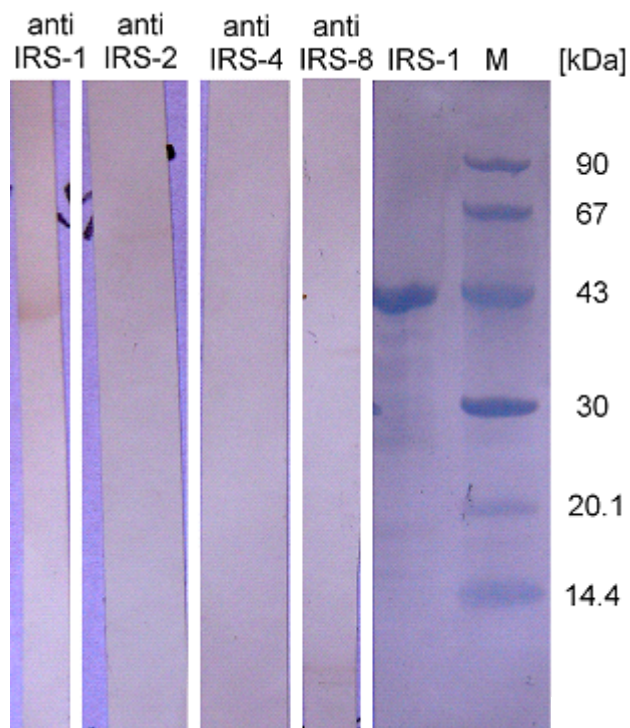
Proti serpinům IRS-1, IRS-2, IRS-4 a IRS-8 jsou vynesena nejsilnější séra ze všech skupin vakcinovaných myši. **I**-sérum myši vakcinované vacIRS-1, **II**-sérum myši vakcinované vacIRS-2, **IV**-sérum myši vakcinované vacIRS-4, **VIII**-sérum myši vakcinované vacIRS-8, **VR**-sérum myši vakcinované vacVR2001.

Proti serpinu IRS-1 reagovalo nejsilněji sérum myši imunizované vacIRS-1 (čtyřikrát silněji než kontrolní sérum VR). S tímto serpinem reagovalo silně rovněž sérum myši imunizované vacIRS-4, reakce séra byla oproti reakci kontrolního vzorku VR dvojnásobně silnější. Séra skupin I-2 a I-8 reagovala se serpinem IRS-1 slabě.

S dalším serpinem IRS-2 reagovalo nejsilněji sérum myši imunizované vacIRS-2, tato reakce byla nejsilnější z celého testu. Při srovnání s reakcí kontrolního séra VR byla reakce séra ze skupiny I-2 sedminásobná. Slabší reakci u proteinu IRS-2 jsme zaznamenali i u séra ze skupiny I-1 (dvojnásobná síla reakce séra VR). Séra skupin I-4 a I-8 reagovala se serpinem IRS-2 slabě, srovnatelně s kontrolním sérem VR.

S proteinem IRS-4 reagovala slabě séra všech skupin. Signifikantně silnější oproti séru VR bylo sérum ze skupiny I-1. U séra skupiny I-4 nebyla s proteinem IRS-4 pozorována žádná zvýšená reaktivita v porovnání s kontrolním sérem. Se serpinem IRS-8 reagovalo nejsilněji sérum skupiny I-8. Detekovaná reakce séra skupiny I-8 byla oproti reakci séra VR dvojnásobně silnější. Se serpinem IRS-8 reagovalo silněji i sérum myši vakcinované vacIRS-1.

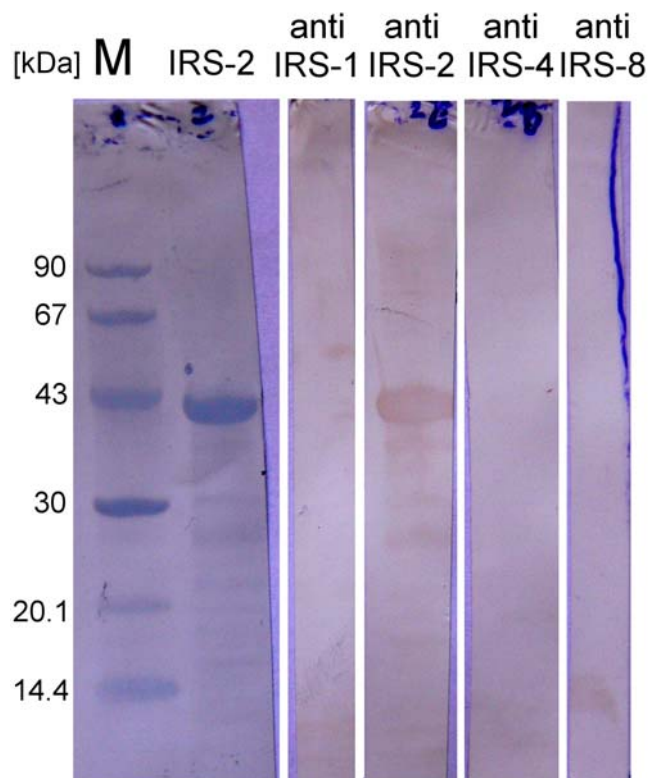
Přítomnost a specifičnost protilátek získaných cDNA vakcinací byla potvrzena metodou Western blot. Na Obr. 8 a 9 jsou vidět reakce sér skupin I-1, I-2, I-4 a I-8 proti serpinům IRS-1 (Obr. 8) a IRS-2 (Obr. 9).



Obr. 8: **Imunodetekce serpinu IRS-1.**

M – proteinový standard, **IRS-1**- bakteriální lyzát obsahující rekombinantní IRS-1 (42 kDa) obarvený v amidočerni., **anti IRS-8**- reakce séra skupiny I-8, **anti IRS-4**-reakce séra skupiny I-4, **anti IRS-2**- reakce séra skupiny I-2, **anti IRS-1**- reakce séra skupiny I-1

Proteiny bakteriálního lyzátu (obsahujícího rekombinantní protein IRS-1) byly rozděleny SDS-PAGE a porovnány s proteinovým standardem. Rekombinantní serpin IRS-1 má velikost 42 kDa. Při imunodetekci reagovalo polyklonální sérum skupiny I-1 s proteinem odpovídající velikosti. Na obrázku je vidět, že séra skupin I-2, I-4 a I-8 slabě zkříženě reagovala s bakteriálními proteiny různých velikostí.



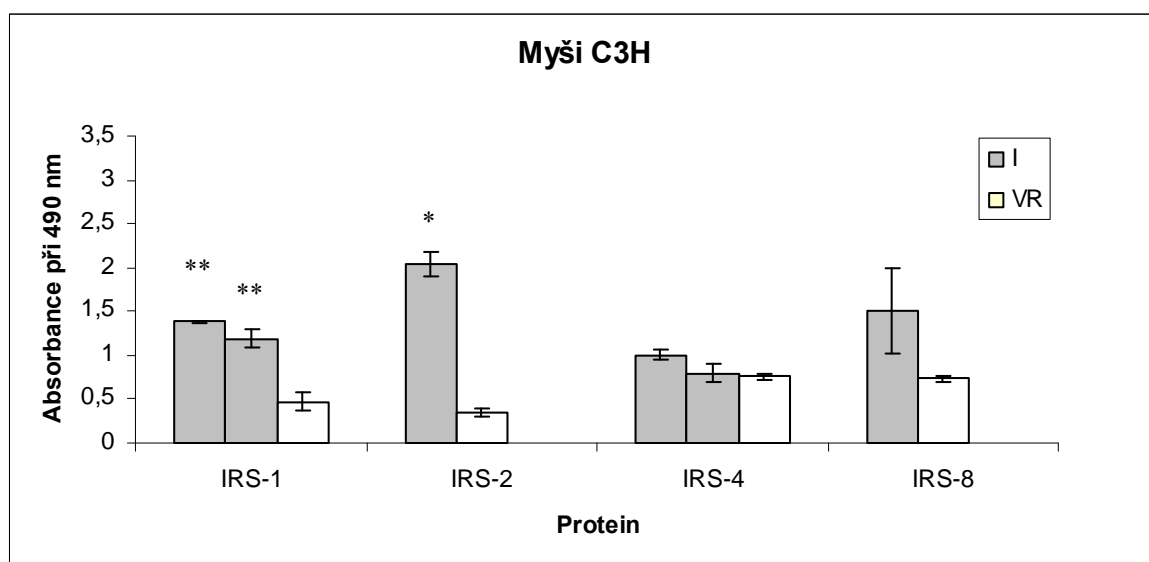
Obr. 9: **Imunodetekce serpinu IRS-2.**

M – proteinový standard, **IRS-2**- bakteriální lyzát obsahující rekombinantní IRS-2 (přibližně 42 kDa) obarvený v amidočerni., **anti IRS-1**- reakce séra skupiny I-1, **anti IRS-2**- reakce séra skupiny I-2, **anti IRS-4**-reakce séra skupiny I-4, **anti IRS-8**- reakce séra skupiny I-8

Sérum myši ze skupiny I-2 při Western blotu reagovalo nejsilněji s proteinem, jehož velikost odpovídá IRS-2. Všechna použitá séra zkříženě reagovala s různými bakteriálními proteiny.

5.3.2.2 Výsledky vakcinace myši kmene C3H/HeN

U myši inbredního kmene C3H/HeN bylo získáno na konci pokusu malé množství sér, přesto lze z výsledků usoudit, že cDNA vakcinace byla i u těchto myši úspěšná. Výsledky testování vyvolané imunity při ředění polyklonálních sér 1:100 shrnuje Graf 4. Všechna séra skupin vakcinovaných čtyřmi serpinovými cDNA vakcínami (vacIRS-1, vacIRS-2, vacIRS-4 a vacIRS-8) jsou porovnávána s kontrolním sérem myši imunizované vacVR2001.



