

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Charakterizace rodiny proteinů o molekulové hmotnosti 18,7 a  
19 kDa ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*

Magisterská práce

2009

**Bc. Nina Růžičková**

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jan Kopecký, CSc.  
Školitel specialista: RNDr. Jindřich Chmelař

Růžičková N., 2009: Charakterizace rodiny proteinů o molekulové hmotnosti 18,7 a 19 kDa ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* (Characterization of 18,7 and 19 kDa groups of secreted proteins in the salivary glands of the castor bean tick *Ixodes ricinus*) - 51 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:** The recombinant protein c90 was prepared and polyclonal antibodies against this protein were raised. The dsRNA was made for the experiments with RNA interference. The samples from dissected tissues of dsRNA silenced ticks were tested by RT-PCR and Western blot. Results suggest that protein c90 plays a role in the tick body during the reaction to injury. Finally, another experiment with injection of water, G+ and G- bacteria into the ticks was realized.

It was found that the members of the 18,7 kDa protein family can create multimers. The overexpression of silenced genes was observed during RNAi experiments despite of expected inhibition of c90 production. These results together with the bioinformatics analysis could mean that these proteins are important the physiology of tick probably as a reaction to injury. However c90 protein is produced only in the first phase of feeding which could mean that it has some role in the tick-host interaction as well.

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 7.1. 2009

.....

Nina Růžičková

## **Poděkování:**

Můj největší dík patří RNDr. Jindrovi Chmelařovi za všechno, co pro mě během uplynulých dvou let udělal. Děkuji mu za odborné vedení, rozšíření obzorů nejen v oboru molekulární biologie, trpělivost při neustálém zodpovídání často hloupých dotazů a hlavně za to, že jsem věděla, že se na něj můžu kdykoli obrátit s důvěrou a vědomím, že mi pomůže.

Doc. RNDr. Janu Kopeckému, CSc. děkuji za zadání diplomové práce a možnost pracovat v jeho laboratoři.

RNDr. Ondrovi Hajduškovi děkuji za pomoc při RNA interferenci, RT-PCR a diskuzi často záhadných výsledků. Chci poděkovat i Mgr. Veronice Burešové za injekci klíšťat a vlastně celé laboratoři RNDr. Petra Kopáčka, CSc. za příjemnou pracovní atmosféru a cenné rady. Jmenovitě Petru Kopáčkovi děkuji za pomoc při purifikaci rekombinantního proteinu.

Děkuji i osazenstvu „zelené místnosti“ a „dětského koutku,“ RNDr. Anně Scallové, RNDr. Kateřině Černé, RNDr. Heleně Horké a Veronice Slavíkové, za šíření dobré nálady.

Nesmím rozhodně zapomenout na své přátele, kteří trpělivě poslouchali má vyprávění o klíšťatech, ať už si v duchu mysleli cokoli, Nice, Vendě, Ondrovi, Zuzce, Fíjovi, Jirkovi, Martinovi, Dejvovi, Julče, Michalovi, Helče a Lukymu.

Na posledním místě, ač rozhodně ne významem, jmenuji svou maminku, které děkuji za podporu nejen finanční a za pozitivní motivaci.

# OBSAH

|   |    |
|---|----|
| 1. Úvod .....   | 1  |
| 1.1. Klíště obecné ( <i>Ixodes ricinus</i> ) .....                    | 1  |
| 1.2. Interakce klíště-hostitel.....                                   | 2  |
| 1.2.1. Hemostáze .....  | 2  |
| 1.2.2. Zánět .....  | 3  |
| 1.2.3. Imunita .....  | 4  |
| 1.3. Přenos patogenů a efekt SAT .....                                | 6  |
| 1.4. Protiklíštěcí vakcína .....                                      | 6  |
| 1.5. Způsoby identifikace nových imunoaktivních molekul .....         | 8  |
| 1.6. RNA interference .....   | 9  |
| 2. Cíle práce.....  | 11 |
| 3. Materiál a metody.....   | 12 |
| 3.1. Použité chemikálie.....  | 12 |
| 3.2. Příprava rekombinantního proteinu .....                          | 14 |
| 3.2.1. Příprava vektoru pro expresi rekombinantního c90.....          | 14 |
| 3.2.1.1. Purifikace produktu PCR reakce .....                         | 15 |
| 3.2.1.2. Ligace PCR produktu do vektoru pET21 d+ .....                | 16 |
| 3.2.1.3. Restrikční reakce .....                                      | 16 |
| 3.2.1.4. Transformace kompetentních bakterií E. coli kmen TOP 10..... | 16 |
| 3.2.1.5. Izolace plazmidu .....                                       | 16 |
| 3.2.2. Příprava rekombinantního proteinu c90.....                     | 17 |
| 3.2.2.1. Transformace bakteriálního kmene BL21 Star™ (DE3) .....      | 17 |
| 3.2.2.2. Exprese rekombinantního proteinu .....                       | 17 |
| 3.2.2.3. Izolace rekombinantního proteinu z bakteriální kultury ..... | 17 |
| 3.2.2.4. Kontrola exprese rekombinantního proteinu.....               | 17 |
| 3.2.2.5. Refolding rekombinantního proteinu .....                     | 18 |
| 3.2.2.6. Purifikace rekombinantního proteinu.....                     | 18 |
| 3.2.2.7. Inhibiční eseje .....  | 19 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2.2.8. Příprava protilátek .....                 | 19 |
| 3.2.2.9. Western blot .....                        | 19 |
| 3.3. RNA interference.....                         | 20 |
| 3.3.1. RNAi protokol .....                         | 20 |
| 3.3.2. Injikace dsRNA do klíšťat .....             | 23 |
| 3.3.3 Získávání klíštěcích slin.....               | 23 |
| 3.3.4. Izolace tkání z klíšťat a totální RNA ..... | 24 |
| 3.3.6. Dvoukroková semikvantitativní RT-PCR.....   | 24 |
| 5. Diskuze.....                                    | 42 |
| 6. Závěr.....                                      | 45 |
| 7. Použitá literatura .....                        | 46 |

# 1. ÚVOD

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

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je zástupcem řádu Ixodida, čeledi Ixodidae a podčeledi Ixodinae. Jde o krevsajícího ektoparazita vyšších obratlovců. Životní cyklus klíštěte obecného se skládá ze tří vývojových stádií, během kterých saje na třech různých hostitelích (Singh a Girschick, 2003). Larvy sají na plazech, ptácích nebo drobných hlodavcích, nymfy na středně velkých hlodavcích a dospělé samice pouze na větších savcích včetně člověka (Olsén a kol., 1995). Samice sají osm až deset dní, jsou schopny nasát až 4000 mg krve hostitele a v průběhu sání zvětší asi dvěstěkrát svůj objem (Kaufman, 1989). Po uvolnění z hostitele naklade až několik tisíc vajíček. Cyklus v příznivých podmínkách trvá dva až tři roky a končí naklazením vajíček a smrtí jedince. Klíště obecné obývá mírný pás celé Evropy, severozápadní Afriky a přední Asie. V České republice je nejhojnějším zástupcem čeledi, vyskytuje se na pastvinách, vlhkých loukách a v křovinách do nadmořské výšky okolo 1000 m. n. m. (Daniel a kol., 2004).

Mnoho parazitů včetně mikroorganismů, kteří infikují obratlovce, se při svém přenosu neobejde bez krevsajícího vektora. Klíště je důležitým přenašečem široké palety patogenů z řad protozoí (*Babesia microti*), bakterií (*Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Ehrlichia sp.*,...) i virů (virus klíšťové encefalitidy) (Gray a Kahl, 1991). Tito parazité se mohou množit při průchodu tělem klíštěte ze střeva do slinných žláz. Slinami, které jsou během sání na hostiteli produkovány, je následně parazit přenesen z klíštěte do obratlovce. Vzájemné interakce mezi patogenem, vektorem a hostitelem jsou trojího typu: jde o infekci obratlovce patogenem, nakažení vektora patogenem a sání parazita na hostiteli (Nuttal, 1998). Přenášené nemoci jsou řazeny mezi zoonózy, protože jejich životní cyklus probíhá hlavně mezi zvířaty (Gray a kol., 1999). Klíště obecné se nejčastěji nakazí ve stádiu larvy sáním na infikovaných hlodavcích. V České republice je klíště *Ixodes ricinus* významným přenašečem dvou závažných lidských onemocnění: Lymeské boreliózy a klíšťové encefalitidy. Přenosu jsou schopná všechna vývojová stádia klíštěte.

Nepostradatelným orgánem nejen pro sání na hostiteli jsou pro klíště slinné žlázy. Obsahují široké spektrum enzymů a různých druhů farmakologicky aktivních molekul, které účinně ovlivňují přirozené i specifické složky imunitního systému hostitele a usnadňují příjem krve (Sonenshine, 1991). Slinné žlázy zajišťují řadu dalších funkcí, mezi které patří absorpce vody z ovzduší během období, kdy klíště neparazituje na hostiteli (Wikel a kol., 1994) a

sekrece elektrolytů, vody a cementu, který sající klíště ukotvuje v kůži hostitele (Munderloh a Kurtti, 1995).

## 1.2. Interakce klíště - hostitel

Aby klíště mohlo úspěšně dokončit vývojový cyklus, musí přijmout potravu. Nejprve si najde vhodné místo pro přisátí, poté mandibulami penetruje kůži hostitele a sekretuje hmotu, která jí umožňuje udržet se na hostiteli (Kaufman, 1989). Pro získání krve musí klíště překonat řadu překážek, hemostázi a nespecifickou i specifickou imunitní odpověď. Proto během sání klíště slinami vpravuje do hostitele látky s prokázanou antikoagulační, vazodilatační a imunosupresivní aktivitou (Valenzuela, 2000).

### 1.2.1. **Hemostáze**

Ztrátám krve se hostitel primárně snaží zabránit hemostázou. Při sání klíštěte dochází k mechanickému poškození kůže a podkoží. Hostitelovou obranou proti ztrátám krve je agregace krevních destiček, vazokonstrikce a koagulační kaskáda. Výsledná fibrinová sraženina zamezuje ztrátám krve, proto má klíště přirozenou snahu prolomit všechny tyto bariéry.

Mezi inhibitory trombinu, který je jedním z klíčových enzymů hemostázy patří ornithodorin, amblin, boophilin, (Lai a kol., 2004) a savignin (Mans a kol., 2002). V hemolymfě klíštěte *Haemaphysalis longicornis* byl identifikován serpin HLS-2, který je kromě anti-trombinové aktivity zahrnut v regulaci koagulace hemolymfy. Následkem inhibice trombinu nedojde k aktivaci krevních destiček a koagulační kaskáda se celkově zpomalí (Nienaber a kol., 1999).

Klíčovým faktorem koagulační kaskády je serinová proteáza Faktor Xa (FXa), který je součástí jak vnější, tak vnitřní cesty aktivace. Nejlépe charakterizovaným inhibitorem FXa je TAP (tick antikoagulant peptide) z klíšťáka *Ornithodoros moubata* (Cook a kol., 1998; St Charles a kol., 2000). Dalším příkladem inhibice závislé na FXa jsou inhibitory TF (TFPIs-tissue factor pathway inhibitors), které působí na komplex FVIIa-TF. V klíštěti *Ixodes scapularis* byly identifikovány homology TFPI - Ixolaris (Francischetti a kol., 2002) a Penthalaris (Francischetti a kol., 2004). Dalším inhibitorem FXa je protein nazvaný Salp14 (Narasimhan a kol., 2002).

Důležitou skupinou molekul účinných při inhibici hemostáze jsou inhibitory systému kallikrein-kinin, který je součástí vnitřní cesty aktivace koagulační kaskády. Sem patří BmTI-A (*Boophilus microplus* trypsin inhibitor A), který inhibuje trypsin, neutrofilovou elastázu a lidský plazmatický kallikrein (Tanaka a kol., 1999). V klíštěti *Rhipicephalus sanguineus* byl nalezen jeho homolog, RsTIQ2 (Azzolini, 2003). Inhibici vzájemné aktivace FXIIa a kallikreinu způsobuje haemaphysalin z klíštěte *H. longicornis* (Kato a kol, 2005). Všechny tři inhibitory patří do rodiny inhibitorů serinových proteáz Kunitzova typu, tzv. Kunitz-serpiny.

Jednou z důležitých molekul, která se uplatňuje při inhibici shlukování krevních destiček, je apyráza (ATP-difosfohydroláza), která současně brání i aktivaci neutrofilů (Champagne, 1994). Apyráza byla popsána u většiny hematofágních členovců (Ribeiro a kol., 1985; Ribeiro a kol., 1990, Law a kol., 1992). Dalšími inhibitory agregace jsou moubatin, variabilin nebo longicorin (Bowman a kol., 1997). Názvy molekul jsou odvozeny od druhových označení klíštěte. TAI (tick adhesion inhibitor) stejně jako moubatin inhibuje adhezi destiček ke kolagenové matrix (Waxman a Connolly, 1993; Karczewski a kol., 1995).

Při sání klíštěte hrají roli i fibrin(ogen)olytická agens, například TCI (tick carboxypeptidase inhibitor) nalezený u druhu *Rhipicephalus bursa*, který in vitro urychluje fibrinolýzu (Arolas a kol., 2005) a fibrin(ogen)olytická metaloproteáza (Francischetti a kol., 2003).

Klíště také produkuje vysoké koncentrace prostaglandinů PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> a PGI<sub>2</sub>, což jsou nebílkovinné složky slin bránící aktivaci destiček (Bowman a kol., 1997) a způsobující vazodilataci v místě sání (Champagne, 1994). U PGE<sub>2</sub> byly popsány účinky na složky specifické imunity (Sa-Nunes a kol, 2007).

### 1.2.2. Zánět

Mechanické poškození kůže v místě sání vede k nespecifické odpovědi ve formě zánětu (Brossard a Fivaz, 1982). Zánět je provázen čtyřmi jevy: bolestí, zvýšenou teplotou, otokem a zarudnutím, přičemž poslední dva jmenované jsou důsledkem vazodilatace cév. Přesto, že vazodilatace je vhodná pro sání krve, bolest hostitele varuje před parazitem. Bolest způsobuje i ATP, které se uvolňuje z poškozených buněk (Cochrane, 1967), dále serotonin, histamin a bradykinin (Julius a kol., 2001). Klíště má schopnost potlačit bolest a svědění v místě sání způsobené bradykininem jeho rozštěpením karboxypeptidázou (Ribeiro a Mather, 1998).