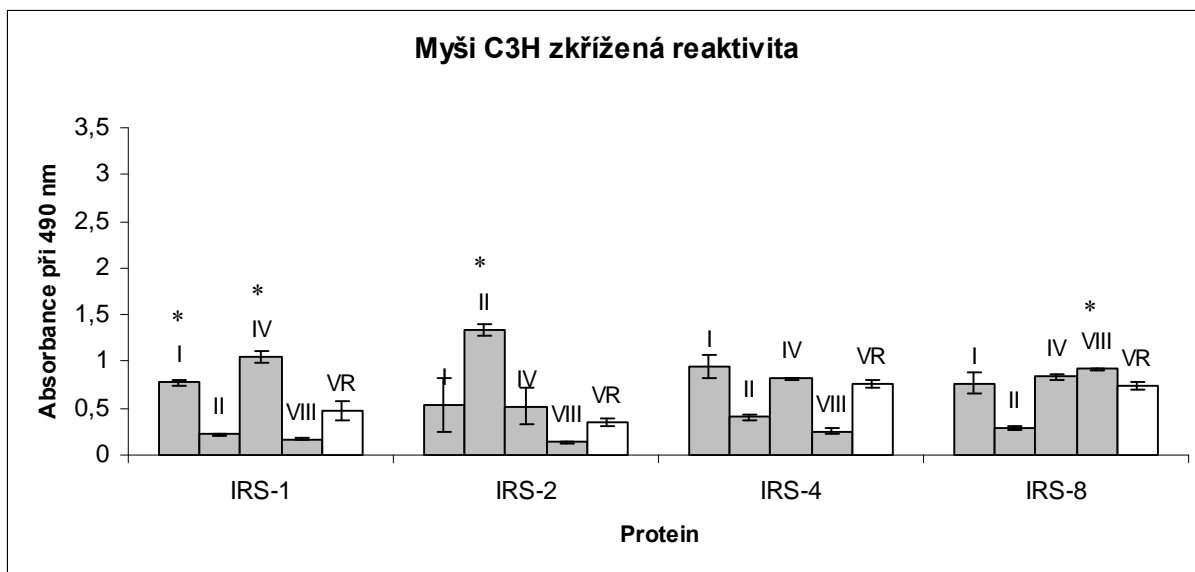
Graf 4: Testování sér kmene myši C3H/HeN.

Proti serpinům IRS-1, IRS-2, IRS-4 a IRS-8 jsou vynesena jednotlivá séra vakcinovaných myši vždy z odpovídající skupiny. IRS-jednotlivá séra myši ze skupin I-1, I-2, I-4 a I-8. VR-sérum myši kontrolní skupiny vakcinované vacVR2001.

S proteinem IRS-1 reagovala silně obě séra skupiny I-1 (více než dvojnásobek reakce kontrolního séra VR). Nejsilnější reakce v rámci testu byla ovšem zaznamenána u serpinu IRS-2. Sérum myši vakcinované vacIRS-2 reagovalo s tímto serpinem pětikrát silněji než kontrolní sérum VR. Výsledek této reakce byl podpořen i výsledkem titračního testu, ve kterém byla reakce séra z I-2 skupiny oproti reakcím ostatních získaných sér detekovatelná ještě při ředění 1:250.

Se serpinem IRS-4 reagovala obě séra myši ze skupiny I-4 slabě (srovnatelně s kontrolním vzorkem VR). Rovněž reakce séra ze skupiny imunizované vacIRS-8 se serpinem IRS-8 (s přihlédnutím k velikosti směrodatné odchylky) je poměrně slabá.

Zkřížená reaktivita s ostatními proteiny byla testována za využití sér, která při prvním testování prokázala nejsilnější reakci. Výsledky testu jsou uvedeny v Grafu 5. U polyklonálních sér inbredních myši C3H/HeN byla stejně jako u outbredních myši CD-1 zaznamenána zkřížená reaktivita s ostatními serpiny.



Graf 5: Testování sér myši kmene C3H/HeN na zkříženou reaktivitu.

Proti serpinům IRS-1, IRS2, IRS-4 a IRS-8 jsou vynesena nejsilnější séra ze všech skupin vakcinovaných myši. **I**-sérum myši vakcinované vacIRS-1, **II**-sérum myši vakcinované vacIRS-2, **IV**-sérum myši vakcinované vacIRS-4, **VIII**-sérum myši vakcinované vacIRS-8, **VR**- sérum myši vakcinované vacVR2001.

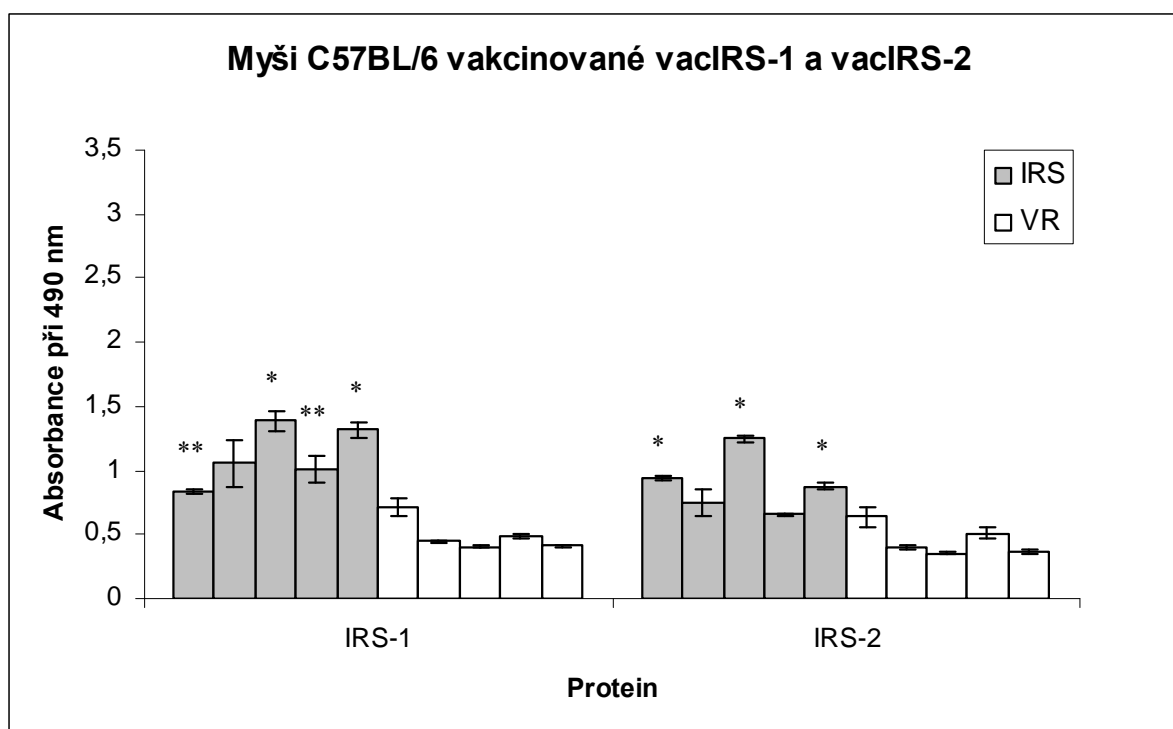
Se serpinem IRS-1 reagovalo sérum ze skupiny I-1 průkazně při porovnání s reakcí kontrolního séra VR. Silnější reakce proti IRS-1 však byla detekována u séra myši vakcinované vacIRS-4. Tato reakce séra skupiny I-4 byla při srovnání s reakcí séra VR dvojnásobně silnější.

S proteinem IRS-2 nejsilněji reagovalo odpovídající sérum ze skupiny I-2. Detekovaná reakce byla čtyřikrát silnější než reakce séra VR. Se serpinem IRS-4 reagovala všechna získaná séra slabě, skupiny I-1 a I-4 byly srovnatelné s VR kontrolní skupinou.

Se serpinem IRS-8 průkazně reagovalo (oproti séru VR) pouze sérum skupiny I-8.

5.3.2.3 Vakcinace myši C57BL/6

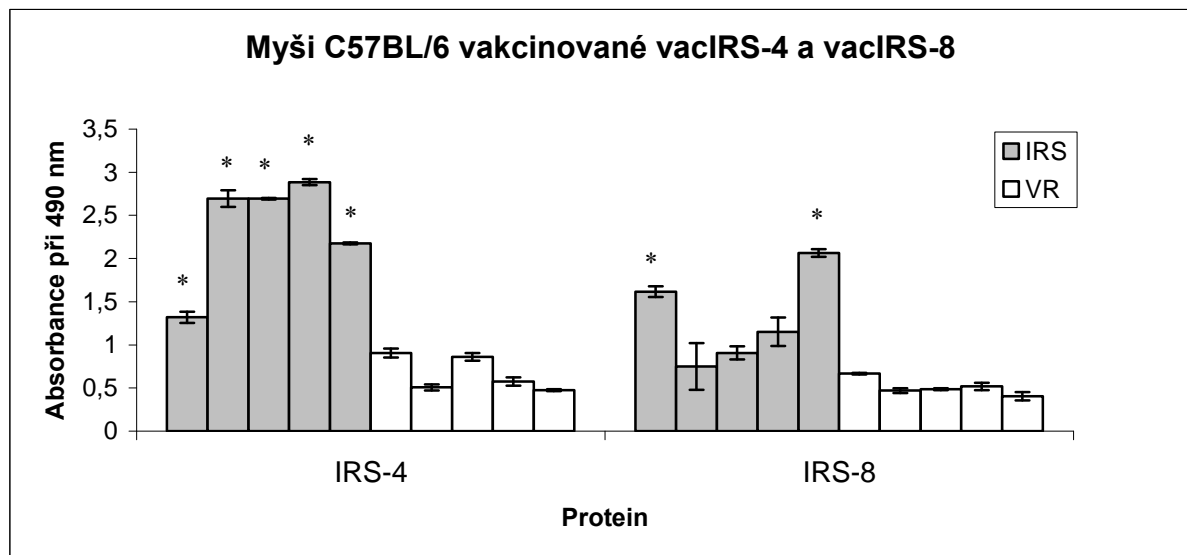
U kmene myši C57BL/6 byly rovněž detekovány protilátky ve všech vakcinovaných skupinách (viz. Grafy 6 a 7). Všechna séra skupin vakcinovaných čtyřmi serpinovými cDNA vakcínami (vacIRS-1, vacIRS-2, vacIRS-4 a vacIRS-8) jsou porovnána se séry kontrolní skupiny myši imunizované vacVR2001.