V roce 2000 skupina vědců pod vedením J. Valenzuely identifikovala ve slinách *I. scapularis* inhibitor alternativní dráhy komplementu o hmotnost 18,5 kDa a nazvala jej Isac (*I. scapularis* salivary anticomplement). Kromě antikomplementové činnosti způsobuje pokles produkce anafylatoxinů s následkem potlačení zánětu. Klíště *Rhipicephalus appendiculatus* produkuje ve svých slinách HBP (histamin binding protein), který neutralizuje účinek histaminu produkovaného degranulací žírných buněk. Přítomnost histaminu dále stimuluje zánět. Homology tohoto proteinu, patřícího do rodiny lipocalinů, můžeme pravděpodobně najít u všech druhů klíšťat (Paesen a kol., 1999).

### 1.2.3. Imunita

Imunosuprese je namířena proti specifické i nespecifické imunitní odpovědi hostitele (Wikel, 1996). U nespecifické imunitní odpovědi se jedná o supresi NK buněk (Kubeš a kol., 1994; Kopecký a Kuthejlová, 1998), alternativní dráhy komplementu inhibicí ukládání komplementové složky C3b na aktivační povrch, čímž se brání uvolňování anafylatoxinu C3a (Ribeiro, 1987; Lawrie a kol., 1999, 2005), fagocytózy (Kýčková a Kopecký, 2006) a produkce NO makrofágy (Urioste a kol., 1994).

Protože klíště saje na hostiteli několik dní, má hostitel dostatek času i na rozvoj specifické imunitní odpovědi (Ferreira a kol., 2003). Opakované sání má za následek hostitelovu reakci na přítomnost klíštěcích antigenů. Dochází k rychlé tvorbě protilátek a někdy i k hypersenzitivní reakci IV. typu – DTH (delayed type hypersenzitivity – oddálený typ přecitlivělosti), které se účastní granulární bazofily (Allen, 1973). DTH reakce je odpovědná za účinnou odpověď proti klíštěti. Na DTH může klíště reagovat sníženou hmotností po plném nasátí, delší periodou sání, inhibicí svlékání, menší snůškou vajíček a v některých případech může mít za následek i smrt sajícího klíštěte (Wikel a Osburn, 1982; Ribeiro, 1995).

Na začátku specifické imunitní odpovědi prezentují Langerhansovy buňky v lokálních mízních uzlinách antigen T-lymfocytům. Tvoří se Th (pomocné) a Tc (cytotoxické) lymfocyty. Th lymfocyty se diferencují na Th1 a Th2 subpopulace, které se liší produkcí cytokinů. Th1 lymfocyty produkují IL(interleukin)-2, IL-3, IFN (interferon)- $\gamma$  a TNF (Tumor necrosis factor)- $\alpha$ , zatímco Th2 subpopulace je typická produkcí IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 a IL-13 (Mosmann a Coffman, 1989). Účinná obrana proti sání klíštěte je zajištěna především Th1 typem imunitní odpovědi. Th1 cytokiny chemotakticky přitahují neutrofile, monocyty, makrofágy, eozinofily a bazofily. Dochází pak ke vzniku tzv. kutánní bazofilní

hypersenzitivity, již zmíněné DTH reakci. Cirkulující homocytotropní imunoglobuliny IgG a IgE senzibilizují bazofily a žírné buňky nasedáním pomocí Fc receptorů. K aktivaci buněk dochází přemostěním protilátek antigenem. Cirkulující imunní komplexy klasickou cestou aktivují komplement, během této aktivace se uvolňují anafylatoxiny, což má za následek degranulaci žírných buněk a bazofilů a následné uvolnění imunoaktivních látek, například významných vazoaktivních molekul a mediátorů zánětů histaminu a serotoninu.

Klíštětem ovlivněná specifická imunita se projevuje snížením rychlosti proliferace T lymfocytů (Wikel, 1982; Ganapamo a kol., 1996) a B lymfocytů (Hannier a kol., 2003). Intenzitu poklesu významně ovlivňuje i délka klíštěcího sání. Během sání se mění i hladiny různých cytokinů, které mají v imunitním systému klíčovou roli. Tyto změny v expresním profilu cytokinů mají za následek polarizaci odpovědi z Th1 směrem k Th2 (Kovář a kol., 2002). Klesají hladiny IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$  a IFN- $\gamma$ , naopak produkce IL-4 roste (Ganapamo a kol., 1995). Na ovlivnění tvorby IL-10 se názory liší. Existují práce popisující nárůst (Kopecký a kol., 1999) i pokles (Hannier a kol., 2003). Bylo prokázáno, že IL-4 a IL-10 potlačují proliferaci Th 1 lymfocytů, a to ve prospěch Th 2 populace. Naproti tomu cytokin IFN- $\gamma$ , který inhibuje dělení Th2 buněk, bývá klíštěcími slinami potlačen. (Mejri a kol., 2001; Sender a Paul, 1994).

Do těla klíštěte se během sání společně s krví dostávají také imunoglobuliny. Ty přecházejí ze střeva do hemocoelu, kde se na ně specificky váže IgBP (Immunoglobulin G binding protein). Vytvořené komplexy jsou pak transportovány do slinných žláz a odtud zpět do těla hostitele. Tento proces má význam pro ochranu klíštěte před poškozením vnitřních orgánů hostitelovými protilátkami (Wang a Nuttal, 1994).

V průběhu 90. let se intenzivní výzkum soustředil na vliv klíštěcích slin, resp. SGE na imunitní odpověď hostitele, ale od konce 90. let se hlavním cílem zájmu stala identifikace konkrétních molekul, odpovědných za dílčí imunomodulační účinky. V současné době je molekulárně identifikováno relativně velké množství proteinů, účastnících se interakce mezi klíštětem a hostitelem. Prozkoumat, jaké mechanismy obrany před hostitelským imunitním systémem se u klíštěte během evoluce vyvinuly je zajímavé jak z pohledu základního výzkumu, tak i z důvodu praktického využití získaných poznatků například v medicíně.

Jedním z proteinů s potvrzenou imunomodulační aktivitou je protein Da-p36 z klíštěte *Dermacentor andersoni*. Tento glykoprotein o molekulové hmotnosti 36 kDa má výrazný vliv na proliferaci T-lymfocytů stimulovaných konkavalinem A (ConA) (Bergman a kol., 2000). Rekombinantní protein připravený v eukaryotním expresním systému měl za následek výraznou inhibici proliferace, která se dala srovnat s účinkem purifikovaného nativního

proteinu nebo SGE. Jeho N-koncová sekvence je homologní s vnitřní sekvencí imunoglobulin vázajícího proteinu. Nepodařilo se zatím popsat mechanismus imunosuprese (Bergman a kol., 1998; Alarcon-Chaidez a kol., 2003).

Za zmínku stojí i další molekula s imunomodulačními účinky, protein izolovaný z klíštěte *I. ricinus* nazvaný Iris (*Ixodes ricinus* immunosuppressant). Jedná se o protein z rodiny serpinů. Připravený rekombinantní protein o velikosti asi 44 kDa způsoboval inhibici proliferace myších splenocytů stimulovaných ConA, stejně tak jako inhibici produkce IFN- $\gamma$  po stimulaci mitogeny (LPS a PHA). Iris inhiboval i produkci IL-8, TNF- $\alpha$  a IL-6 (Leboulle a kol., 2002).

### 1.3. Přenos patogenů a efekt SAT

Zjištění, že sliny mají pro přenos patogena klíčový význam, bylo učiněno v devadesátých letech minulého století. Složení slin může výrazně usnadnit kolonizaci nového hostitele. Tento jev byl pojmenován jako SAT (Saliva Activated Transmission). Poprvé byl pozorován u Togotho viru, jehož schopnost infikovat morče a sající klíšťata vzrostla desetkrát ve srovnání s kontrolou, v případě, že byl injikován společně s SGE klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* (Jones a kol., 1992). Tento tzv. neviremický přenos byl také popsán u viru klíšťové encefalitidy (Labuda a kol., 1993) a u borélií (Pechová a kol., 2002) V roce 2005 se podařilo identifikovat první protein, který je za tento jev zodpovědný, Salp15 (Ramamoorthi a kol., 2005; Anguita a kol., 2002). Připravený rekombinantní protein Salp15 měl schopnost inhibovat proliferaci CD4<sup>+</sup> T lymfocytů potlačením toku vápenatých iontů po navázání Salp15 na TCR receptor. Tato skutečnost má vliv i na snížení produkce IL-2, který stimuluje proliferaci T-buněk. Právě snížení produkce IL-2 je důvodem pro inhibici proliferace CD4<sup>+</sup> T lymfocytů (Anguita a kol., 2002).

### 1.4. Protiklíštěcí vakcína

K vakcinaci proti klíšťatům existují dva odlišné přístupy, jednak jde o vakcinaci proti složkám klíštěcích slin (exponované „exposed“ antigeny) nebo proti antigenům exprimovaným v jeho střevě (skryté „concealed“ antigeny). Vakcinace může hostitele ochránit před infekcí a zároveň snížit životaschopnost vektora (Mulenga a kol., 2000; Titus a kol., 2006).

Na počátku snahy o vývoj vakcíny stojí zjištění, že klíštěcí sliny obsahují molekuly, které ovlivňují homeostázu a imunitní reakci hostitele (Titus a Ribeiro, 1988; Kovář, 2004).

Cílem těchto prací je vytvořit protiklíštěcí vakcínu, jejíž použití by v hostiteli vyvolalo rezistenci ke klíštěti a zároveň zamezilo nakažení patogeny, které klíště přenáší. Je zřejmé, že imunosupresivní proteiny jsou přítomné ve slinách většiny, ne-li dokonce všech krevsajících členovců, což může být důvodem přenosu tak velkého množství patogenů (Nuttal a kol., 2000). Proto jsou protiklíštěcí vakcíny považovány za vhodný přístup k vývoji vakcíny. Vakcíny namířené proti vektoru neochrání hostitele pouze před známým přenášeným patogenem, ale také proti těm dosud neznámým (Titus, 2006).

K přípravě účinné vakcinační směsi vede až identifikace konkrétních molekul. Je nezbytné nalézt imunogenní molekulu, která zároveň vyvolá rezistenci k samotnému klíštěti. Tento požadavek je ale problematický, protože ne vždy dokáže protein schopný indukovat tvorbu protilátek vyvolat i rezistenci vůči klíštěti (Das a kol., 2000). Úspěchu bylo dosaženo s tzv. „tichým“ antigenem ze slin, sialostatinem L2. Vakcinace morčat tímto imunomodulátorem omezuje schopnost klíštěte plně se nasát, prodlužuje periodu sání a umožňuje rozvinutí zánětlivé odpovědi. Je ale zajímavé, že sialostatin L2 není rozpoznán humorálními složkami imunitní odpovědi v opakovaném sání klíštěte, zatímco u zvířat očkovaných sialostatinem L2 dochází k neutralizaci jeho účinku (Kotsyfakis a kol., 2008).

Vhodnými antigeny se mohou stát antikoagulační molekuly, dále ty, které brání shlukování destiček a vzniku zánětu. Mezi tyto molekuly patří mimo jiné inhibitory proteáz, které mají tyto procesy na svědomí. Jedná o serpiny (serine protease inhibitors) jak přímo z rodiny serpinů, tak i Kunitz-serpiny, které v těle hostitele regulují řadu dějů. Problémem těchto molekul je to, že může dojít ke crossreaktivitě s vlastními serpiny, což následně povede k autoimunitní reakci (Mulenga a kol., 2001).

Mezi nadějně kandidáty na vakcínu patří BPTI-kunitz trombinové inhibitory, Ixolaris, Penthalaris, Salp14 a BmTIs/RsTIs. Dnes se zdá, že vakcinace exponovanými antigeny je účinnější než použití skrytých antigenů, protože imunizace skrytými antigeny nemusí zabránit přenosu patogenů a navíc si byla zvířata schopná vytvořit rezistenci sáním neinfekčních klíšťat (Maritz-Olivier a kol., 2007; Mulenga a kol., 2000).

Novým přístupem k vakcinaci je imunizace, při které plazmidová DNA vnesená do hostitele spustí buněčnou i humorální imunitní odpověď, na rozdíl od imunizace proteinem, kdy vzniká pouze humorální (Barry a kol., 2004).

Zatím existuje jediná komerčně vyráběná antiklíštěcí vakcína. Jde o vakcínu proti klíštěti *Boophilus microplus*, které přenáší babeziózu, nemoc ničící celá stáda dobytka v Africe (Wiladsen a kol., 1995; Fragoso a kol., 1998). Jedná se o vakcínu namířenou proti skrytému antigenu Bm85.

## 1.5. Způsoby identifikace nových imunoaktivních molekul

Klasickým způsobem identifikace imunoaktivních molekul je tzv. cesta od proteinu ke genu. Ze slinných žláz jsou získány aktivní složky nebo SGE. Podle známé sekvence se v expresním systému připraví rekombinantní protein a otestuje se na případnou aktivitu (Valenzuela, 2002).

Při identifikaci je možné postupovat i opačným způsobem, tedy od genu k proteinu. V současné době je asi nejvýhodnější. Tento postup je kombinací rozsáhlého sekvenování vysoce kvalitní full-length cDNA knihovny slinných žláz, nalezení genů kódujících sekretované proteiny a následné bioinformatické zpracování získaných sekvencí. Náhodným výběrem velkého počtu klonů cDNA je možné získat soubor stovek různých genů. Tyto geny jsou posléze rozděleny podle četnosti a příbuznosti se známými sekvencemi uloženými v databázi do klastrů. V případě, že nalezený homologní protein v databázi má popsanou aktivitu, je možné pokračovat v přípravě rekombinantního proteinu a v testování jeho biologické aktivity (Valenzuela, 2002).

Posledně jmenovaný postup byl využit v projektu, který byl zaměřen na sialom (transkriptom ze slinných žláz) klíštěte *Ixodes ricinus* (Chmelař a kol., 2008). V tomto pokusu byla popsána exprese a dynamika genů v průběhu sání. Na několika druhích klíšťat, konkrétně na *I. scapularis* (Ribeiro a kol., 2006; Valenzuela a kol., 2002), *I. pacificus* (Francischetti a kol., 2005), *Dermacentor andersoni* (Alarcon-Chaidez a kol., 2007) a *Amblyomma variegatum* (Nene a kol., 2002), již byly podobné práce dokončeny a tato je první, která se zabývá nejdůležitějším přenašečem patogenů v Evropě, klíštětem *Ixodes ricinus*. Byly osekvenovány čtyři cDNA knihovny ze slinných žláz čtyř stádií sání dospělých samic klíštěte *I. ricinus*. Jednalo se o nenasáté samice, dále samice po jednom, čtyřech a sedmi dnech sání. Z každé knihovny bylo osekvenováno 600 náhodných genů, které byly rozříděny podle příbuznosti nebo funkční podobnosti. Takto vznikl seznam genů, které nyní čekají na funkční testy.

Má diplomová práce navazuje právě na tento projekt. Pro svou magisterskou práci jsem si vybrala skupinu genů kódujících proteiny o molekulové hmotnosti 18,7 a 19 kDa. Transkripce těchto genů je podle výsledků výše uvedené práce upregulována již první den po přisátí. Je tedy pravděpodobné, že tyto proteiny mají důležitou roli při sání. O přesné funkci těchto proteinů ale není známo nic. Homology proteinů 18,7 kDa byly dosud objeveny jen u klíšťat rodu *Ixodes*.

## 1.6. RNA interference

V této magisterské práci byl využit i nedávno objevený buněčný mechanismus označovaný jako RNA interference. Spolupráci řady proteinů a dvouvláknové (ds)RNA dochází k vysoce selektivní degradaci sekvenčně podobné mRNA s následným zastavením syntézy daného proteinu (Bernstein a kol., 2001). Nepřítomnost cílového proteinu pak umožňuje sledovat případný fenotypový projev.

RNAi zaznamenala v poslední době obrovský metodologický průlom. Tento evolučně konzervovaný mechanismus, poprvé popsáný u *Caenorhabditis elegans* (Fire a kol., 1998), slouží jako obrana genomu eukaryotické buňky před invazí (ds)viry a vpádem mobilních genetických elementů, jakými jsou transpozony (Tabara a kol., 1999). Některé studie naznačují, že další funkce RNAi spočívá v regulaci genové exprese na posttranskripční úrovni (Zamore, 2001). Dosud byl tento mechanismus prokázán u řady eukaryot (Ngo a kol., 1998).

Prvním krokem RNAi je in vitro či in vivo syntéza dsRNA, která spouští kaskádu reakcí končících degradací homologní sekvence mRNA. Po navázání specifické endonukleázy DICER k dsRNA dochází k jejímu našťipání za spotřeby ATP. Vzniklé 21-25 nuklotidů dlouhé „sense“ a „antisense“ fragmenty RNAi známé také jako „malé interferující RNA“ siRNA (Elbashir a kol., 2001), jsou vázány do komplexu RISC (RNA - induced silencing complex), který štěpí homologní jednovláknovou mRNA. Přestože nebyly dosud identifikovány všechny enzymatické součásti tohoto komplexu, jsou s ním spojeny endonukleázové a exonukleázové aktivity, včetně aktivity zodpovědné za vyhledávání homologní sekvence (Tuschl, 2001). Katalytický účinek RNAi spočívá ve funkci RNA dependentní RNA polymerázy (RdRP), která využívá antisense siRNA jako primery a dosyntetizovává dsRNA, pomocí níž je následně degradována mRNA (Nishikura, 2001).

Fyziologie slinných žláz, jimi sekretované faktory a jejich důležitost pro sání klíštěte již byly rozebrány do detailů (Bowman a kol, 1997; Sauer, 2000). Limitujícím faktorem ve výzkumu klíšťat je nedostatek dosažitelných informací o procesech a sekretovaných proteinech, které ovládají sání klíšťat. Metody jejich zkoumání se ale vyvíjely pomalu až do doby, kdy EST (Expressed semence tag) projekty přinesly obrovské množství informací o sekvencích genů, které kódují proteiny s důležitou funkcí. Není proto překvapením, že bylo identifikováno mnoho genů, kódujících proteiny s neznámou funkcí (Hill a kol., 2000; Nene, 2004). Metoda RNAi nabízí poměrně jednoduchý, spolehlivý, levný a efektivní nástroj pro analýzu funkce těchto proteinů v klíštěcích slinných žlázách.

První článek o použitelnosti RNAi ve výzkumu klíšťat byl publikován v roce 2003, kdy byl zkoumán vliv dsRNA na hladinu HBP (histamin vázající protein) (Aljamali., 2003). Když byla dsRNA injikována do nenasátých samic byla schopná se dostat do slinných žláz a způsobit sekvenčně specifickou degradaci mRNA a zároveň snížení histamin-vazebné kapacity slinných žláz. Tato skutečnost naznačuje, že dsDNA se může rozšířit z místa vstupu do různých tkání. Došlo i k ovlivnění sání klíšťat, což naznačuje, že HBP je pro klíšťata důležitý pro efektivní sání. Následovaly pokusy s potlačením exprese proteinu Salp14 a jeho paralogů, u kterých se předpokládají antikoagulační účinky (Jackson a kol., 2003). Autoři navrhli dsRNA pro Salp14, která ale utlumila produkci celé rodiny paralogů proteinu Salp14. Tento fakt je v souladu s předchozím zjištěním, které naznačuje, že RNAi není absolutně cílově specifická, ale je siRNA specifická. Jedna siRNA je schopná umlčet cílový gen, ale také geny, které se alespoň z 80% shodují se sekvencí siRNA. Protože RISC obsahuje 21-26 nukleotidů, není překvapením, že mohou být vypnuty i geny s podobným rozsahem.

## 2. CÍLE PRÁCE

Cílem práce je charakterizovat rodinu proteinů o molekulové hmotnosti 18,7 a 19 kDa, pokusit se najít jejich funkci a případný efekt na imunitu hostitele a sání klíšťat. Použila jsem dva různé přístupy. Prvním bylo vytvoření rekombinantního proteinu a druhým způsobem byla RNA interference, díky které je možné zastavit syntézu daného proteinu a jeho nepřítomnost pak umožňuje sledovat případný fenotypový projev.



### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

##### RNA a DNA agarózová elektroforéza

| Název roztoku                   | Složení  |
|---------------------------------|--|
| 10 x TBE pufr                   | DEPC H <sub>2</sub> O; 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA; 0,89 M kyselina boritá; 0,89 M Tris                 |
| 1 x TBE pufr                    | 10 x TBE pufr 10 x zředěný v DEPC H <sub>2</sub> O   |
| 1 x TAE pufr                    | 40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA  |
| EtBr                            | Ethidium bromide 10 mg/ml  |
| Agaróza I (Amresco)             | 1 % agaróza pro DNA ELFO v 1 x TAE pufru   |
|                                 | 1,2 % agaróza pro RNA ELFO v 1 x TBE pufru   |
| 6 x Loading Dye (MBI Fermentas) | 0,25% bromfenolová modř; 0,25% xylencyanol, 30% glycerol; 1,2% SDS; 60 mM fosfát sodný (MBI Fermentas) |
| DNA standard                    | GeneRuler™ 100bp DNA ladder (MBI Fermentas)  |
| DEPC H <sub>2</sub> O           | Diethylpyrokarbonát 1000 x ředěný v dd H <sub>2</sub> O, odstátý přes noc a vyautoklávovaný            |

##### Média pro pěstování bakterií

| Název roztoku             | Složení  |
|---------------------------|--|
| SOC médium                | 2 % bacto-trypton; 0,5 % bacto-yeast extract; 0,05 % NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM glukóza; pH 7,0; sterilní |
| LB (Luria-Bertani) médium | 1 % bacto-trypton; 0,5 % bacto-yeast extract; 0,5 % NaCl; pH 7,0; sterilní   |
| LB agar                   | 1,5 % bacto-agar v LB médiu  |
| IPTG                      | Isopropyl-β-D-thiogalactoside (zásobní roztok 1 M)   |
| Antibiotika               | Ampicilin (zásobní roztok 50 mg/ml H <sub>2</sub> O)   |

##### Použité soupravy (Kity)

| Použitá metoda   | Název   |
|------------------|---|
| Sekvence DNA     | Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) |
| Izolace plazmidu | JET quick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed)                       |

|  |   |
|--|---|
| Čištění PCR produktu z reakce                | JET quick Gel Extraction Spin Kit (Genomed)   |
| Čištění PCR produktu z agarózového/EtBr gelu | JET quick PCR Purification Spin Kit (Genomed) |

### SDS-PAGE a Western Blot

| Název roztoku               | Složení  |
|-----------------------------|--|
| 5 x Elektroforetický pufr   | 0,125 M Tris; 0,96 M glycin; 0,5% SDS  |
| 5 x Gelový pufr             | 1,875 M Tris; pH 8,8   |
| 5 x Vzorový redukující pufr | 0,75 m Tris-HCl, pH 6,8; 5% SDS, 50% glycerol; 0,5% dithiotreitol; 0,25% bromfenolová modř |
| Odbarvovací roztok          | 25% methanol, 10% kyselina octová  |
| Proteinový standard - LMW   | LMW Electrophoresis Calibration Kit (Amersham)   |
| Barvicí roztok              | 0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol, 10% kyselina octová                    |
| PBS-Tween                   | 1 x PBS; 0,05% Tween 20  |
| 5 x Blotovací pufr          | 0,125 M Tris; 0,96 M glycin; 0,1% SDS; 20% methanol  |
| Blokovací pufr              | 5% sušené mléko v PBS Tween 20   |
| 10% (w/v) SDS               | Laurylsulfát sodný   |
| 10% (w/v) Amonium persulfát |  |
| 30% (v/v) glycerol          |  |
| TEMED                       | N, N, N', N'- tetramethylenediamine  |
| 30% AA                      | Acrylamide a bisacrylamide   |
| Protilátky                  | SwAR, SwAM   |
| Substrátový roztok          | ~10 mg diaminobenzidinu, 50 $\mu$ l H <sub>2</sub> O, 100 ml 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8        |

### Expresa, purifikace rekombinantního proteinu

| Název roztoku      | Složení  |
|--------------------|--|
| Resuspendační pufr | 20 mM Tris-HCl; pH 8,0   |
| Izolační pufr      | 2 M urea; 20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 10 mM imidazol; 1 mM 2-merkaptetanol; 2 % Triton X-100; pH 8,0 |
| Solubilizační pufr | 6 M guanidin hydrochlorid; 20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM imidazol;                                |

|                           |   |
|---------------------------|---|
|                           | 1 mM 2-merkaptoetanol; pH 8,0                                 |
| Vazebný ekvilibrační pufr | 8 M urea; 20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 10 mM imidazol; pH 7,8  |
| Eluční pufr               | 8 M urea; 20 mM Tris-HCl; 0,5 M NaCl; 0,5 mM imidazol; pH 7,8 |

### Příprava ds RNA

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Extrakce z gelu         | Jet Quick Gel Extraction Spin Kit (Genomed).                                      |
| Purifikace PCR produktu | Jet Quick Plasmid miniprep kit (Genomed)  |
| Miniprep                | QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen)   |
| Proteináza K            | 1 µl proteináza K (20mg/ml) ve 150 µl 10 mM Tris-HCl pH 8, 2 mM CaCl <sub>2</sub> |

### Příprava mRNA

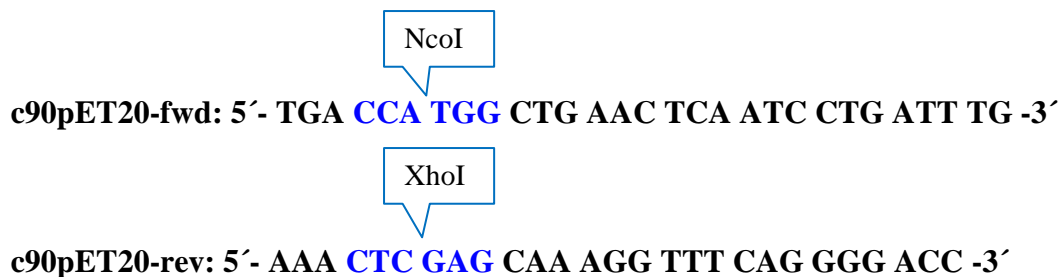
|           |  |
|-----------|--|
| RNA-later | RNA protektivní, stabilizující roztok (Ambion) |
| Triagent™ | SIGMA®, Technical Bulletin MB-205, 1999        |

## 3.2. PŘÍPRAVA REKOMBINANTNÍHO PROTEINU

### 3.2.1. Příprava vektoru pro exexpresi rekombinantního c90

Specifické expresní primery byly navrženy ručně, podle molekuly sekvence genu pro c90 získané z cDNA knihovny ze slinných žláz samic jeden den po přísátí tak, aby zaklonovaný gen byl přepisován bez signální sekvence a ve správném čtecím rámci. Při navrhování 5' primeru bylo nezbytné přidat dvě báze za restrikční místo pro Nco I z důvodu zachování ORF. Pro zaklonování byl použit vektor pET 21 d+ (Novagen). Při translaci je syntetizována tzv. histidinová kotva (6xHis) na C-konec rekombinantního proteinu, která později umožní purifikaci proteinu na koloně obsahující Ni<sup>2+</sup> ionty. Plazmid obsahuje T7 promotor, který umožňuje účinné řízení transkripce exprimovaných genů. Nese také rezistenci na ampicilin, díky tomu je možné eliminovat bakterie *E. Coli*, které plazmid neobsahují. Použitými restrikčními enzymy byly NcoI a XhoI (MBI Fermentas).

Expresní primery:



Složení PCR reakce – složení reakční směsi:

10 x PCR pufr ..... 2,5 µl  
dNTPs (10 mM) ..... 0,5 µl  
MgCl<sub>2</sub> (50 mM) ..... 0,75 µl  
c90pET20fwd (50 mM) .... 1,0 µl  
c90pET20rev (50 mM) ..... 1,0 µl  
Taq polymeráza (5U/µl) ... 0,25 µl  
dd H<sub>2</sub>O ..... do 25 µl

PCR byla provedena v cycleru (Applied biosystems) tímto programem:

- |                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| 1. denaturace: 93 °C, 3 minuty  | } 30cyklů |
| 2. denaturace: 93 °C, 20 sekund |           |
| 3. annealing: 55 °C, 45 sekund  |           |
| 4. elongace: 72 °C, 1 minuta    |           |

Výsledek reakce byl zkontrolován v 1% TAE agarózovém gelu obsahujícím ethidium bromid (1 µl na 100 ml 1% agarózy v TAE), kdy 10 µl PCR reakce bylo smícháno se 2 µl 6x Loading Dye Solution (MBI Fermentas). Pod UV světlem byla určena velikost produktu porovnáním se standardem GeneRuler™ 100bp DNA ladder (MBI Fermentas).