Graf 6: Testování sér kmene myši C57BL/6 (skupiny I-1 a I-2).

Proti serpinům IRS-1 a IRS-2 jsou vynesena jednotlivá séra vakcinovaných myši vždy z odpovídající skupiny. IRS-jednotlivá séra myši ze skupin I-1 a I-2. VR-séra myši kontrolní skupiny vakcinované vacVR2001.

Proti serpinu IRS-1 měla čtyři z pěti sér ve srovnání s nejsilnějším vzorkem skupiny VR signifikantně vyšší reakci. Dvě séra reagovala oproti nejsilnějšímu VR séru dvakrát silněji. U proteinu IRS-2 byla zaznamenána silnější reakce u tří z pěti sér ze skupiny I-2. Reakce nejsilnějšího séra skupiny I-2 byla dvakrát silnější než reakce nejsilnějšího kontrolního séra VR.



Graf 7: Testování sér kmene myši C57BL/6 skupiny I-4 a I-8.

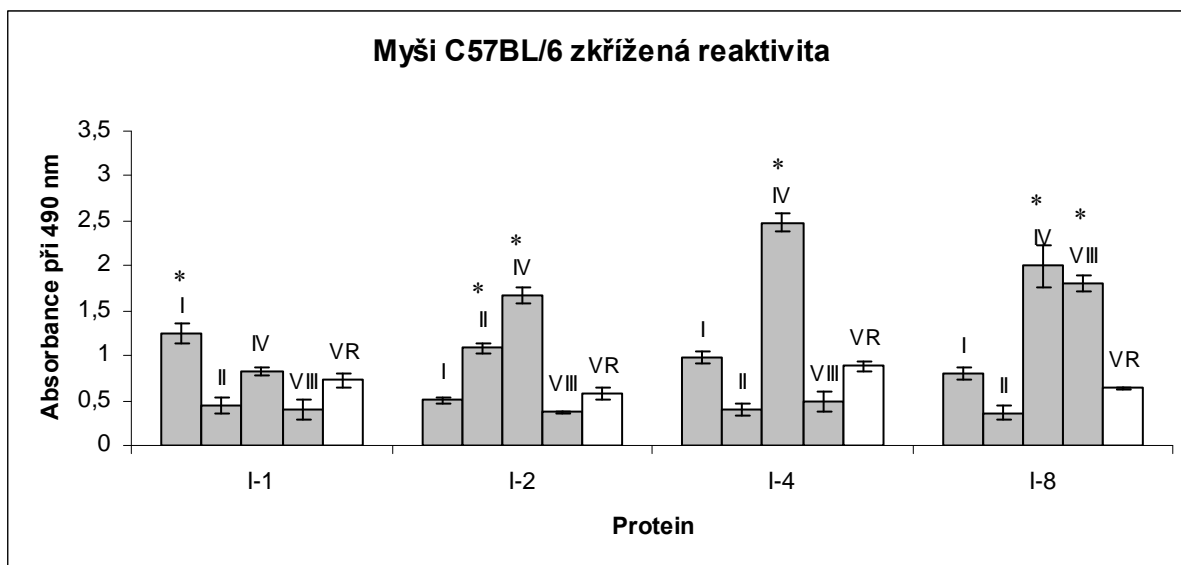
Proti serpinům IRS-1 a IRS-2 jsou vynesena jednotlivá séra vakcinovaných myši vždy z odpovídající skupiny. **IRS**-jednotlivá séra myši ze skupin I-1 a I-2. **VR**-séra myši kontrolní skupiny vakcinované vacVR2001.

Největší reaktivita v rámci testu byla detekována u sér skupiny vakcinované vacIRS-4. Reakce jednotlivých sér skupiny I-4 byly homogenní. Všech pět sér skupiny I-4 ve srovnání s nejsilnějším sérem VR průkazně reagovalo se serpinem IRS-4. Reakce nejsilnějšího I-4 séra byla oproti reakci nejsilnějšího séra VR trojnásobná.

Detekované reakce sér skupiny I-8 proti proteinu IRS-8 byly naopak variabilní. Dvě z pěti sér ve srovnání s nejsilnějším vzorkem skupiny VR vykazovaly signifikantně silnější reakci. Nejsilnější sérum ze skupiny I-8 reagovalo oproti nejsilnějšímu VR séru se serpinem IRS-8 třikrát silněji.

Silná reakce detekovaná u sér vakcinovaných vacIRS-4 byla potvrzena i vytitrováním nejsilnějšího vzorku až na poměr 1:500. Reakce vzorků u ostatních skupin byla detekována pouze do ředění 1:100.

Zkřížená reaktivita byla testována za využití sér z každé skupiny, která při prvním testování prokázala nejsilnější reakci. Výsledky uvádí Graf 8.



Graf 8: Testování sér myši kmene C57BL/6 na zkříženou reaktivitu.

Pozn.: Proti serpinům IRS-1, IRS2, IRS-4 a IRS-8 jsou vynesena nejsilnější séra ze všech skupin vakcinovaných myši. I-sérum myši vakcinované vacIRS-1, II-sérum myši vakcinované vacIRS-2, IV-sérum myši vakcinované vacIRS-4, VIII-sérum myši vakcinované vacIRS-8, VR- sérum myši vakcinované vacVR2001.

Proti serpinu IRS-1 průkazně reagovalo pouze sérum ze skupiny I-1. U serpinu IRS-2 byla při porovnání sér s nejsilnějším kontrolním sérem VR naopak zaznamenána silnější reakce séra ze skupiny I-4. Sérum skupiny I-4 reagovalo s IRS-2 silně. Jeho reakce byla ve srovnání s reakcí séra VR silnější téměř třikrát, zatímco odpovídající sérum skupiny I-2 reagovalo se serpinem IRS-2 pouze dvakrát silněji než sérum VR.

U proteinu IRS-4 byla detekována nejsilnější reakce u séra ze skupiny vakcinované vacIRS-4. Reakce séra skupiny I-4 s IRS-4 byla při porovnání s reakcí séra VR trojnásobně vyšší. Sérum ze skupiny I-4 reagovalo silně rovněž se serpinem IRS-8. Reaktivita sér ze skupiny I-4 a odpovídající skupiny I-8 proti proteinu IRS-8 je srovnatelná, v obou případech je reakce sér třikrát silnější než reakce kontrolního séra VR.

6. Diskuze

V posledních letech bylo díky využití high-throughput přístupu objeveno mnoho nových klíčících molekul (Francischetti a spol., 2009). Výsledkem sialomových projektů, které se zabývaly různými druhy klíšťat, je velký soubor genů, který je potřeba dále rozředit a následně podrobněji charakterizovat expresi a funkci jednotlivých proteinů (Valenzuela, 2002).

Tato diplomová práce navázala na projekt zkoumající sialom klíštěte *Ixodes ricinus* (Chmelař a spol., 2008). V rámci tohoto projektu byla připravena cDNA knihovna ze slinných žláz čtyř fází sání dospělých samic *Ixodes ricinus* (nenasáté samice a samice po jednom, čtyřech a sedmi dnech sání). Ze čtyř získaných knihoven bylo osekvenováno přibližně 600 genů, které byly dále rozříděny podle příbuznosti nebo funkční podobnosti. Získaný unikátní soubor genů je nyní k dispozici pro podrobnější zkoumání funkce jednotlivých proteinů.

Při high-throughput postupu je po přípravě a bioinformatickém zpracování cDNA knihovny jedním z dalších navrhovaných kroků získání protilátek proti jednotlivým proteinům pomocí vakcinace rekombinantním proteinem či DNA vakcinací (Valenzuela, 2002). Vzhledem k náročnosti přípravy rekombinantních proteinů, a s přihlédnutím k dalším potenciálním problémům (například správný refolding) se jeví jako vhodnější metoda pro pilotní výzkum většího množství proteinů DNA vakcinace.

Cílem mojí práce bylo tedy optimalizovat novou metodu cDNA vakcinací pro Laboratoř interakce vektor-hostitel, aby bylo možné rychle a jednoduše získat protilátky proti proteinům slin klíštěte *Ixodes ricinus* využitelné pro další výzkum.

6.1 Příprava cDNA vakcín

Z připravené cDNA knihovny byly nejprve vybrány geny c14 a IRS-1. Výsledky vakcinačních pokusů s těmito proteiny však nebyly příliš úspěšné, takže další experimenty byly provedeny s geny IRS-1, IRS-2, IRS-4 a IRS-8.

Všechny geny z cDNA knihovny sialomu *I. ricinus*, které jsme vybrali pro DNA vakcinace, byly zaklonovány do expresního plazmidu VR2001. Vektor VR2001 obsahuje gen pro rezistenci na kanamycin a cytomegalovirový promotor. CMV promotor je silným promotorem, který je v expresních vektorech zkonstruovaných pro DNA vakcíny často

používán. Promotory virového původu zajišťují *in vivo* systémech větší expresi zaklonovaných genů, než kterékoli jiné eukaryotní promotory (Garmory a spol., 2003).