#### 3.2.1.1. Purifikace produktu PCR reakce

Výsledný PCR produkt byl purifikován z gelu pomocí kitu JETquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed). V několika krocích tak byly z reakce odstraněny nežádoucí složky, jako jsou např. DNA polymeráza, primery, nukleotidy a soli. Výsledkem byla přečištěná DNA, která byla eluována do 40 µl dd H<sub>2</sub>O. Poté byla spektrofotometricky stanovena její koncentrace.

### 3.2.1.2. Ligace PCR produktu do vektoru pET21d+

pET 21d+ .....0,5  $\mu$ l

ligáza .....0,5  $\mu$ l

2x ligační pufr ....3  $\mu$ l

PCR produkt .... 2  $\mu$ l

### 3.2.1.3 Restrikční reakce

Tango pufr (10x) .... 4  $\mu$ l

NcoI ..... 2  $\mu$ l

XhoI ..... 2  $\mu$ l

vzorek ..... 32  $\mu$ l

Směs byla inkubována 2 hodiny při 37 °C.

### 3.2.1.4. Transformace kompetentních bakterií *E. coli* kmen TOP10

K 50  $\mu$ l kompetentních buněk OneShot®TOP10 (Invitrogen) bylo přidáno 6  $\mu$ l ligační směsi. Směs byla ponechána 30 minut na ledu. Následně byly bakterie vystaveny teplotnímu šoku 42 °C/1 minuta a ihned zchlazeny na ledu. Poté bylo k bakteriální suspenzi přidáno 250  $\mu$ l SOC média a bakterie byly kultivovány při třepání 230RPM/37 °C/ 60 minut. Pro získání jednotlivých kolonií byla tato bakteriální kultura vyseta na LB/agar médium s ampicilinem (50  $\mu$ g/ml). Kultura byla rozetřena a ponechána přes noc při 37 °C. Pozitivní kolonie byly přeočkovány do 4 ml LB média s ampicilinem (c=50  $\mu$ g/ml) a kultivovány při třepání (230RPM/37 °C/ noc).

### 3.2.1.5. Izolace plazmidu

Z narostlých kultur byly izolovány plazmidy pomocí JET Quick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed) dle přiloženého návodu. Plazmidová DNA byla eluována do 40  $\mu$ l dd H<sub>2</sub>O. Izolovaný plazmid se zaklonovaným genem pro c90 byl uchováván při -20 °C. Přítomnost zaklonovaného genu byla ověřena PCR reakcí dle výše uvedeného protokolu a sekvenováním v sekvenační laboratoři.

### **3.2.2. Příprava rekombinantního proteinu c90**

#### **3.2.2.1. Transformace bakteriálního kmene BL21 Star™ (DE3)**

Přečištěný expresní plazmid byl transformován do expresních buněk *E. Coli* BL21 Star™(DE3) (Invitrogen). Způsob transformace je uveden výše.

#### **3.2.2.2. Exprese rekombinantního proteinu**

Kultura narostlá ve 250 µl SOC média byla převedena do 10 ml LB média s ampicilinem (50 µg/ml) a kultivována za stejných podmínek přes noc. Následně byly odebrány 2 ml, které byly přeneseny do 300 ml LB média s ampicilinem, tato kultura se nechala narůst na OD=0,6. V tomto okamžiku bylo přidáno IPTG na celkovou koncentraci 1mM a kultura se nechala 3 hodiny třepat při 37 °C.

#### **3.2.2.3. Izolace rekombinantního proteinu z bakteriální kultury**

Bakterie byly získány z média centrifugací v 50ml centrifugačních zkumavkách (8500 ot/min, 10 minut, 4°C). Supernatant byl odstraněn, pelet obsahující bakterie rozpuštěn v 10 ml resuspendačního pufru. Sonikací ultrazvukem (3 x 15 s) na sonikátoru (Hielscher) byla rozrušena bakteriální stěna. Suspenze byla následně centrifugována (13000 RPM, 10 minut, 4°C). Supernatant obsahující cytoplazmatické proteiny byl uchován pro kontrolu při -20°C. Pelet byl rozpuštěn v 6 ml izolačního pufru a sonikován (3 x 15 s). Suspenze byla centrifugována (13000 RPM, 10 minut, 4°C). Supernatant obsahující membránové proteiny byl uchován pro kontrolu při -20°C. Přečišťování v izolačním pufru bylo opakováno dvakrát. Zbylé pelety byly rozpuštěny v 5 ml solubilizačního pufru mícháním v kádince při laboratorní teplotě 1 hodinu. V tomto kroku byla rozrušena inkluzní tělíska obsahující exprimovaný rekombinantní protein. Suspenze se poté centrifugovala při (13000 RPM, 15 minut, 4°C). Supernatant obsahující rekombinantní protein byl použit pro následný refolding a purifikaci. Pelet se zbytky membrán inkluzních tělísek byl odstraněn.

#### **3.2.2.4. Kontrola exprese rekombinantního proteinu**

Přítomnost a čistota proteinu byla ověřena pomocí SDS-PAGE (Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu) na zařízení Mighty Small II SE250/SE260 (Hofer). Před nanesením na gradientový polyakrylamidový gel (5-17%) byly vzorky smíchány s 5 x

vzorkovým pufrům (5  $\mu$ l pufru a 20  $\mu$ l vzorku) a denaturovány při 100°C 5 minut. Pro elektroforézu bylo použito napětí 100V, po zarovnání vzorků v gelu bylo zvýšeno na 200V. Jako marker molekulových hmotností byl použit proteinový standard LMW Electrophoresis Calibration Kit (Amersham). Po ukončení elektroforézy byl gel obarven v Coomassie brilliant blue R250 a odbarven v odbarvovacím roztoku. Vzorky obsahující vysoké koncentrace imidazolu či guanidin hydrochlorid, byly před přípravou na akrylamidový gel odsoleny dialýzou 1 hodinu proti destilované vodě.

#### 3.2.2.5. Refolding rekombinantního proteinu

1M DTT (Dithiothreitol) byl naředěn do roztoku proteinu zakoncentrovaného pomocí Amiconu (Millipore, 10 000Da cut-off) na konečnou koncentraci 10mM a směs se nechala 45 minut míchat při laboratorní teplotě. (LT). Potom byl roztok rozkapán do stonásobného objemu TBS pufru a míchán nejdříve 1 hodinu při LT a potom přes noc při 4 °C. Roztok byl druhý den centrifugován (10000g, 15 minut), čímž se roztok zbavil precipitátu. Supernatant byl na Amiconu zkoncentrován a převeden do TBS pufru.

#### 3.2.2.6. Purifikace rekombinantního proteinu

Použité fúzní proteiny obsahující na C-konci sekvenci šesti histidinů, které umožňují použití afinitní chromatografie (IMAC), purifikace na Ni<sup>2+</sup> koloně. Kolona byla nejprve připravena postupným nanesením 20 ml 50 mM EDTA a 20 ml MQ vody a poté nabita Ni<sup>2+</sup> (NiSO<sub>4</sub>) a ekvilibrována TBS pufrům. Vzorek byl nanášen rychlostí 0,5-1 ml/min. Následoval 5 mM imidazol (TBS), 20 mM imidazol (TBS), 50 mM imidazol (TBS), 100 mM imidazol (TBS) a 500 mM imidazol (TBS). Odebrané frakce byly opět zkontrolovány na gelu pomocí metody SDS-PAGE.

Druhou možností purifikace proteinu byla gelová filtrace, při které byl použit pufr 50 mM Tris, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, průtok 0,5 ml/hod a frakce byly odebírány po 2 ml. Gelová filtrace byla provedena na analytické FPLC koloně Superose 12 (Pharmacia). Tímto způsobem se proteiny rozdělí podle velikosti.

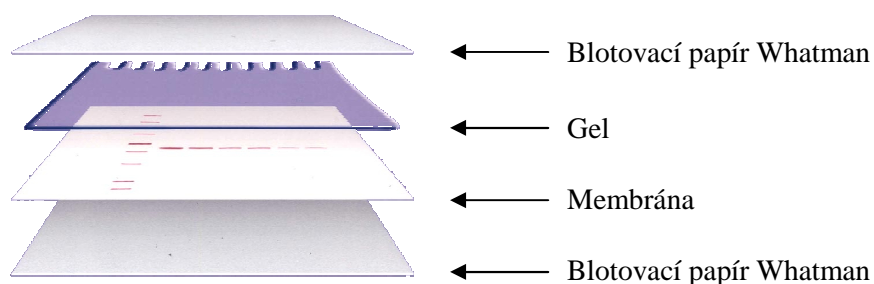
Posledním způsobem čištění proteinu byla Mono Q purifikace, založená na principu iontové výměny. Protein byl promýván zvyšujícím se gradientem NaCl (0-1M) v prostředí 20mM Tris-CL, pH 8,5. Podle výsledku SDS-PAGE byly vybrány frakce s nejvyšším obsahem proteinu, a ty byly zakoncentrovány na Amiconu.

### 3.2.2.7. Příprava protilátek

Z králíka bylo nejprve odebráno preimunní sérum. Poté byl imunizován roztokem proteinu s nekompletním Freundovým adjuvans. Imunizace byla prováděna 5x v intervalu 7 dní.

### 3.2.2.8. Western Blot

Vzorky rozdělené na klasické SDS-PAGE byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu. Blotovací sandwich vypadá následovně: blotovací papír Whatman, membrána, gel, blotovací papír Whatman (Obr.1). Všechny součásti blotu se před použitím promyjí několik minut v blotovacím pufru. Přenos trval 90 minut při 150 mA. Poté byl oddělen marker a obarven v 0,1% amidoblack v odbarvovacím pufru (methanol:kys. octová:voda, 25:10:65), membrána byla blokována v 5% roztoku sušeného odtučněného mléka v PBS/Tween 1 hodinu, inkubována 1 hodinu v primární protilátce (c90 imunní sérum, 1:100 v PBS/Tween, Anti-His 1:1000 v PBS/Tween) a 45 minut v sekundární protilátce SwAR/Px nebo SwAM/Px, Sevac, 1:1000 v PBS/Tween). Mezi všemi kroky byla membrána důkladně promyta v PBS/Tween (3x5 minut). Proteiny byly obarveny pomocí 3,3'-diaminobenzidinu (10mg DAB, rozpuštěno v 30 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5), který se během reakce peroxidázy s  $H_2O_2$  oxiduje a barví se do hněda. Reakce byla zastavena přemístěním membrány do destilované vody.



**Obr.1: Sandwich na Western blot**



### 3.3. RNA INTERFERENCE

#### 3.3.1. RNAi protokol

##### PCR amplifikace

Specifické primery pro RNAi byly navrženy ručně, podle molekuly sekvence genu pro c90 získané z cDNA knihovny ze slinných žláz samic jeden den po přisátí. Templátem pro PCR reakci byla cDNA ze slinných žláz klíšťat pět dní nasátých.

Navržené primery:

Apal

**c90 – RNAi – F: AT GGG CCC TTA GCA GGT CAA ATG AC**

Xbal

**c90 – RNAi – R: TA TCT AGA TTA CAA AGG TTT CAG GGG AC**

PCR reakce:

10 x Buffer Taq ..... 1 µl  
dNTPs (10 mmol/každý)..... 0,25 µl  
Primer c90 – RNAi – F (10 mmol) ..... 1 µl  
Primer c90 – RNAi – R (10 mmol) ..... 1 µl  
Taq polymeráza ..... 1 µl  
H<sub>2</sub>O ..... 4,75 µl  
Celkem 10 µl

Průběh cyklu:

1. denaturace 94°C 5 minut  
2. annealing (nasedání) 55°C 30 sekund  
3. syntéza 72°C 1 minuta

} 30 cyklů

PCR produkt byl vyříznut z gelu a přečištěn pomocí Jet Quick Gel Extraction Spin Kit (Genomed). DNA byla eluována 50 µl dd H<sub>2</sub>O.

## Restrikce

Restrikční reakce probíhala 2 hodiny při 37°C ve 30µl s následujícím složením:

|                        | <u>pl 1</u>     | <u>PCR produkt</u> |
|------------------------|-----------------|--------------------|
| Buffer TANGO 10x ..... | 3 µl            | 3 µl               |
| Enzym .....            | 1 µl od každého | 1 µl od každého    |
| DNA .....              | 3 µl(0,5 µg)    | 20 µl              |
| H <sub>2</sub> O ..... | 23 µl           | 6 µl               |

## Purifikace

PCR produkt i plazmid byli přečištěny komerčním purifikačním kitem JET quick Gel Extraction Spin Kit a JET quick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed).

## Ligace

Ligační reakce probíhala přes noc při 16 °C v objemu 10 µl s použitím pGEM T-easy kitu ve složení:

|                               |      |
|-------------------------------|------|
| Buffer 2x .....               | 5 µl |
| Naštípaný plazmid pl 10 ..... | 2 µl |
| DNA .....                     | 2 µl |
| T4 ligáza .....               | 1 µl |

## Klonování plazmidu do TOP 10 buněk

K buňkám OneShot®TOP10 (Invitrogen), které byly ponechány 5-10 minut na ledu, byl přidán plazmid, celkový objem reakce činil 25 µl. Po 30 minutách na ledu následoval heat shock (42°C, 1 minuta na ledu), po kterém bylo přidáno 130 µl LB méda a poté se směs třepala 1 hodinu při 37°C. Suspenze byla nakonec vyseta na Petriho misku a přes noc kultivována. Narostlé kolonie byly sterilně vybrány, přeočkovány a opět kultivovány přes noc. Přítomnost plazmidu nesoucího gen pro c90 v bakteriích byla ověřena PCR. Nakonec byl plazmid přečištěn pomocí kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) a osekvenován v sekvenční laboratoři.

### Restrikce purifikovaného plazmidu

Restrikční reakce probíhala 2 hodiny při 37°C, v objemu 50 µl a ve složení:

10 µg plazmid ..... 30 µl  
Buffer TANGO ..... 5 µl  
Enzym ..... 6 µl  
H<sub>2</sub>O ..... 9 µl

### Purifikace linearizovaného plazmidu

Směs vzorku, 25 µl proteinázy K a 3,75 µl 10% SDS byla inkubována 30 minut při 50°C. Dále bylo přidáno 80 µl fenol-chloroformu, vzorek byl pečlivě promíchán a 5 minut stočen při nejvyšších otáčkách. K odebrané vodné fázi (~80 µl) bylo přidáno 80 µl chloroformu a opět promícháno a stočeno. K následně odebrané vodné fázi (~80 µl) bylo přidáno 56 µl izopropanolu a zamícháno. Směs byla inkubována při laboratorní teplotě 15 minut a potom stočena 30 minut při nejvyšších otáčkách. Pelet byl vymyt 80 µl 80% EtOH a stočen 8 minut. Plazmid byl eluován 20 µl DEPC H<sub>2</sub>O a jeho koncentrace spektrofotometricky zkontrolována.

### Syntéza ss RNA

Syntéza jednovláknové RNA probíhala při 37°C alespoň 8 hodin, směs byla promíchána každou hodinu. Mimo led byla pro každé vlákno namíchána směs o tomto složení:

dNTPs ..... 8 µl (2 µl od každého)  
Buffer (37°C, vortex) ..... 2 µl  
Lin. plazmid ..... x µl (1 µl, maximálně 8 µl)  
Enzyme mix ..... 2 µl  
H<sub>2</sub>O ..... doplnit do 20 µl (H<sub>2</sub>O + plazmid = 8 µl)

### Purifikace ssRNA

K namíchanému vzorku byl přidán 1 µl DNAzy, směs byla inkubována 15 minut při 37°C. Poté bylo přidáno 115 µl H<sub>2</sub>O a 15 µl acetátu amonného, směs se zamíchala. Po přidání

150  $\mu$ l fenol-chloroformu byl vzorek důkladně promíchán na vortexu a stočen 5 minut při nejvyšších otáčkách. K vodné fázi (~ 150  $\mu$ l) bylo přidáno 150  $\mu$ l chloroformu, zvortexováno a stočeno, k následně odebrané vodné fázi (~ 150  $\mu$ l) bylo přidáno 105 – 110  $\mu$ l izopropanolu, směs byla promíchána a inkubována při laboratorní teplotě 15 minut, poté byla stočena 30 min. Jednovláknová RNA byla eluována 10-20  $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O a její koncentrace byla zkontrolována spektrofotometricky (musí být > 3000  $\mu$ g/ml).

### Hybridizace

Sense a antisense ssRNA byly smíchány v poměru 1:1 tak, aby výsledná koncentrace 3  $\mu$ g/ $\mu$ l. Do skleněného odměrného válce o objemu 2 l, který byl obalený hliníkovou fólií, byla nalita vroucí voda. Vzorek byl inkubován alespoň 8 hodin při laboratorní teplotě (dokud voda nevystydlá). Výsledek hybridizace byl ověřen na agarózovém TBE gelu (Ambion loading dye, použít 1  $\mu$ g RNA).

### **3.3.2. Injikace ds RNA do klíšťat**

Klíšťata byla injikována intrahemocoelárně pomocí mikromanipulátoru (Narishige) a skleněných kapilár. 50 klíšťat ve dvou pokusech bylo injikováno 1  $\mu$ l dsRNA (3  $\mu$ g/ $\mu$ l) specifickou proti c90. Další den byla tato klíšťata ponechána sát na morčeti. Po pěti dnech sání byla klíšťata vypitvána.

### **3.3.3. Získávání klíštěcích slin**

Nasáté samice byly přichyceny na podložní sklíčka lepící páskou, pomocí modelíny se upevnila kapilára, která se nasunula klíštěti na hypostom a jednu palpu. Na hřbet klíštěte bylo kápnuto 1–2  $\mu$ l roztoku pilocarpinu (2,5 mg pilocarpinu/150  $\mu$ l ethanolu). Podložní sklíčka s klíšťaty byla potom uložena do termostatu na 37 °C se zvýšenou koncentrací CO<sub>2</sub>. Asi po dvou hodinách byly všechny kapiláry vyprázdněny pomocí balónku s hadičkou. Získané sliny byly uchovány v -70 °C.

### **3.3.4. Izolace tkání z klíšťat a totální RNA**

Klíšťata byla vypitvána ve sterilním PBS pufru, získané orgány byly uchovány v RNA-lateru. Orgány byly před homogenizací přeneseny do Trireagentu™ (1 ml na každých 50-100 mg tkáně). Získaný homogenát byl přenesen do 1,5 ml mikrozkušavek a

centrifugován 12000g, 10 minut, 4 °C, supernatant byl přenesen do nové 1,5 ml mikrozkušavky a 5 minut inkubován při laboratorní teplotě (LT). Následovalo vysrážení chloforormem (na 1 ml Trireagent™ přidat 0,2 ml chloroformu), třepání 15s a inkubace 2 – 15 minut (LT). Vzorek byl opět centrifugován 12000g, 15 minut, 4 °C, horní vrstva s RNA byla přenesena do nové 1,5 ml mikrozkušavky, do které byl přidán isopropanol (0,5 ml na 1 ml Trireagent™), směs byla zamíchána překlopením a inkubována 5 – 10 minut (LT). Vzorek byl centrifugován 12000g, 10 minut, 4 °C, supernatant odstraněn a k peletu byl přidán 75 % ethanol (1 ml na 1 ml Trireagent™) a pelet byl promyt na vertexu. Následovala opět centrifugace 7500g, 5 minut, 4 °C, supernatant byl odstraněn. RNA byla vysušena od ethanolu 20 minut na vzduchu (LT) a bylo k ní přidáno 30 µl DEPC H<sub>2</sub>O, promícháno a inkubováno 10 – 15 minut při 55 – 60 °C.

Množství získané RNA bylo stanoveno spektrofotometrickým měřením proti sterilní DEPC H<sub>2</sub>O při vlnové délce 260 nm pomocí spektrofotometru Biophotometer (Eppendorf). Kvalita RNA byla potvrzena gelovou elektroforézou.

### **3.3.5. Dvukroková semikvantitativní RT-PCR**

Tento krok byl proveden pomocí kitu Enhanced avian reverse transcription reaction for two-step RT-PCR (Sigma-Aldrich). Templátem pro RT-PCR byla cDNA z různých tkání (střevní tkáň, slinné žlázy, ovaria) jedinců *Ixodes ricinus*. Byly použity primery c90pET20-fwd a c90pET20-rev. Pro kontrolní reakci byly použity gen-specifické primery pro actinový gen, jehož hladina mRNA je konstantní.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Proteiny o molekulové hmotnosti 18,7 a 19 kDa

Proteiny o molekulové hmotnosti 18,7 a 19 kDa společně tvoří u klíštěte *Ixodes ricinus* skupinu minimálně 13 homologních genů. Vykazují značnou podobnost s homology nalezenými u *I. scapularis* a *I. pacificus*. Výsledky získané z cDNA knihoven čtyř různých stádií sání klíštěte poukazují na overexpresi těchto proteinů v prvních čtyřiaadvaceti hodinách sání.