Zkonstruované cDNA vakcíny byly izolovány z bakterií *E. coli* purifikačním kitem eliminujícím z izolované DNA bakteriální endotoxin lipopolysacharid. Tento krok je při přípravě DNA vakcín nezbytný, protože LPS vyvolává u obratlovců bouřlivou imunitní odpověď, projevující se vysokou horečkou, která může vést až k orgánovému selhání a smrti. Přítomnost a množství LPS bylo v připravených vakcínách ověřeno LAL testem. Několik ng LPS v jedné vakcinační dávce může být při imunizaci dokonce prospěšné, protože LPS účinkuje jako nespecifický mitogen buněk imunitního systému obratlovce, a tak vlastně v DNA vakcíně funguje jako adjuvans.

6.1.2 Kandidáti pro cDNA vakcinaci

Vybraný gen contig 14 je exprimován čtvrtý den po přisátí klíštěte (ve střední fázi sání), gen kóduje malý 5kDa peptid, který patří mezi tzv. Collagen-like secreted proteins (CLSP). CLSP tvoří rodinu proteinů, která je během sání klíštěte nejvíce upregulována, exprese jednotlivých proteinů je závislá na fázi sání. Jedná se o malé peptidy (u *Ixodes ricinus* 4,4 - 5,5 kDa), které jsou stejně jako kolagen bohaté na aminokyseliny glycin a prolin. Tyto motivy by teoreticky mohly být cílem hydroxylace, stejného procesu, při kterém vznikají kolagenová vlákna. Jejich funkce je prozatím neznámá, předpokládá se, že mohou hrát roli při přichycení klíštěte, nebo narušovat tvorbu kolagenu u hostitele (Chmelař a spol., 2008). Homologické CLSP proteiny byly objeveny u klíšťat *I. scapularis* (Ribeiro a spol., 2006) a *I. pacificus* (Francischetti a spol., 2005).

Geny označené IRS-1, IRS-2, IRS-4 a IRS-8 kódují proteiny z nadrodiny serpinů, která je podrobněji popsána v oddílu Literární přehled. Serpiny byly již zkoumány u několika druhů klíšťat jako potenciální kandidáti pro vývoj protiklíštěcí vakcíny (Francischetti a spol., 2009).

U druhu *I. ricinus* byl objeven intracelulární serpin o velikosti 44 kDa, který byl nazván Iris (*I. ricinus* immunosuppressor). Připravený rekombinantní protein měl inhibiční účinky na proliferaci myších lymfocytů, snížil produkci některých prozánětlivých cytokinů produkovaných T-lymfocyty, antigen prezentujícími buňkami a makrofágy. Celkové výsledky testů naznačují, že Iris moduluje imunitní odpověď hostitele směrem k Th2, která je proti sajícímu klíštěti méně účinná (Lebouille a spol., 2002). Později byla u tohoto proteinu prokázána i slabá antihemostatická aktivita. Iris se tak stal první klíštěcí molekulou s prokázanými imunomodulačními i antihemostatickými účinky (Prevot a spol., 2006).

Přestože Iris nenes signální peptid, bylo popsáno, že je tento serpin indukován sáním klíštěte na hostiteli a přítomen ve slinách dospělců i nymf (Lebouille a spol., 2002; Prevot a spol., 2007). Imunizace rekombinantním proteinem vyvolala u vakcinovaných zvířat tvorbu protilátek a protektivní imunitní odpověď, která vedla ke snížení hmotnosti, prodloužení času sání a k 30% úmrtnosti sajících klíšťat (Prevot a spol., 2007).

Séra proti Iris navíc skříženě reagovala s dalším proteinem z klíštěcích slin o přibližné velikosti 54 kDa (Prevot a spol., 2007). Toto zjištění naznačuje, že intracelulární proteiny se mohou dostávat do klíštěcích slin, nebo že je ve slinách klíšťat exprimována multigenní proteinová rodina a séra proti Iris tak rozeznávají jiný, ale antigenně příbuzný serpin *I. ricinus* (Prevot a spol., 2007; Francischetti a spol., 2009).

Kandidáti pro cDNA vakcinaci serpiny IRS-1 a IRS-8 jsou exprimovány ve slinných žlázách klíštěte *Ixodes ricinus* během celého procesu sání. IRS-2 je ve slinných žlázách exprimován nejvíce šestý den po přisátí klíštěte, jeho exprese byla rovněž zaznamenána ve střevech a ováriích sajících klíšťat. K největší expresi serpinu IRS-4 dochází ve slinných žlázách plně nasátých klíšťat, je však exprimován i ve střevech sajících klíšťat (Chmelař, nepublikované výsledky).

6.2 Injikace klíštěcích slin

Pokus s injikací klíštěcích slin provedený v rámci prvního imunizačního experimentu měl simulovat sání dospělých samic *I. ricinus* na myších. Obecně vystavení hostitele infekci parazitem je součástí protokolu ELI (Expression library immunization, Barry a spol., 2004) navrženého pro jakéhokoliv parazita, a obdobný postup byl rovněž použit při testování imunity proti slinám *Phlebotomus papatasi*, kdy byly uši myši vystaveny sání případně do nich byl injikován homogenát slinných žláz tohoto vektora (Valenzuela a spol., 2001). Setkání hostitele s patogenem (parazitem) má prověřit imunitní odpověď vyvolanou DNA vakcinací (Barry a spol., 2004).

Sání klíšťat na myších přitom muselo být nahrazeno injikací klíštěcích slin, protože infestace dospělců klíšťat na laboratorních myších by mohla vést k úhynu zvířat. Zároveň sání dospělců nemohlo být nahrazeno sáním nymf, protože cDNA vakcíny byly připraveny z cDNA dospělých samic. Předpokládali jsme, že u skupin vakcinovaných vacIRS-1 a vacC14 (do pravého ucha myši) dojde na místě vpichu slin (levé ucho) k vytvoření zánětu, oproti kontrolní skupině vakcinované vacGFP. Touto reakcí by byl potvrzen vznik imunitní odpovědi proti antigenům z klíštěcích slin vyvolané cDNA vakcinací. Vytvoření zánětu na

levém uchu myši by zároveň potvrdilo, že tato odpověď není lokalizována na jedno místo na kůži vakcinovaného zvířete, ale je celosystémová. K očekávané reakci však nedošlo, což je diskutováno v následující kapitole.

6.3 Optimalizace procesu cDNA vakcinace

Při vakcinačních pokusech byl využit protokol vytvořený pro imunizaci proteiny slin přenašeče leishmaniózy *Phlebotomus papatasi* (Valenzuela a spol., 2001). Přestože jsou většinou DNA vakcíny aplikovány intramuskulárně (Garmory a spol., 2005), jak tomu bylo i při úplně prvním použití této technologie (Atanasiu, 1962), byly myši všech použitých kmenů a skupin vakcinovány intradermálně do ucha.

Intradermální aplikace má totiž oproti intramuskulární několik výhod. Ve svalové tkáni je celkové množství antigen prezentujících buněk nižší a svalové buňky přímo transfekované plazmidovou DNA postrádají potřebné kostimulační molekuly, k vyvolání imunitní odpovědi je tak potřeba větší množství DNA. Při intradermální aplikaci mají k injikované DNA lepší přístup antigen-prezentující buňky (Langerhansovy dendritické buňky) a úspěšné vakcinaci je tedy dostačující dávka v řádech desítek μg DNA (McAllister a Proll, 2004). Navíc produkce antigenu v kůži více odpovídá situaci, kdy jsou proteiny vpraveny do hostitele spolu s klíštěcími slinami.

K prvním vakcinačním pokusům sloužícím k optimalizaci celé metody byly vybrány dva kmeny myši, inbrední myši kmene BALB/c a outbrední CD-1, které byly vakcinovány připravenými cDNA vakcínami vacC14 a vacIRS-1. Kontrolní skupiny obou kmenů byly vakcinovány vacGFP. U outbredních myši CD-1 byla detekována slabá reakce proti serpinu IRS-1. U myši BALB/c nebyla zjištěna žádná protilátková odpověď.

V případě vakcinace vacC14 je otázkou, jestli predikovaná velikost exprimovaného proteinu (5 kDa), který gen kóduje, nemohla být právě tím problémem při vytváření imunitní odpovědi. Proteiny o velikosti 5-10 kDa jsou totiž obecně málo imunogenní (Krejsek a Kopecký, 2004).

Protilátková odpověď nebyla však detekována ani u kontrolních skupin vakcinovaných proti GFP. Je tedy možné, že množství injikované plazmidové DNA (10 μg), a použité vakcinační schéma, při kterém byly myši vakcinovány pouze dvěma dávkami cDNA vakcíny, nevedlo ke vzniku dostatečně silné protilátkové odpovědi ani u jedné z imunizovaných skupin. Při dalších experimentech byla tedy koncentrace DNA ve vakcinační dávce zvýšena a myši byly imunizovány třetí dávkou cDNA vakcíny.

V dalším pokusech jsme tedy pokračovali s imunizací myši outbredního kmene CD-1 (u kterého byla detekována slabá reakce proti IRS-1) a vakcinační schéma bylo upraveno tak, že k účinnému vyvolání imunitní odpovědi byly myši vakcinovány třetí dávkou cDNA vakcín místo klíštěcími slinami a dávka cDNA vakcíny byla zvýšena z 10 µg na 20 µg. K vakcinaci jsme vybrali opět gen IRS-1 a dále připravili cDNA vakcíny z genů ze stejné proteinové nadrodiny serpinů IRS-2, IRS-4 a IRS-8.

Připravenými cDNA vakcínami a za použití modifikovaného protokolu byly imunizovány myši kmene CD-1 a inbrední kmeny C3H/HeN a C57BL/6. Během pokusu však došlo k neočekávanému úmrtí několika CD-1 a mnoha C3H/HeN myší, pravděpodobně důsledkem použití inhalačního anestetika Narcotanu, u kterého je velmi úzké rozmezí mezi účinnou a letální dávkou. Z vakcinace myši kmene C3H/HeN jsme tedy nezískali dostatečný počet sér k dostatečnému průkazu účinnosti imunizace připravenými cDNA vakcínami. Rovněž počet výsledných vzorků u kmene CD-1 byl snížen. V posledním experimentu s kmenem myši C57BL/6 byla tedy i přes větší náročnost využita anestézie intraperitoneální.