Pro pokusy byl vybrán zástupce této rodiny, označen jako contig90 (Obr. 1). Toto označení pochází z bioinformatické analýzy cDNA knihoven. Pomocí programů NetNGlyc a NetOGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) bylo zjištěno, že tento protein neobsahuje žádné glykosylace, což naznačuje, že použitím bakteriálního expresního systému může být získán protein v aktivní formě. Transkript c90 je 558 bazí dlouhý. Maturovaný protein tvoří 167 aminokyselin a jeho vypočítaná molekulová hmotnost je 18843 kDa. Izoelektrický bod tohoto proteinu je 6,1, jedná se tedy o velice slabě kyselý protein. Hotový protein obsahuje 12 konzervovaných cysteinů, které pravděpodobně tvoří disulfidické můstky, což může mít za následek vytváření multimerů a síťování.

```
ccttagcaagaactgataatgatggccgcgcaacttctcattgtaatcgtcgcttggtta
      M A A Q L L I V I V A C L
gcaggtcaaatgacatgcgctgaactcaatcctgattgaaagaaatgtccaaacaaagta
A G Q M T C A E L N P D L K K C P N K V
ttccacgggtccgggatattcgctgggctgcacttacacctgcaggaatggaccaccggaa
F H G P G Y S L G C T Y T C R N G P P E
gatacaaaagaatattggggatatttataaagatgctaccgtgtgctgttgccttcagaat
D T K E Y W G I Y K D A T V C V A L Q N
gatgaccctaacaagttccaacacggttgggacttgcaaaaatggaatgtgtgttcaatat
D D P N K F Q H V G T C K N G M C V Q Y
gaaggaccgaacactcaacaagtatggagccaacttccctgagttgagccagtttcat
E G P N T Q Q V W S Q L P E L R A Q F H
gcgtgacacaccatattcaagcggcgattctgtggaaaagtgcctgtttgtttgcaagaaa
A C D T I S S G D S V E K C L F V C K K
tatcaatatcaatatgaaaaggaggatatttctacggagtttacaaggatggtaataaaa
Y Q Y Q Y E K E G Y F Y G V Y K D G N K
tgcaaaactcgaagatggcgaggtcggcgtctgcttcagtggatgttccacggaaaagaa
C K L E N G E V G V C F S G F C H G K E
tactttccgacaattgataacgggtcccctgaaacctttgtaaataaaataatccttggtga
Y F P T I D N G P L K P L -
ctcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

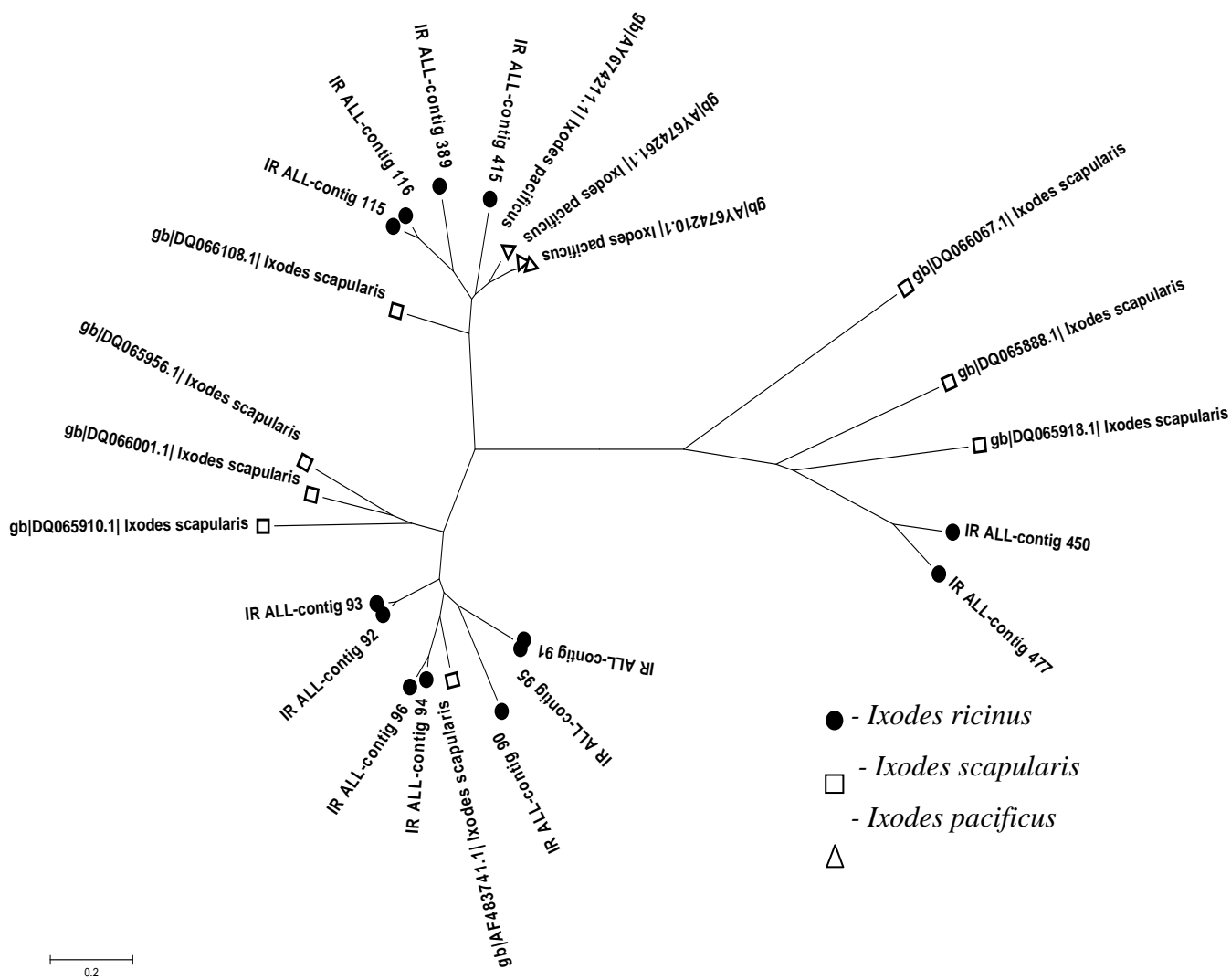
**Obr. 1: Sekvence transkriptu c90 s peptidovou sekvencí.** (žlutě – signální sekvence, oranžově – cysteiny, modře – primery c90pET20-fwd a c90pET20-rev)

Tato skupina proteinů je tvořena nejméně třemi různými polymorfními geny, které sdílejí konzervovanou cysteinovou strukturu a několik domén, což naznačuje shodnou terciární strukturu. Na obrázku 2 je srovnání známých zástupců rodiny ze tří klíšťat rodu *Ixodes*. Příbuznost těchto genů byla zjišťována metodou neighbor-joining, která odhalila 3 hlavní skupiny uvnitř celé rodiny (obr. 3). Tyto tři skupiny zahrnují zástupce ze všech tří druhů, pouze geny identifikované v *I. pacificus* spadají všechny do jedné skupiny, což však může být způsobeno nedostatkem sekvencí spíše než neexistencí jiných genů v *I. pacificus*. Tato skutečnost naznačuje, že tyto 3 skupiny resp. geny musely existovat před tím, než se klíšťata rozdělila do druhů.

|                           |        |          |    |  |     |
|---------------------------|--------|----------|----|--|-----|
| gb ID066001.1             | Ixodes | scapular | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 82  |
| gb ID065956.1             | Ixodes | scapular | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 83  |
| gb ID065910.1             | Ixodes | scapular | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 84  |
| gb AF483741.1             | Ixodes | scapular | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 85  |
| IR_ALL- <i>contig_90</i>  |        |          | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 86  |
| IR_ALL- <i>contig_91</i>  |        |          | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 87  |
| IR_ALL- <i>contig_92</i>  |        |          | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 88  |
| IR_ALL- <i>contig_93</i>  |        |          | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 89  |
| IR_ALL- <i>contig_94</i>  |        |          | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 90  |
| IR_ALL- <i>contig_95</i>  |        |          | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 91  |
| IR_ALL- <i>contig_96</i>  |        |          | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 92  |
| gb AV674261.1             | Ixodes | pacifion | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 93  |
| gb AV674211.1             | Ixodes | pacifion | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 94  |
| gb AV674210.1             | Ixodes | pacifion | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 95  |
| gb ID066108.1             | Ixodes | scapular | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 96  |
| IR_ALL- <i>contig_115</i> |        |          | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 97  |
| IR_ALL- <i>contig_116</i> |        |          | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 98  |
| IR_ALL- <i>contig_115</i> |        |          | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 99  |
| gb ID065918.1             | Ixodes | scapular | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 100 |
| gb ID066067.1             | Ixodes | scapular | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 101 |
| gb ID065888.1             | Ixodes | scapular | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 102 |
| IR_ALL- <i>contig_450</i> |        |          | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 103 |
| IR_ALL- <i>contig_477</i> |        |          | 1  | PAITLIVITATP-GLITVAEYVPSD-WR-GRGDKKEDDPEYISGCLITGVNGDQADNRITVWGRYKADATGCVNLTLDKPEKNNITGLKDGFCY | 104 |
| gb ID066001.1             | Ixodes | scapular | 89 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 162 |
| gb ID065956.1             | Ixodes | scapular | 89 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 162 |
| gb ID065910.1             | Ixodes | scapular | 89 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 162 |
| gb AF483741.1             | Ixodes | scapular | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| IR_ALL- <i>contig_90</i>  |        |          | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| IR_ALL- <i>contig_91</i>  |        |          | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| IR_ALL- <i>contig_92</i>  |        |          | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| IR_ALL- <i>contig_93</i>  |        |          | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| IR_ALL- <i>contig_94</i>  |        |          | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| IR_ALL- <i>contig_95</i>  |        |          | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| IR_ALL- <i>contig_96</i>  |        |          | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| gb AV674261.1             | Ixodes | pacifion | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| gb AV674211.1             | Ixodes | pacifion | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| gb AV674210.1             | Ixodes | pacifion | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| gb ID066108.1             | Ixodes | scapular | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| IR_ALL- <i>contig_115</i> |        |          | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| IR_ALL- <i>contig_116</i> |        |          | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| IR_ALL- <i>contig_115</i> |        |          | 91 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| gb ID065918.1             | Ixodes | scapular | 84 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| gb ID066067.1             | Ixodes | scapular | 81 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| gb ID065888.1             | Ixodes | scapular | 82 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| IR_ALL- <i>contig_450</i> |        |          | 82 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |
| IR_ALL- <i>contig_477</i> |        |          | 82 | EYKR-----ENIQDVMSTLLETQSQEHRGCPKRSSEKVPDCKLAVLCKKPKRQVYHFGHYDQVHS-CLTSGGAGQCRSGC               | 164 |

Obr. 2: Srovnání zástupců rodin proteinů o molekulové hmotnosti 18,7 a 19 kDa z klíčů *Ixodes ricinus*, *I. scapularis* a *I. pacificus*. Variabilní konce molekul byly z důvodu přehlednosti odstraněny. Proteiny jsou uspořádány podle příbuznosti.





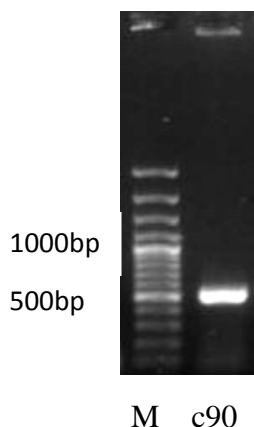
**Obr. 3:** Nezakořeněný strom proteinů o molekulové hmotnosti 18,7 a 19 kDa z klíšťat *I. ricinus* a jim příbuzných zástupců z *I. scapularis* a *I. pacificus*. (Vytvořeno metodou Neighbor-joining v programu MEGA 4.0)

## 4.2. Příprava rekombinantního proteinu c90

### 4.2.1. Amplifikace DNA kódující c90

Pro amplifikaci kódující sekvence genu pro c90 byla jako templát použita cDNA ze slinných žláz klíštěte jeden den po přísátí a gen-specifické expresní primery c90pET20-fwd a c90pET20-rev, upravené pro zaklonování do expresního vektoru pET21d+. Počet cyklů byl stanoven na 30 a teplota pro nasednutí primerů na 55 °C. Výsledný amplifikovaný úsek c90 o

velikosti zhruba 500 bp byl přečištěn pomocí kitu Jet Quick Gel Extraction Spin Kit (Genomed) (obr.4).



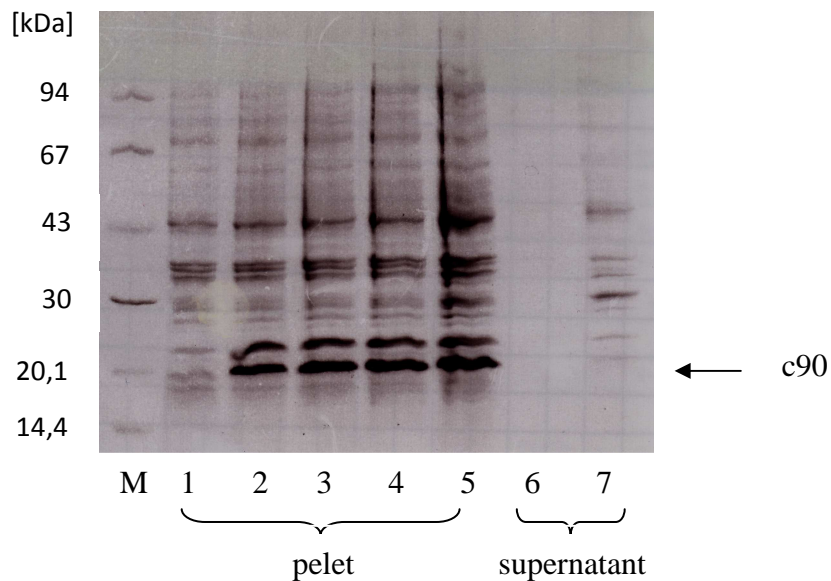
**Obr. 4: Amplifikace cDNA kódující sekvence c90 pomocí PCR (M-marker, c90-produkt PCR)**

#### 4.2.2. Klonování do expresního vektoru

Přečištěný produkt PCR reakce byl zaklonován do expresního vektoru pET21d+ a transformován do kompetentních buněk OneShot®TOP10 (Invitrogen). Z osmi vybraných kolonií byly izolovány plasmidy, u kterých byla pomocí PCR zkontrolována přítomnost požadovaného genu pro c90. Po ověření sekvencí byl vybrán jeden plazmid se správně zaklonovaným genem, a ten byl transformován do expresních buněk BL21 Star(DE3) (Invitrogen).

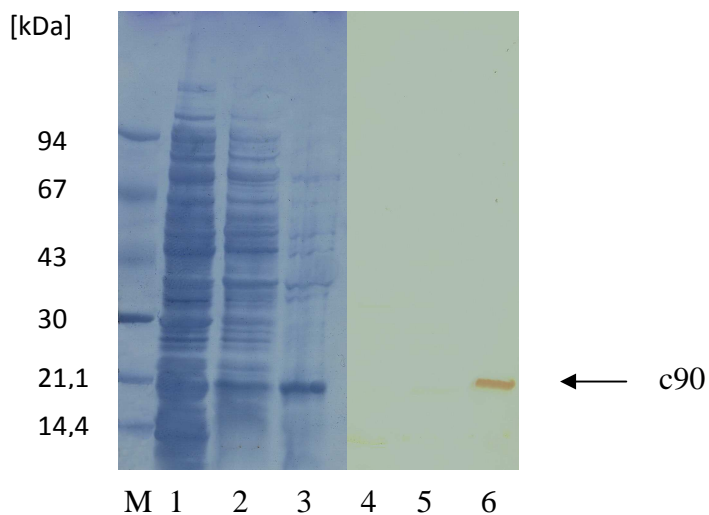
#### 4.2.3. Příprava rekombinantního proteinu

Pro provedení pilotní exprese rekombinantního proteinu bylo kultivováno 300 ml kultury bakterií, které obsahovaly plazmid se zaklonovaným genem pro c90. Exprese byla indukována přidáním IPTG na celkovou koncentraci 1mM. Z kultury byly odebírány vzorky po 3, 6, 9 a 24 hodinách. Po 2-3 hodinách byl již overexprimovaný rekombinantní protein přítomný ve frakci obsahující inkluzní tělíska. Delší exprese neměla vliv na množství exprimovaného proteinu (Obr. 5). Pro expresi ve větším objemu byl vybrán čas 3 hodiny.



**Obr. 5: Pilotní exprese rekombinantního proteinu c90** (M-marker, 1-0 hod., 2-3 hod., 3-6 hod., 4-9 hod., 5-24 hod., 6-0 hod., 7-24 hod.)

Během izolace byly bakteriální proteiny rozděleny na tři frakce: cytosolickou, membránovou a inkluzní tělíska. Rekombinantní fúzní protein byl akumulován v inkluzních tělískách bakterií, jak prokázal Western blot s použitím protilátky proti His-Tagu.(Obr. 6).



**Obr. 6: Izolace rekombinantního proteinu z bakteriální kultury** (M-marker, 1-3: amidoblack, 4-6: Western blot, 1,4-cytoplazmatické proteiny, 2,5-membránové proteiny, 3,6-rozrušená inkluzní tělíska obsahující exprimovaný rekombinantní protein)

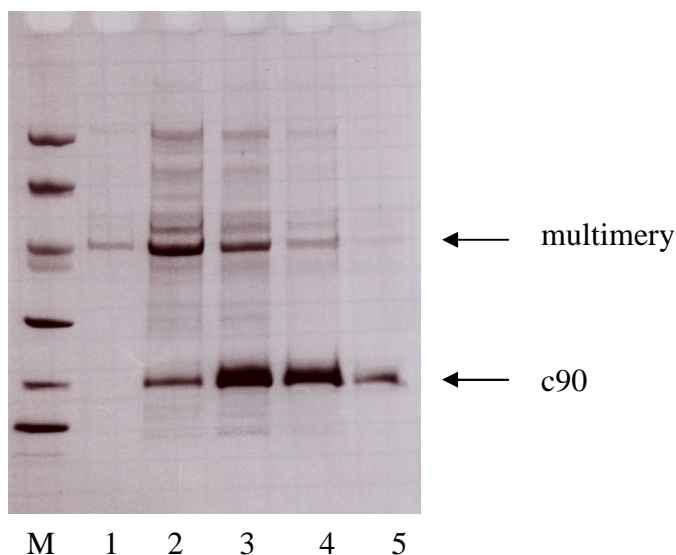
#### 4.2.4. Refolding

Většina eukaryotních proteinů nemá při expresi v bakteriálním expresním systému správnou terciární konformaci kvůli absenci posttranslačně–modifikačních aparátů a eukaryotních chaperonů. Proto je nutné rekombinantní protein refoldovat (znovu složit) do správné konformace. Refolding probíhal metodou naředění do velkého objemu refoldovacího roztoku.

Do vzorku s denaturovaným proteinem byl přidán 1M DTT na konečnou koncentraci 10 mM, míchán 45 minut při RT, rozkapán do stonásobného objemu TBS pufru a míchán přes noc při 15 °C. Roztok byl následně centrifugován (10000g, 15 minut), aby se z roztoku odstranil precipitát. Protein se podařilo úspěšně refoldovat i přesto, že se relativně velké množství vysráželo.

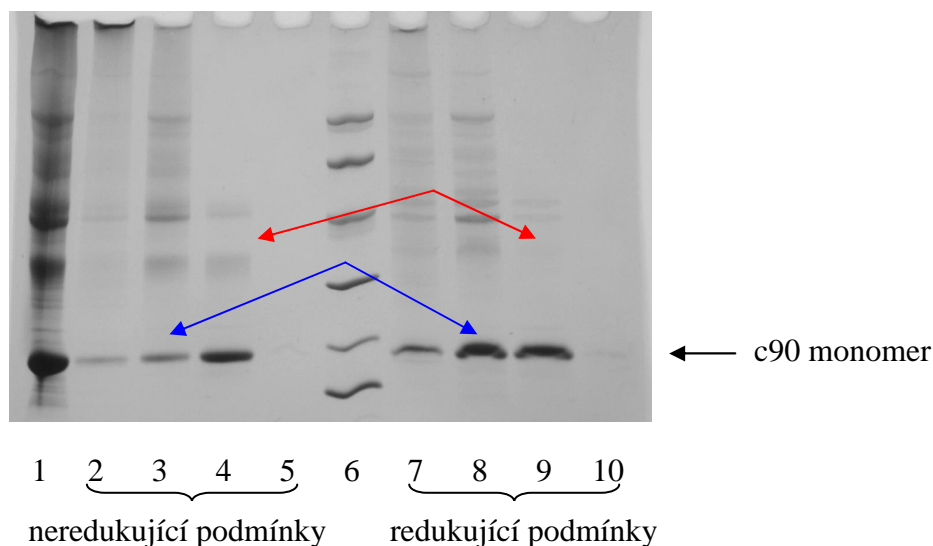
#### 4.2.5. Purifikace

Protein byl následně purifikován na Ni<sup>2+</sup> chelatační koloně, byla změřena absorbance jednotlivých frakcí při  $\lambda=280\text{nm}$  a podle naměřených údajů byly vybrány frakce s nejvyššími hodnotami absorbancí. Ty byly smíchány a analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 7).



**Obr. 7: Purifikace rekombinantního proteinu c90 pomocí Ni<sup>2+</sup> afinitní chromatografie na koloně obsahující Chelating sepharose<sup>TM</sup> Fast Flow (Amersham) s navázanými nikelnatými ionty (M-marker, 1, 2, 3, 4, 5- jednotlivé frakce)**

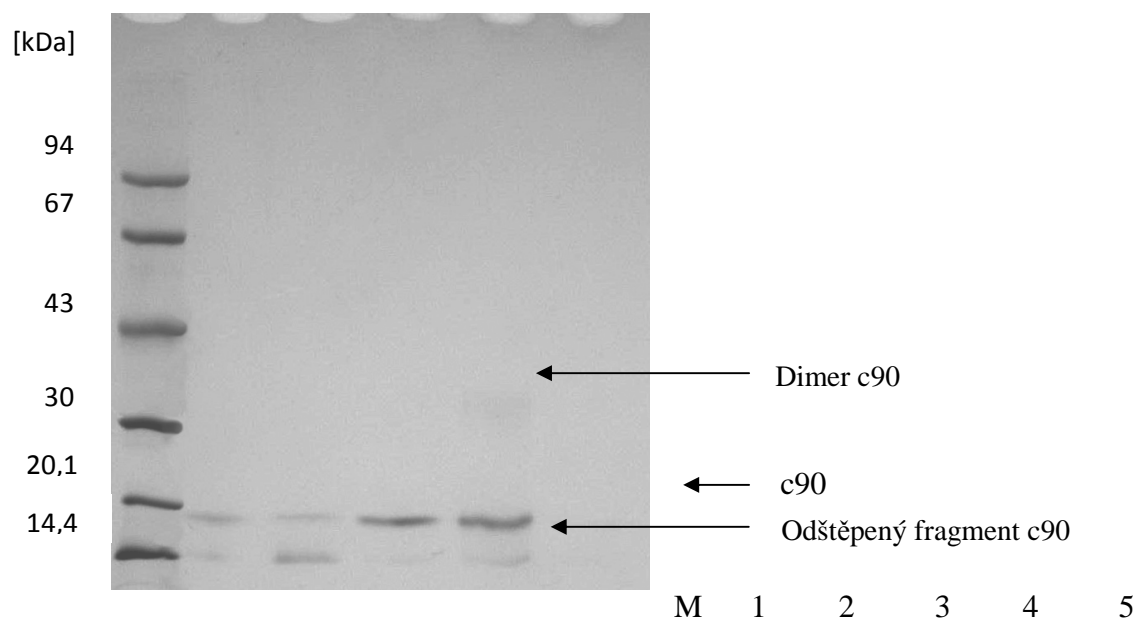
Po afinitní chromatografii byly ve vzorku stále patrné nečistoty, proto byly aplikovány další purifikační kroky, gelová filtrace, a Mono-Q (iontová výměna). Pro gelovou filtraci byly smíchány frakce 3, 4 a 5 z předchozího kroku, které byly následně zakoncentrovány přes Amicon a převedeny do roztoku 50 mM Tris, 0,15 M NaCl a 1 mM EDTA tak, aby výsledný objem činil 0,5 ml. Gelovou filtrací byly odstraněny proteiny o vyšší molekulové hmotnosti, z nichž některé byly pravděpodobně multimery proteinu c90, tvořené pomocí disulfidických můstků. Abychom zjistili, zda c90 skutečně tvoří multimery in vitro, byly frakce z gelové filtrace připraveny pro SDS-PAGE v redukujícím a neredukujícím pufru. Jak je vidět na obrázku 10, některé proužky skutečně byly odstraněny díky redukujícím podmínkám. Rekombinantní c90 tedy skutečně tvoří in vitro multimery (Obr. 8).



**Obr. 8: Rekombinantní protein c90 po gelové filtraci** (1–vzorek před filtrací, 6–marker. Vzorky v jamkách 2-5 jsou shodné se vzorky 7-10, liší se pouze v použitém vzorkovém pufru. Rozdíly jsou patrné zejména mezi jamkami 3 a 8, kde za redukujících podmínek je ve velikosti monomeru více proteinu. Vzorek č. 9 ztratil díky redukci oproti vzorku č. 4 jeden proužek, tvořený pravděpodobně dimerem c90.

Za účelem dosažení vyšší čistoty proteinu byla provedena purifikace pomocí iontové výměny (Mono-Q). Pro tuto metodu byla zvolena směs posledních dvou frakcí získaných při gelové filtraci (frakce 4 a 5, resp. 9 a 10 na obr. 8). Po tomto kroku byl rekombinantní c90 již dostatečně čistý a použitelný pro následnou imunizaci králíka. K dalšímu použití byly vybrány a spojeny frakce č. 3 a č. 4 (Obr. 9). Zajímavé je, že ve všech frakcích se objevil

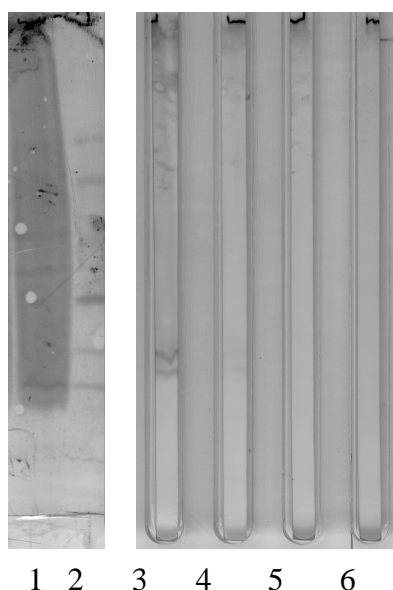
fragment o velikosti přibližně 14 kDa, který vzhledem k jeho dřívější nepřítomnosti je pravděpodobně odštěpnou částí c90. Jak k tomuto odštěpení dochází, není jasné.