6.4 Testování imunitní odpovědi vyvolané cDNA vakcínou

Získaná séra z prvních vakcinačních pokusů s vacC14 a vacIRS-1 byla testována metodou Western blot, která se běžně používá k testování protilátek vyvolaných cDNA vakcinací (Almazán a spol., 2003). Polyklonální séra byla nejprve ředěna 1:100 poté 1:10. Jako antigeny byly použity rekombinantní proteiny připravené v savčích CHO buňkách. Jediné detekované protilátky byly ze sér myši kmene CD-1 při ředění 1:10. V použitém testu se navíc objevila nespecifita o přibližné velikosti 66 kDa, která by mohla být vysvětlena tím, že protilátky ze sér reagovaly zkříženě s nějakým proteinem z buněk CHO použitých pro přípravu rekombinantních proteinů, či z jejich kultivačního média. Tuto metodu jsme tedy pro primární testování polyklonálních protilátek shledali jako nevhodnou. Výsledky z těchto pokusů nejsou v práci uvedeny.

Myší séra získaná z dalších vakcinačních experimentů byla tedy testována citlivější metodou ELISA, která je vhodnější pro testování většího množství vzorků. Jako antigeny byly použity rekombinantní proteiny připravené v bakteriích *E. coli*. Nejprve byly testovány všechny vzorky při ředění 1:100, na základě výsledků prvního testu byla vybrána séra z nejsilnější odpovědi, u těch pak byl zjišťován titer protilátek a případná zkřížená reaktivita proti ostatním připraveným rekombinantním proteinům.

6.5 Výsledky imunizace serpinovými cDNA vakcínami

Protilátky proti serpinům vyvolané cDNA vakcinací byly zjištěny metodou ELISA u outbredního kmene CD-1 i u inbredních kmenů C3H/HeN a C57BL/6. Reakce proti antigenu (bakteriálními lyzáty obsahujícím rekombinantní proteiny) byla zaznamenána rovněž u sér kontrolní skupiny VR vakcinované prázdným vektorem VR2001.

Přítomnost zvýšené reaktivity sér z kontrolních skupin VR by mohla být vysvětlena několika způsoby. Je možné, že i při vakcinaci prázdným vektorem VR2001 dochází k expresi vektorového signálního peptidu TPA (tissue plasminogen activator) a myši jsou jím imunizovány. Použité cDNA vakcíny mohou být při izolaci rovněž kontaminovány malým množstvím bakteriálních proteinů. Případně také může docházet k nespecifické zkřížené reakci polyklonálních sér.

6.5.1 Porovnání výsledků reakcí sér kmenů CD-1, C3H/HeN a C57BL/6

Grafy 9 až 10 shrnují výsledky detekovaných reakcí sér ze skupin I-1, I-2, I-4 a I-8.

Specifita získaných sér byla vyhodnocena na základě testu zkřížené reaktivity. Testovaná séra nebyla striktně specifická proti jednotlivým serpinům, tato reakce však mohla být očekávána, vzhledem k tomu, že serpiny použité pro cDNA vakcinací patří do stejné proteinové rodiny. Jejich terciární struktura je podobná, je tedy pravděpodobné, že sdílejí některé imunodominantní epitopy.

Séra všech imunizovaných myší reagovala poměrně specificky se serpinem IRS-2. Séra myší CD-1 a C57/BL/6 skupin I-8 reagovala rovněž nejspecifičtěji s IRS-8.

Oproti tomu séra skupin I-1 vykazovala zkříženou reaktivitu proti IRS-4. Je možné, že serpin IRS-4 nese imunodominantní epitop, se kterým zkříženě reagují séra myší vakcinovaných vacIRS-1. Při testování myší C3H/HeN na zkříženou reaktivitu přitom reagovalo sérum proti IRS-4 silněji proti proteinu IRS-1 než proti samotnému IRS-4.

Reakce polyklonálních sér kmene myší C3H/HeN a kmene CD-1 mají v odpovědi na imunizaci proti IRS-1, IRS-2 a IRS-4 podobný trend. Reakce séra myší C57BL/6 se liší od obou kmenů především ve skupině I-4. Sérum myší C57BL/6 ze skupiny I-4 zkříženě reagovalo s IRS-2 a IRS-8. Je možné, že imunizace myší C57BL/6 vacIRS-4 tedy vyvolala u těchto myší tvorbu protilátek proti epitopu antigeně příbuznému epitopům IRS-2 a IRS-8.

Z výsledků všech provedených pokusů lze usoudit, že optimalizovanou metodu cDNA vakcinace lze pro rychlé získání protilátek využít, získané protilátky jsou však poměrně

nespecifické, je nutno počítat s jejich zkříženou reaktivitou. Ta je ale s největší pravděpodobností způsobena tím, že imunizační pokusy byly provedeny s příbuznými proteiny. Rovněž bylo zjištěno, že dochází k imunitní odpovědi na samotnou cDNA vakcínu (u skupin VR). V experimentech je tedy vždy nezbytná přítomnost pozitivní kontrolní skupiny vakcinované prázdným vektorem, aby bylo možno ostatní testovaná séra s tímto vzorkem porovnat.

7. Souhrn

Byly připraveny cDNA vakcíny s geny c14, IRS-1,IRS-2,IRS-4 a IRS-8. K vakcinačním pokusům byly vybrány myši outbredního kmene CD-1 a myši inbredních kmenů BALB/c, C3H/HeN a C57BL/6. Vakcinační schéma a metoda k testování imunity vyvolané cDNA vakcinací byly optimalizovány. Nejvýhodnějším zvoleným postupem k získání protilátek proti proteinům klíštěcích slin bylo vakcinování 20 µg plazmidové DNA intradermálně do ucha myši, třikrát po čtrnácti dnech, při použití prázdného vektoru jako kontroly a v experimentech použit intraperitoneální způsob anestézie. Pro citlivé a rychlé otestování protilátkové odpovědi je vhodná metoda ELISA za použití proteinů připravených rekombinantně v bakteriích a při ředění testovaných sér 1:100. Při dodržení tohoto postupu byla úspěšně vyvolána a následně detekována protilátková imunitní odpověď proti IRS-1,IRS-2, IRS-4,IRS-8 u kmene myši CD-1 C3H/HeN a C57BL/6.

8. Citovaná literatura

- ALARCON-CHAIDEZ, F. J., SUN, J., WIKEL, S. K. 2007. Transcriptome analysis of the salivary glands of *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37: 48-71
- ALLEN, J. R., KHALIL, H. M., WIKEL, S. K. 1979. Langerhans cells trap tick salivary gland antigens in tick-resistant guinea pigs. *Journal of Immunology* 122: 563-565
- ALLEN, J. R. 1973. Tick resistance: basophils in skin reactions of resistant guinea pigs. *International Journal for Parasitology* 3: 195-200
- ALMAZÁN, C., KOCAN, K. M., BERGMAN, D. K., GARCIA-GARCIA, J. C., BLOUIN, E. F., DE LA FUENTE, J. 2003. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine* 21: 1492-1501
- ALMAZÁN, C., BLAS-MACHADO, U., KOCAN, K. M., YOSHIOKA, J. H., BLOUIN, E. F., MANGOLD, A. J., DE LA FUENTE, J. 2005a. Characterization of three *Ixodes scapularis* cDNAs protective against tick infestations. *Vaccine* 23: 4403-4416
- ALMAZÁN, C., KOCAN, K. M., BLOUIN, E. F., DE LA FUENTE, J. 2005b. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine* 46-47: 5294-5298
- ANGUITA, J., RAMAMOORTHY, N., HOVIUS, J. W. R., DAS, S., THOMAS, V., PERSINSKI, R., CONZE, D., ASKENASE, P. W., RINCÓN, M., KANTOR, F. S., FIKRIG, E. 2002. Salp15, an *Ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4+ T cell activation. *Immunity* 16: 849-859
- ATANASIU, P., ORTH, G., REBIERE, J. P., BOIRON, M., PAOLETTI, C. 1962. Production of tumors in the hamster by inoculation of desoxyribonucleic acid extracted from tissue cultures infected with polyoma virus. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des sciences* 254: 4228-4230
- AZZOLINI, S. S., SASAKI, S. D., TORQUATO, R. J., ANDREOTTI, R., ANDREOTTI, E., TANAKA, A. S. 2003. *Rhipicephalus sanguineus* trypsin inhibitors present in the tick larvae: isolation, characterization and partial primary structure determination. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 417: 176-182
- BARRY, M. A., LAI, W. C., JOHNSTON, S. A. 1995. Protection against mycoplasma infection using expression library immunization: A general approach to vaccine development. *Nature* 377: 632-635

- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- BARRY, M. A., HOWELL, D. P. G., ANDERSSON, H. A., CHEN, J. L., SINGH, R. A. 2004. Expression library immunization to discover and improve valine antigens *Immunological reviews* 199: 68-83
- 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. *Journal of Parasitology* 86: 516-525
- BOWMAN, A. S., COONS, L. B., NEEDHAM, G. R., SAUER J. R. 1997. Tick saliva: Recent advances and implications for vector competence. *Medical and Veterinary Entomology* 11: 277-285
- 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
- BROWN, S. J. 1985. Immunology of acquired resistance to ticks. *Parasitology Today* 1:166-171
- DAS, S., MARCANTONIO, N., DEPONTE, K., TELFORD, S. R. 3RD, ANDERSON, J. F., KANTOR, F. S., FIKRIG, E. 2000. Salp16, a gene induced in *Ixodes scapularis* salivary glands during tick feeding. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 62: 99-105
- DIZIJ, A., KURTENBACH, K. 1995. *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus avicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. *Parasite Immunology* 17: 177-183
- FIVAZ, B. H. 1989. Immune suppression induced by the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901. *Journal of Parasitology* 75: 946-952
- FRAGOSO, H., RAD, P. H., ORTIZ, M., RODRÍGUEZ, M., REDONDO, M., HERRERA, L., DE LA FUENTE, J. 1998. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *Vaccine* 16: 1990-1992
- FRANCISCHETTI, I. M., MY PHAM, V., MANS B. J., ANDERSEN, J. F., MATHER, T. N., LANE, R. S., RIBEIRO J. M. C. 2005. The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 1142-1161
- FRANCISCHETTI, I. M. B., SA-NUNES, A., MANS, B. J., SANTOS, I. M., RIBEIRO, J. M. C. 2009. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience* 14: 2051-2088.

- FRELIN, L., SÄLLBERG, M. 2009. Meeting report: A small step closer to the Holy Grail of DNA vaccines: undisputed clinical benefit in humans. *Genome Medicine* 15
- DE LA FUENTE, J., ALMAZÁN, C., BLAS-MACHADO, U., NARANJO, V., MANGOLD, A. J., BLOUIN, E. F., GORTAZAR, CH., KOCAN, K. M. 2006. The tick protective antigen, 4D8, is a conserved protein involved in modulation of tick blood ingestion and reproduction. *Vaccine* 24: 4082-4095
- DE LA FUENTE, J., KOCAN, K. M., BLOUIN, E. F. 2007. Tick vaccines and the transmission of tick-borne pathogens. *Veterinary Research Communications* 31: 85-90
- GARDINER, W. P., GETTINBY, G. 1981. Models based on weather for the development phases of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. *Veterinary Parasitology* 9: 75-86
- GARMORY, H. S., BROWN, K. A., TITBALL, R. W. 2003. DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genetic Vaccines and Therapy* 1:2
- GARMORY, H. S., PERKINS, S. D., PHILLPOTTS, J., TITBAL, R. W. 2005. DNA vaccines for biodefence. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57: 1343-1361
- GETTINS, P. G. W. 2002 Serpin Structure, Mechanism, and Function. *Chemical Reviews* 102: 4751-4804
- GILLESPIE, R. D., MBOW, M. L., TITUS, R. G. 2000. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunology* 22: 319-331
- GILLESPIE, R. D., DOLAN, M. C., PIESMAN, J., TITUS, R. G. 2001. Identification of an IL-2 Binding Protein in the Saliva of the Lyme Disease Vector Tick, *Ixodes scapularis*. *The Journal of Immunology* 166: 4319-4327
- GORDON, J. R., ALLEN, J. R. 1991. Nonspecific activation of complement factor 5 by isolated Dermacentor andersoni salivary antigens. *Journal of Parasitology* 77: 296-301
- GRAY, J. S., KIRSTEIN, F., ROBERTSON, J. N., STEIN, J., KAHL, O. 1999. Borrelia burgdorferi sensu lato in Ixodes ricinus ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. *Experimental and Applied Acarology* 23: 717-729
- HOLLISTER, W.S., CANNING, E.U. 1987. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and its use in determination of infections in man. *Parasitology* 94: 209-219
- IMAMURA, S., DA SILVA VAZ JUNIOR, I., SUGINO, M., OHASHI, K., ONUMA, M. 2005. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine* 23: 1301-1311
- IMAMURA, S., KONNAI, S., DA SILVA VAZ JUNIOR, I., YAMADA, I., NAKAJIMA, CH., ITO, Y., TAJIMA, T., YASUDA, J. SIMUUNZA, M., ONUMA, M., OHASHI, K. 2008. Effects of anti-

- tick cocktail vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. *Japanese Journal of Veterinary Research* 56: 85-98
- IMAMURA, S., KONNAI, S., NAKAJIMA, CH., YAMADA, S., ITO, Y., OHASHI, K., ONUMA M. 2009. Development of an anti-tick vaccine to protect cattle against tick-borne transmission of *Theileria parva*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128: 211-347
- IVORY, K., CHADEE, C. 2004. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genetic Vaccines and Therapy* 17
- CHAMPAGNE, D. E. 1994. The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission. *Parasitology Today* 10: 430-433
- CHAMPAGNE, D. E. 2005. Antihemostatic Molecules from Saliva of Blood-Feeding Arthropods. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis* 34: 221-227
- CHMELARŇ, J., ANDERSON, J. M., JIANBING, M., JOCHIM, R. C., VALENZUELA, J. G., KOPECKÝ, J. 2008. Insight into the sialome of the castor bean tick. *Ixodes ricinus*. *BMC Genomics* 9: 233-254
- CHRISTE, M., RUTTI, B., BROSSARD, M. 1999. Influence of the genetic background and parasite load of mice on the immune response developed against nymphs of *Ixodes ricinus*. *Parasitological Research* 85: 557-561
- JONES, L. D., HODGSON, E., NUTTALL, P. A. 1989. Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *Journal of General Virology* 70: 1895-1898
- JONES, L. D., HODGSON, E., WILLIAMS, T., HIGGS, S., NUTTALL, P. A. 1992. Saliva activated transmission (SAT) of Thogoto virus: relationship with vector potential of different haematophagous arthropods. *Medical and Veterinary Entomology* 6: 261-265
- KATO, N., IWANAGA, S., OKAYAMA, T., ISAWA, H., YUDA, M., CHINZEI, Y. 2005. Identification and characterization of the plasma kallikrein-kinin system inhibitor, haemaphysalin, from hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Thrombosis and Haemostasis* 93: 359-367
- KAUFMAN W. R. 1989. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts, *Parasitology Today* 5: 47-56
- KOPECKÝ, J., KUTHEJLOVÁ, M. 1998. Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro. *Parasite Immunology* 20: 169-174
- KOPECKÝ, J., KUTHEJLOVÁ, M., PECHOVÁ J. 1999. Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks inhibits production of interferon-gamma by the upregulation of interleukin-10. *Parasite Immunology* 21: 351-356

- KOTSYFAKIS, M., ANDERSON, J. M., ANDERSEN, J. F., CALVO, E., FRANCISCHETTI, I. M. B., MATHER, T. N., VALENZUELA, J. G., RIBEIRO, J. M. C. 2008. Cutting edge: Immunity against a „silent“ salivary antigen of the Lyme Vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *Journal of Immunology* 181: 5209-5212
- KOVÁŘ, L. 2004. Tick saliva in anti-tick immunity and pathogen transmission. *Folia Microbiologica* 49: 327-336
- KREJSEK, J., KOPECKÝ, O. 2004. Klinická imunologie. Nucleus HK, pp. 73-85; 869-898
- LABUDA, M., JONES, L. D., WILLIAMS, T., NUTTALL, P. A. 1993. Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Medical and Veterinary Entomology* 7: 193-196
- LABUDA, M., KOZUCH, O., ZUFFOVA, E., ELECKOVA, E., HAILS, R. S., NUTTALL, P. A. 1997. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. *Virology* 235: 138-143
- LABUDA, M., TRIMNELL, A. R., LICKOVA, M., KAZIMIROVA, M., DAVIES, G. M., LISSINA, O., HAILS, R. S., NUTTALL, P.A. 2006. An antivector vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathogens* 2: 251-259
- LAW, J. H., RIBEIRO, J. M. C., WELLS, M. A. 1992. Biochemical insights derived from insect diversity. *Annual Review of Biochemistry* 64: 87-111
- LEBOULLE, G., CRIPPA, M., DECREM, Y., MEJRI, N., BROSSARD, M., BOLLEN, A., GODFROID, E. 2002. Characterization of novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Biological Chemistry* 277: 10083-10089
- 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. *Journal of Biological Chemistry* 277: 21371-21378
- MARITZ-OLIVIER, C., STUTZER, C., JONGEJAN, F., NEITZ, A. W. H., GASPAR, A. R. M. 2007. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends in Parasitology* 23: 397-407
- MATERNA, J., DANIEL, M., METELKA, L., HARČARIK, J. 2008. The vertical distribution, density and the development of the tick *Ixodes ricinus* in mountain areas influenced by climate changes (The Krkonoše Mts., Czech Republic). *International Journal of Medical Microbiology* 298: 25-37
- MCALLISTER, J., PROLL, D. 2004. Comparison of DNA Vaccine Delivery Systems: Intramuscular Injection Versus Gene Gun Administration. *DSTO Platforms Sciences Laboratory, Fishermans Bend, Australia*

- MONTGOMERY, D. L., ULMER, J. B., DONNELLY, J. J., LIU, M. A. 1997. DNA vaccines. *Pharmacology and Therapeutics* 74: 195-205.
- MOTAMENI, A.-R. T., JUNCADELLA, I. J., ANANTHANARAYANAN, S. K., HEDRICK, M. N., HUET-HUDSON, Y., ANGUITA, J. 2004. Delivery of the immunosuppressive antigen Salp15 to antigen-presenting cells by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *aroA* mutants. *Infection and Immunity* 72: 3638-3642
- MOSMANN, T. R., COFFMAN, R. L. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Advances in Immunology* 46: 111-147
- MULENGA, A., SUGIMOTO, C., ONUMA, M. 2000. Issues in tick vaccine development: Identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and Infection* 2: 1353-1361
- NENE, V., LEE, D., QUACKENBUSH, J., SKILTON, R., MWAURA, S., GARDNER, M. J., BISHOP, R. 2002. AvGI, an index of genes transcribed in the salivary glands of the ixodid tick *Amblyomma variegatum*. *International Journal for Parasitology* 32: 1447-1456
- NIENABER, J., GASPAR, A. R. M. D., NEITZ, A. W. H. 1999. Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Experimental Parasitology* 93: 82-91
- NUTTALL, P. A. 1998. Displaced tick-parasite interactions at the host interface. *Parasitology* 116: 65-72
- NUTTALL, P. A., TRIMNELL, A. R., KAZIMIROVA, M., LABUDA, M. 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology* 28: 155-163
- OGDEN, N. H., CASEY, A. N., FRENCH, N. P., BOWN, K. J., ADAMS, J. D., WOLDEHIWET, Z. 2002. Natural *Ehrlichia phagocytophila* transmission coefficients from sheep 'carriers' to *Ixodes ricinus* ticks vary with the numbers of feeding ticks. *Parasitology* 124: 127-136
- OLIVEIRA, C. J. F., CAVASSANI, K. A., ALIBERTI, J. C. S., SILVA, J. S., FERREIRA, B. R. 2009. Tick saliva suppresses dendritic cell migration by regulating chemokine activity and chemokine receptor expression *Veterinary Immunology and Immunopathology* 128: 211-347
- OLSÉN, B., JAENSON, T. G., BERGSTROM, S. 1995. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3082-3087

- PAESEN, G. C., ADAMS, P. L., HARLOS, K., NUTTALL, P. A., STUART, D. I. 1999. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Molecular Cell* 3: 661-671
- PAINE, S. H., KEMP, D. H., ALLEN, J. R. 1983. In vitro feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and other mediators. *Parasitology* 86: 419-428
- PAVEGLIO, S. A., ALLARD, J., MAYETTE, J., WHITTAKER, L. A., JUNCADILLA, I., ANGUIA, J., POYNTER, M. E. 2007. The tick salivary protein, Salp15, inhibits the development of experimental asthma. *Journal of Immunology* 178: 7064-7071
- POTEMPA, J., KORZUS, E., TRAVIS, J. 1994 The serpin superfamily of proteinase inhibitors: Structure, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry* 269: 15957-15960
- PREVOT, P. P., ADAM, B., BOUDJELTIA, K. Z., BROSSARD, M., LINS, L., CAUCHIE, P., BRASSEUR, R., VANHAEVERBEEK, M., VANHAMME, L., GODFROID, E. 2006. Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *Journal of Biological Chemistry* 281: 26361-26369
- PREVOT, P. P., COUVREUR, B., DENIS, V., BROSSARD, M., VANHAMME, L., GODFROID, E. 2007. Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine* 25: 3284-3292
- RAMACHANDRA, R. N., WIKEL, S. K. 1992. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *Journal of Medical Entomology* 29: 818-826
- RAMAMOORTHY, N., NARASIMHAN, S., PAL, U., BAO, F., YANG, X. F., FISH, D., ANGUIA, J., NORGDARD, 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. C. 1987. *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Experimental Parasitology* 64: 347-353
- RIBEIRO, J. M. C. 1989. Role of saliva in tick/host interactions. *Experimental and Applied Acarology* 7: 15-20
- RIBEIRO, J. M. C., FRANCISCHETTI, I. M. B. 2003. Role of Arthropod saliva in bloodfeeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. *Annual Review of Entomology* 48: 73-88
- RIBEIRO, J. M. C., MATHER, T. N. 1998: *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase. *Experimental Parasitology* 89: 213-221
- RIBEIRO, J. M. C., SPIELMAN A. 1986. *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. *Experimental Parasitology* 62: 292-297

- RIBEIRO, J. M. C., MAKOUL, G. T., LEVINE, J., ROBINSON, D. R., SPIELMAN, A. 1985. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *Journal of Experimental Medicine* 161: 332-344
- RIBEIRO, J. M. C., WEIS, J. J., TELFORD, S. R. 3RD. 1990. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Experimental Parasitology* 70: 382-388
- RIBEIRO, J. M. C., 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 Biochemistry and Molecular Biology* 36: 111-129
- RUTTI, B., BROSSARD, M. 1992. Vaccination of cattle against *Rhipicephalus appendiculatus* with detergent solubilized tick tissue proteins and purified 20 kDa protein. *Annales de parasitologie humaine et comparée* 67: 50-54
- TALAAAT, A. M., STEMKE-HALE, K. 2005. Expression Library Immunization: a Road Map for Discovery of Vaccines against Infectious Diseases. *Infection and Immunity* 73: 7089-7098
- TANAKA, A. S., ANDREOTTIM, R., GOMES, A., TORQUATO, R. J., SAMPAIO, M. U., SAMPAIO, C. A. 1999. A double headed serine proteinase inhibitor - human plasma kallikrein and elastase inhibitor – from *Boophilus microplus* larvae. *Immunopharmacology* 45: 171-177
- TANG, D., DEVIT, M., JOHNSTON, S. A. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152-154
- TITUS, R. G., BISHOP, J. V., MEJIA, J. S. 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen. *Parasite Immunology* 28: 131-141
- TRIMNELL, A. R., DAVIES, G. M., LISSINA, O., HAILS, R. S., NUTTALL, P. A. 2005. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine* 23: 4329-4341
- ULMER, J. B., DONNELLY, J. J., PARKER, S. E., RHODES, G. H., FELGNER, P. L., DWARKI, V. J., GROMKOWSKI, S. H., DECK, R. R., DEWITT, C. M., FRIEDMAN, A. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259: 1745-1749
- ULMER, J. B., WAHREN, B., LIU, M. A. 2006. Gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. *Trends in Molecular Medicine* 12: 216-222

- URIOSTE, S., HALL, L. R., TELFORD, S. R. 3RD, TITUS, R. G. 1994. Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2-dependent mechanism. *Journal of Experimental Medicine* 180: 1077-1085
- VALENZUELA, J. G. 2002. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1199-1209
- VALENZUELA, J. G., CHARLAB, R., MATHER, T. N., RIBEIRO, J. M. C. 2000. Purification, cloning and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry* 275: 18717-18723
- VALENZUELA, J. G., BELKAID, Y., GARFIELD, M. K., MENDEZ, S., KAMHAWI, S., ROWTON, E. D., SACKS, D. L., RIBEIRO, J. M. C. 2001. Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. *Journal of Experimental Medicine* 194: 331-342
- VALENZUELA, J. G., FRANCISCHETTI, I. M., PHAM, V. M., GARFIELD, M. K., MATHER, T. N., RIBEIRO, J. M. C. 2002. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Experimental Biology* 205: 2843-2864
- WANG, H., NUTTALL, P. A. 1994. Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology* 109: 525-530
- WHEELER, C. M., COLEMAN, J. L., HABICHT, G. S., BENACH, J. L. 1989. Adult *Ixodes dammini* on rabbits: development of acute inflammation in the skin and immune responses to salivary gland, midgut, and spirochetal components. *Journal of Infectious Diseases* 159: 265-273
- WIKEL, S. K. 1984. Immunomodulation of host responses to ectoparasite infestation - an overview. *Veterinary Parasitology* 14: 321-339
- WIKEL, S. K. 1985. Effects of tick infestation on the plaque-forming cell response to a thymic dependent antigen. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 79: 195-198
- WIKEL, S. K. 1996. Host immunity to ticks. *Annual Review of Entomology* 41: 1-22
- WIKEL, S. K. 1999. Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *International Journal of Parasitology* 29: 851-859
- WINDMAIER, E. P., RAFF, H., STRANG, K. T. 2006. Vander's human physiology: The mechanisms of body function. 10th edition. McGraw-Hill, 827 s.
- WOLFF, J. A., MALONE, R. W., WILLIAMS, P., CHONG, W., ACSADI, G., JANI, A., FELGNER, P. L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247: 1465-1468

Příloha 1: Sekvence použitých genů.

Sekvence serpinů IRS-1, IRS-2, IRS-4 a IRS-8 jsou uvedeny bez signálního peptidu.

Sekvence c14 se signálním peptidem.

IRS-1

CAAGGCAACGATAAACTTACCTTCGCCAACAAATCAGTTCGGCCTGCGATTACTGA
ATACTCTTCCAAGTCCCTCCAGAAGAAAACGTATTCTTCTCGCCCTATAGTGTATC
CACAGCCCTCGGAATGGCGTACGCCGGAGCTAGGGGAGACACACAAGAAGAGCTC
TCGGAACAGCTAGGTTATAACCGCCGCTGGGCTAAGCCAGGATGACGTCTTCAACG
CGTACTCTGACCACACGCAGTGGCTAAAGGCTTCTAGGTCCAACCTCGACTCTAAG
CGTGGCGAACGCCGCCGTCCTACATGATAAAGTGGGGCTCCGTTACACGTTCCAA
AGAACCATCGATCACGCTTTCGACGCCGACATTCTGAAGGTCGACTTCGTCAACG
AACGTAAAGGAGCCGTGGATCGCATCAACTACTGGGTGAAGGACAAGACGAACGG
AAAGATTCGGTCGCTTTTTAACAAGCCGCTAGAGTCTGAGACGAGACTTGTTCTG
CTCAACGCCATCTACTTCAAGGGATCCTGGAATACCAGGCTCAACAAGAGTAGGA
CCGAAAAGACCGAGTTCCTCAATGGCGGCGTCACTCCGACCAAGGTTGACATGAT
GATGGGGAGCATGAACATCGGCCACCATTTCTTCAGGGACCTGCAAATTGATGTG
GCGGATTTCCCGTACCAGGGGGCGGGACTACAGCATGACAGTCATCCTGCCCTGGA
GGAACGACGGCGTAGAAGCGATCAAGCAGAACCTCACCTGGACCTGTTTCAGAA
GCTGGTGTCTGGAGCTGAGGGAAAGAAGGGTCTTCGTGTTATTTCCAAAGTTCAA
ATAGAGGCAGAGTACTCCCTGAAGGAACCCCTCCAGAACCTGGGCATCAAACAGA
TCTTCAGTGGTGGCTCCGACCTTTCCGGCGTCACAAACGACAACGATCTGGTGGT
GTCCGCCGTCGTCCACAAAGCGGTCCTGGAGGTCAACGAAGAAGGCAGCGAAGCA
GCAGCCGTGTCGAGTGTTGTGGCCGTCACAAGGATTGGCACGCAGGCATTTCGAGT
TCAACGTCGACCATCCTTTCTTCTTTCATACGCAACACGGTCACCAATGACAT
CCTGTTTGCGGGACAAGTGAACAGTGTC

IRS-2

CAAGAAGAAGCCAAGCTCACCAAGGCCAACCAACCGTTTTCGGCTTGCGTCTGCTCC
GCGCGCTGCCAAGCGGCCAGAAAAGAACGTCTTCTTTTCGCCCTACAGCGTGTC
CGCCGCCATGGGAATGGCCTTCGCTGGAGCCAGAGGCCAAACCCAGCAAGAACTT
TCGCAAGGTTTTGGGCTTCTCAGACGTTGATCTCACCGATGCTGGGGTCTTGACG
CTTACACGCATCACACGGAGCGACTGAAGTCGACCCCTTCCAACCTCGACGCTCGA
TGTGGCGAACGCCGCCGCTATCCAGAGGACCCTGGCACTTCTGAACTCGTACGAA
AGCGCTCTGCAGAGTTCCTTCGGTGCCGAACTCCACAAGGTCGACTTCGCCGGAG
AACCGCAGGCCGCCGTGGACTTTGTTAACAACCTGGGTGAAGAGGAAAACGCACGA
CAAGATCGAAAACTGTTCAATGAGCCGCTGGATCCGGACACTCTGCTCGTCTTG
CTGAACGCCATTTACTTCAAGGGAGAGTGGAACACAGCATTGTCAAGGAGCACA
CGGAAAAGCGGCAGTTCTTCAACGGTGGCGTGACGCCCGTCGAGGTGGATACCAT
GAGGCTGGAGGCCCGCATCAAGTACCGTTTTCTTCGATGACTTGCAAGTAGAGGTC
GTGGAGCTGCCCTACCGCGGTCTCGACTACCCATGGCCATCCTGTTGCCCAAGG
AGAACACCGGCGTCGAGGGGCTCAAGCAAACCTTACTGTCGACCGTTTTCCAAA
CTACCTTTCCGATCTGAGGGAACGCAAGATCACAGTACTCCTTCCCAAGTTCAAG
CTGGAGACCAAGTACTCCCTGAAGGCACCCCTGCAGTCCCTGGGCATCAAGCAGA
TCTTTGAATCGGGCGCCGACCTGTCCGGCATCAATGACGAGAGGCTCCGGGTGTC
AGCCGTGGAACACAAGGCGGTCTGTCGAGGTCAACGAAGAAGGGACCGTGGCGGCC
GCGACCACGGGTGTGGTCATAGTCCCATACAGCCTGGGACCAGAGCCGGTGGTGT
TCAGGGTCGACCATCCGTTCTGTTCTTTCATCCGCAACACTCGGACGGATGACAT
TTTTTTTCGTGGGACAGGTTAACAAGCTG

IRS-4

CTCCACGAAGATCGTCTGACCCTCGCCAACAACCGCTTCGCCATTTCCCTGTTGC
ACAACCTTCCGACTAGCACAGAGACAAATATTTTCTTCTCACCATACAGCATCTC
CGTAGCGCTGGGAATGGCGTTTGCCGGAGCTAGAGGAGAACTAGGGAAGATCTG
TTTCAGGGGTTTCGGCTACCCACGATCCGACATCGACGACGATGCAGTCTTAGAAG
CGTACGCCAGCCAAACAAGGCGACTAAAATCCTTGCGATCAAATTCTACTCTCGA
TGCGGCCATCGGGGCTGCTATTCATGAACGAATTTCTCTGCTGAGTTCTTTCGAA
GATGTACTGAACAACCTCGTTCGGCGCCGACATCCTGAAAGTGGACTTCATAAACG
GAGGACAGGCAGCGGTTCGACGTCATCAATGGCTGGGTACACAGGAAAACCCGCGG
CAAATTAACCTCCTGTTTCGGTGAACCCCTCGAGACGATCATACGACTGGTCCTG
CTGAATGCCATCTACTTCAAGGGTACGTGGGACACGGTGTGTTTATCAGCGGCTAA
CGACCAAGAAACCCTTTATGAACGCATGCTCTACACCGACTGAAGTTGACACGAT
GAGAGGAGAGGTCTATGTTCCGCCACAAGTCGTTTCCTCTTCTTGGAGTGGACATT
GCGGAAATTCTTACCGTGGCATGGACTACAGCATGACGATTCTGCTACCCACTC
GAATCGATGGAGCGGAGGTGCTCAAGCGTAACATCACGGAACACCTGTTGCAAGA
CCTTGTGAAGCAGCTGGTTGAACAACAGGTCACCGTATATCTTCCGAAATTTAAG
CTGGAAACCGAATACCTACTCAAGGACCACTTGAAGAACTGGGAATCAACCGAA
TCTTCGGTTCCGGTTCGGACTTCTCGGGCATCACGCACGATGCGAACCTGGCAGT
GTCCGATGTGGTCCACAAGACCGTCCTGGAGGTCCACGAGGCAGGCACCGAGGCG
GCCGGTGCTACAGGTGTCATCATTGTCGCAGAAAGTCTTGTGGAGAGCGTCGAGT
TCAGAGTCGATCACCCGTTTCATCTTCTTCATCCGAAACACTCAAACCAAGGACAT
CCTCTTTGTGGGACAGGTCAATCATCTT

IRS-8

ATGCAAGACGAAATCAGCCAAGACAAGTGGAAGCTGGCACGAGCCAACAACCTACC
TGGGGCTCAATCTTCTCAAGCAGCTTCCCAGCAACGACAAGACCAACGTGTTCCCT
TTCGCCGTTTCCAGCGTGTCCACAGCCATGGGCATGGCCTACGCCGGCGCCCGCGGG
GACACCCTGGAACAGTTGACGTTGAACTTCGGTTATGCTGCGGATGAACTCAACG
AAGGCAAGGTTCTCGCCTTGTTC AAGGAACAGCTCCAGTCGACCAACGACCTACC
GCACGACTACACGCTCAACATCGCCAACGCAGCCGTGGCCCAAGAAGGGTACGGT
ATCCTTCCTGAGTACACCGACGCACTCACGAGTTCCTTCGGTGCAGAGTACATCG
AAGCCGACTTCCAGAAACGCGGTCAAGAGGCCATACAGAAGATCAACGCTTGGGT
TAGCAACAGGACACATGGGAAGGTACAGAGTCTGTTTCGACGAACCACCGGACTTC
TCGACTCGATTGATCCTCCTCAACGCCATCTACTATAAGGGGACGTGGCTGTACG
AGTTCGACAAGACGAAAACAAAGCCGAGGTCGTTCTACAACGGCGGTGTTCGAGAA
GGTTCAGGTACCCATGATGCGGCTCAAGTCAACTCTTAACCACACGTACAACGCC
ATCCTCAACGCTGACCTTGTAGACCTGCCTTACGTCGGCAATGACTTCAGCATGA
CCATCATTCTGCCCAGAGAGAAAACCGGATTGGCTTCGCTCAAGTCGGTTCTGAC
GTCGCAGACGCTTAACCTCGCCCTCCAGAACATGTACCCCAAGGACATGAAGCTG
AAGCTTCCAAAGTTTAAAGCTGGACACCAAATACACTCTCAAGCCCCCGCTCGAAG
CCATGGGCATCACAAAGATTTTTTCGGCCGACGCCGATCTTTCGGGTATCAGCGG
TTCGCGAAACCTCTACGTGTTTGTATGTCCTACACAAGGCTGTGCTGGAGGTCAAT
GAAGAAGGCAGCGAAGCCGCTGCCGTTACGGGTTTTGTCATCCAGCTAAGAACGG
CCGCGTTTTGTGACGCCCCCCCCGTTGCCAAAGGTGTACGTAGATCATCCCTTCAT
TTTCCTCATCAGGAACTCTAAAACCAACACCATCATGTTTCCTGGGGGAGATCAAC
GCCCTTTGA

C14

ATGAAGGCAACGCTCATCGCCATTTGCTTCCTCGCTGCAGTAACGTTCTCAATGG
GAGATTTCGTATGGAAGCAGCACGCCCTGCCCGGGTGGACCCGGAGAACCTTGCGA
TTCGGCACCAGGCCCGCAAGGACCCTCCAATCCGCCCCACCAACCCGGCACGCGA
AGCCCTCAAGCACCTGGCAGCTCCAGAAGCTAA

Příloha 2: Seznam použitých primerů

Primer	Sekvence 5'-3'
Contig 14 forward	GATTCGTATGGAAGCAGCACGCCC
Contig 14 reverse	CAGCGAGACCTTAGCTTCTGGAGC
GFP forward	ATGGCTAGCAAAGGAGAAGAAC
GFP reverse	TCAGTTGTACAGTTCATCCATGC
IRS-1 forward	CAAGGCAACGATAAACTTACCTTCGCCAACAATCAG
IRS-1 reverse	TTAGAGACTGTTCACTTGTCCCGCAAACAGGATGTCATT
IRS-2 forward	CAAGAAGAAGCCAAGCTCACCAAGGCCAACAACCGT
IRS-2 reverse	TTACAGCTTGTTAACCTGTCCACGAAAAAATGTCATC
IRS-4 forward	CTCCACGAAGATCGTCTGACCCTCGCCAACAACCGC
IRS-4 reverse	TCAAAGATGATTGACCTGTCCACAAAGAGGATGTCCTT
IRS-8 forward	CAAGACGAAATCAGCCAAGACAAGTGGAAGCTGGCA
IRS-8 reverse	TCAAAGGGCGTTGATCTCCCCAGGAACATGATGGTGTT
VR2001 forward	ACAGGAGTCCAGGGCTGGAGAGAA