**Obr. 9: Mono-Q purifikace** (M-marker, 1-vzorek, který šel na kolonu, 2-5: jednotlivé frakce. Ve frakci 4 je opět patrný proužek velikosti dimeru c90.

#### 4.3. Produkce polyklonálních protilátek

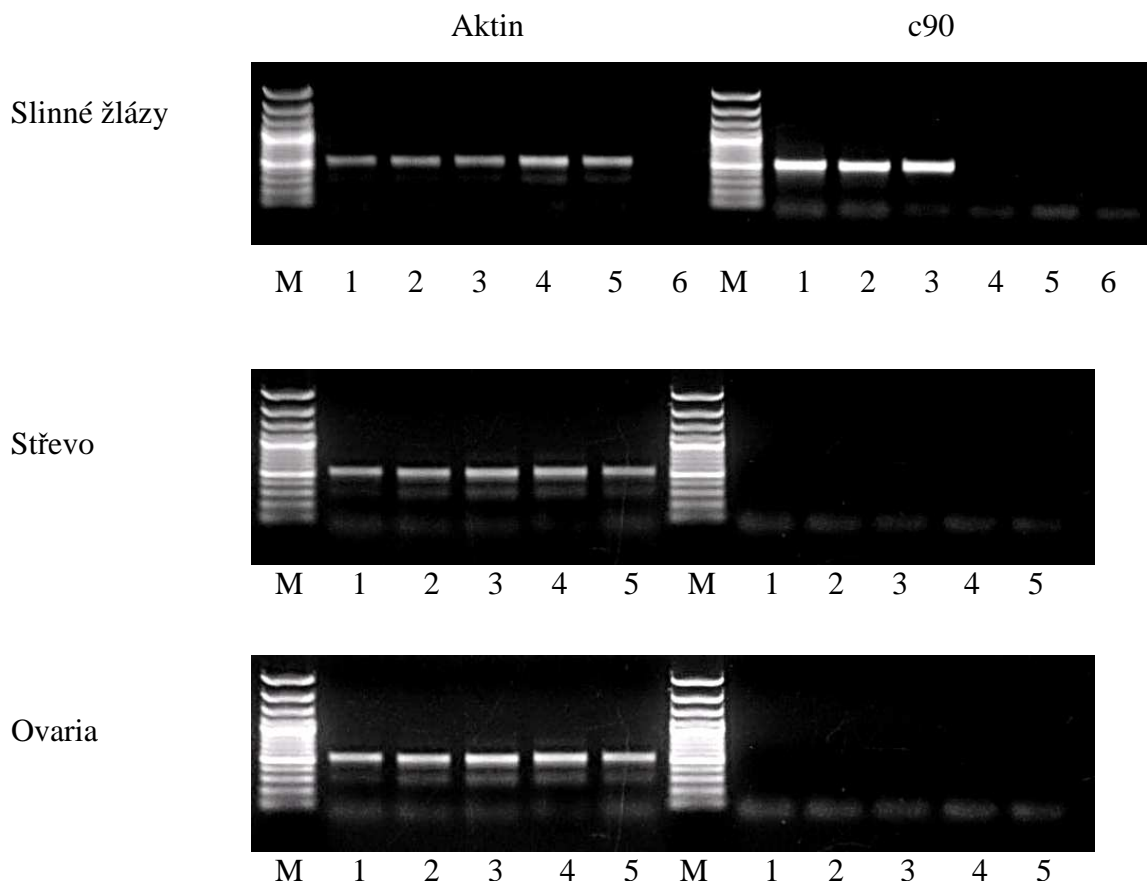
Polyklonální protilátka byla připravena imunizací králíka purifikovaným rekombinantním proteinem c90. Protilátky byly testovány metodou Western blot, která ukázala, že protilátky velmi dobře reagovaly s rekombinantním c90. Jako kontrola protilátek bylo použito preimunní sérum, u kterého protilátky neprokazovaly žádnou reakci (Obr. 10). Protilátka je tedy dostatečně specifická a senzitivní pro detekci c90. Jako optimální ředění polyklonálních protilátek bylo experimentálně určeno ředění 1:100.



**Obr. 10: Test protilátek proti c90** (1-bakteriální lyzát, 2-marker, 3-králičí imunní anti-c90 sérum, 4-6- preimunní králičí sérum)

#### 4.4. Expresa c90 v různých podmínkách

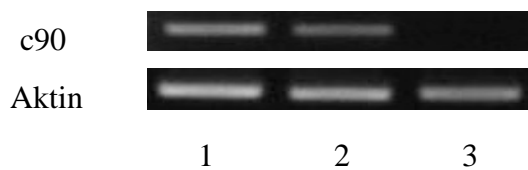
Metodou dvoukrokové RT-PCR byl v normálních samicích c90 detekován pouze ve slinných žlázách nenasátých, 1 denních a 4 denních klíšťat. Ve střevní tkáni ani v ováriích přítomnost c90 zjištěna nebyla v žádném ze stádií sání (obr. 11).



**Obr. 11: Přítomnost genu c90 v různých tkáních a fázích sání samic klíštěte *I. ricinus*** (M-marker, 1-nenasáté samice, 2-2 dny sání, 3-4 dny sání, 4-6 dní sání, 5-plně nasáté samice, 6-negativní kontrola)

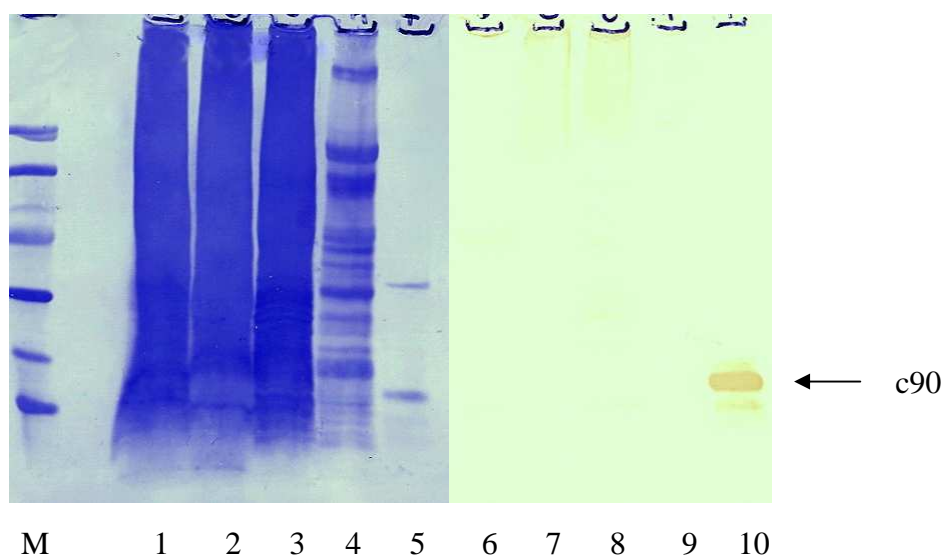
Pro následující pokusy s RNA interferencí bylo třeba potvrdit přítomnost c90 transkriptu v samicích 5 dní po přisátí. Metodou RT-PCR byla exprese genu c90 prokázána ve slinných žlázách a ve střevě. V ováriích se naopak přítomnost genu c90 potvrdit nepodařilo (Obr. 12). Přítomnost transkriptu ve střevě neodpovídá předchozím výsledkům. Tento rozpor bude diskutován v oddílu diskuze.





**Obr. 12: Tkáňová lokalizace** (1 – střevo, 2 – slinné žlázy, 3 – ovaria). U aktinových vzorků trvala PCR 25 cyklů a pro c90 30 cyklů.

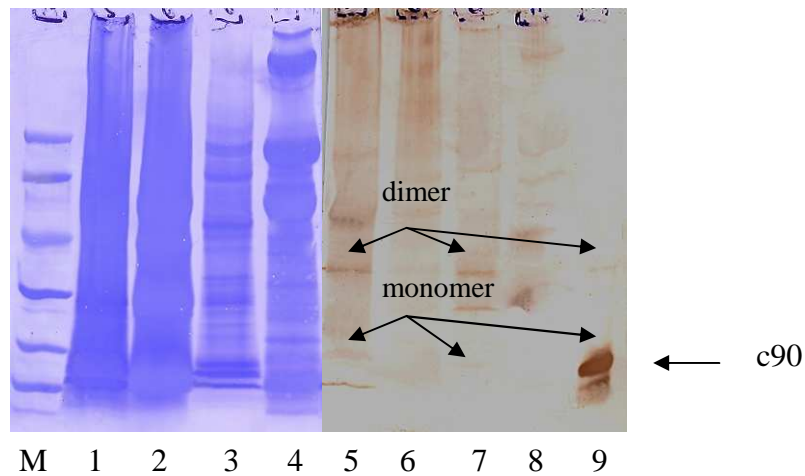
Přítomnost či nepřítomnost proteinu c90 v tkáních pět dní sajících samic byla zjišťována pomocí Western blotu za použití imunního anti-c90 séra. Touto metodou však nebyl protein c90 detekován v žádné z tkání (Obr. 13).



**Obr. 13: Tkáňový profil pro c90 v klíštěti *I. ricinus*:** (M-marker, 1-5: amidoblack, 6-10: Western Blot, 1,6-slinné žlázy, 2,7-střevo, 3,8-ovaria, 4,9-hemolymfa, 5,10-pozitivní kontrola)

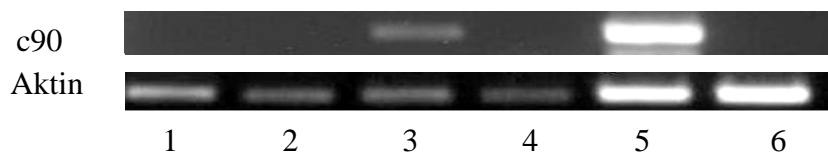
Jelikož se nepodařilo detekovat protein v tkáních pět dní sajících samic, byly na přítomnost c90 testovány tkáně samic sajících 1 den. Na membráně z Western blotu (Obr. 14) jsou patrné proužky o velikosti monomeru ve slinných žlázách a ováriích, ale také proužky odpovídající větší molekulové hmotnosti. Jedná se pravděpodobně o multimery, které byly pozorovány i u rekombinantního proteinu. Ve slinných žlázách (a u pozitivní kontroly) je patrný i proužek o velikosti cca 14 kDa. V hemolymfě sérum detekovalo několik proužků,

kteře se vřak velikostně liří od tēch ze slinných Źláz i ovarii. MoŹnē vysvētlení bude nastínēno v diskuzi.



**Obr. 14: Tkáňový profil c90 v samicích sajících jeden den** (M-marker, 1-4: SDS-PAGE, 5-9: Western blot, 1-slinné Źlázky, 2-střevo, 3-ovaria, 4-hemolymfa, 5-slinné Źlázky, 6-střevo, 7-hemolymfa, 8-pozitivní kontrola)

Dále byla také zjiřována přítomnost c90 transkriptu v různých vývojových stádiích klíšťete *I. ricinus*. Přítomnost mRNA pro c90 se podařilo prokázat pouze ve stádiu nymfy a nenasáté samice (Obr. 15).

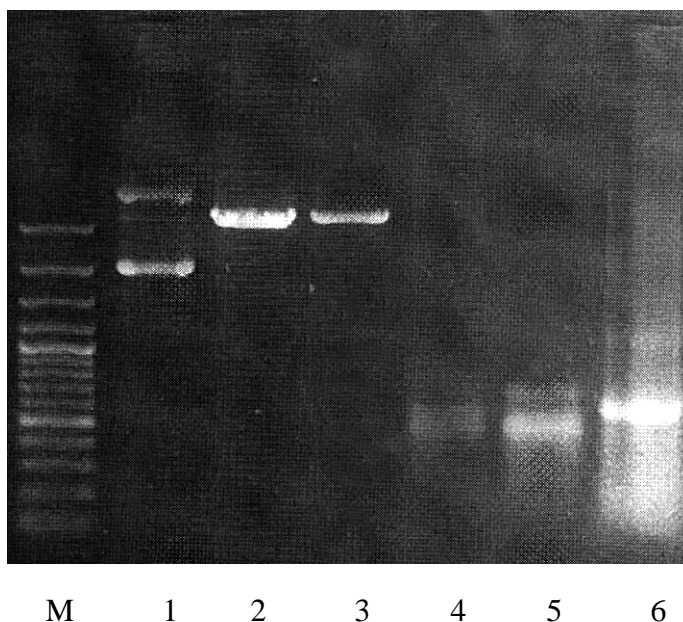


**Obr. 15: Přítomnost genu c90 v různých stádiích vývoje klíšťete *I. ricinus*** (1–vajíčko; 2–larva; 3–nymfa; 4–samec; 5–nenasátá samice; 6–nasátá samice)

## 4.5. RNA interference

### 4.5.1. RNAi protokol

Amplifikovaný PCR produkt byl extrahován z gelu a zaligován do plazmidu p110. Zligovaný plazmid p110 byl zaklonován do Top 10 buněk. Baktérie z vybrané pozitivní kolonie byly přeočkovány do LB média s ampicilinem. Nakonec byl úspěšně vyizolován plazmid. Následovala restrikce purifikovaného plazmidu pomocí fenolchloroformu. V dalším kroku byla nasyntetizována jednovláknové RNA, která byla později purifikována. Finálním krokem byla příprava dvouvláknové RNA hybridizace sense a antisense vlákna ssRNA.



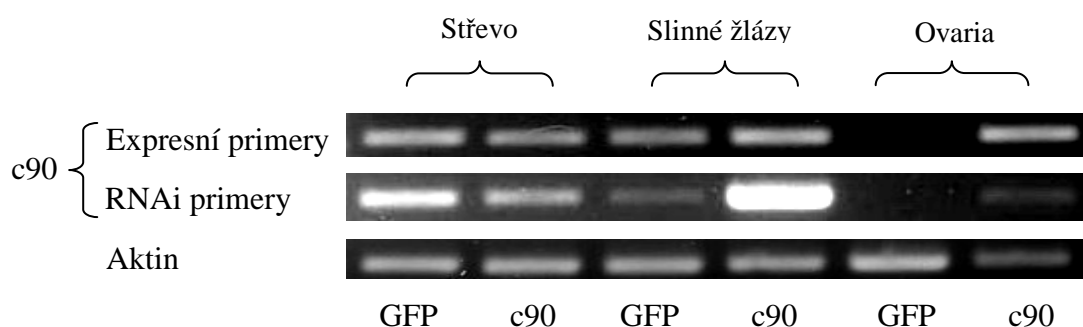
**Obr. 16: Příprava dsRNA a plazmidu** (M-marker, 1-neštipnutý plazmid, 2-plazmid štipnutý ApaI, 3-plazmid štipnutý XbaI, 4-sense ss RNA, 5-antisense ssRNA, 6-dsRNA)

### 4.5.2. Tkáňový profil mRNA pro c90 u klíšťat *Ixodes ricinus* s vypnutým genem c90

Metodou dvoukrokové RT-PCR byla detekována přítomnost mRNA pro c90 v různých tkáních klíštěte *Ixodes ricinus*. Totální RNA byla vyizolována ze slinných žláz, střevní tkáně a z ovárií 25 klíšťat napíchaných dsRNA po pěti dnech sání. Komplementární DNA byla vytvořena pomocí kitu Enhanced avian reverse transcription reaction for two-step RT-PCR (Sigma-Aldrich).

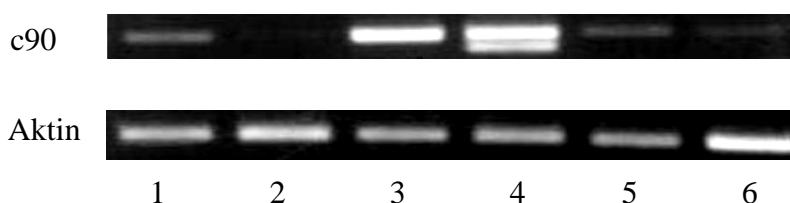
V první reakci byly použity expresní primery (c90pET20-fwd a c90pET20-rev) a primery pro RNAi (c90-RNAi-F a c90-RNAi-R) za účelem srovnání jejich účinku (Obr. 17). S oběma sadami primerů bylo dosaženo podobných výsledků. Pro další reakce byly zvoleny expresní primery, protože primery na RNAi by mohly zachytit i gen c91. Pro kontrolu exprese byly použity gen-specifické primery pro actinový gen, který je exprimován v přibližně stejném množství ve všech tkáních a jeho transkripce není ovlivněna nasátím.

Počet cyklů a naředění mRNA bylo určeno experimentálně, nakonec bylo zvoleno ředění 100 x a počet cyklů 30.



**Obr. 17: Expese genu c90 v klíšťatech *I. ricinus* napíchaných GFP a c90**

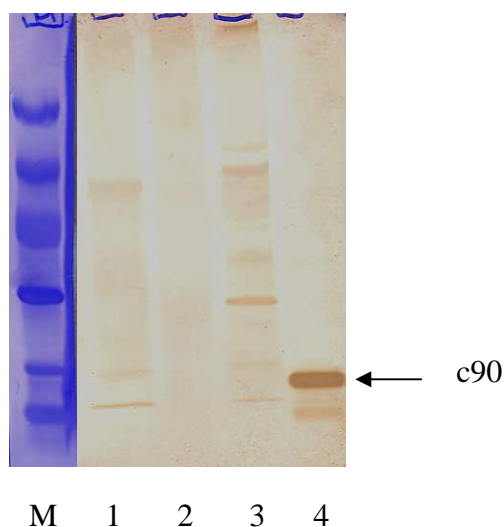
Ve slinných žlázách a ováriích byla místo očekávaného potlačení tvorby, pozorována upregulace genu c90 po pokusu o jeho vypnutí. Vypnutí genu c90 způsobilo jeho overexpresi, a proto bylo v následujících pokusech zkoumáno, jestli není tvorba proteinu c90 reakcí na poranění. Bylo testováno několik cDNA z různých RNAi pokusů na přítomnost mRNA pro c90 (Obr. 18). Všechny cDNA pocházely ze samic pět dní po nasátí.



**Obr. 18: RT-PCR: mRNA ze slinných žláz z klíšťat *I. ricinus* knock-outovanými geny GFP, c90, transferin, IxoA a IxoC (1-nenapíchané samice, 2- GFP knock-down, 3-c90 knock-down, 4-transferin knock-down, 5-IxoA knock-down, 6-IxoC knock-down)**

Pomocí Western blotu byla testována přítomnost c90 proteinu v tkáních klíšťat, u kterých byl proveden pokus o vypnutí genu pro c90. Podobně jako u jednodenních klíšťat je

možné ve slinných žlázách i v ováriích detekovat proužky velikostně odpovídající mono i multimerům c90 stejně jako proužek odpovídající 14 kDa fragmentu (Obr. 19)

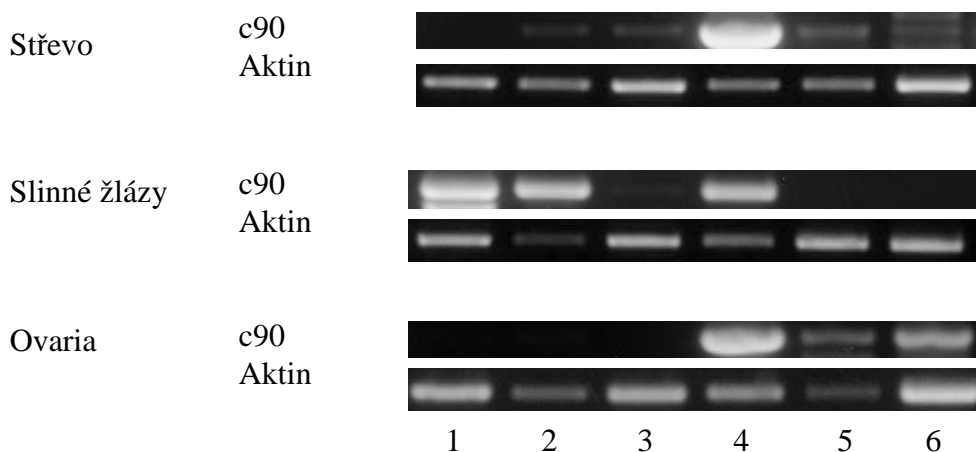


**Obr. 19: Tkáňový profil genu c90 v klíšťatech s vypnutým genem c90** (M-marker, 1-slinné žlázy, 2-střevo, 3-ovaria, 4-pozitivní kontrola)

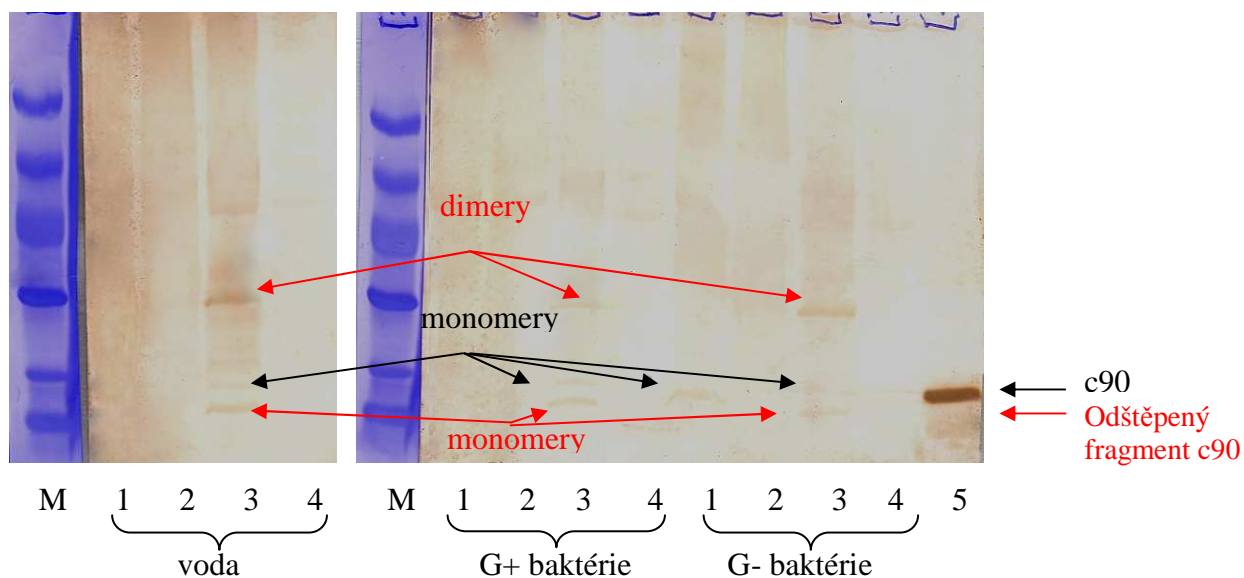
#### 4.5.3. Pokus s napíchním klíšťat vodou, G+ bakteriemi a G- bakteriemi

Aby se zjistilo, jak klíště reaguje na vlastní vpich, byl uskutečněn experiment, pro který bylo použito 60 klíšťat, rozdělených do tří skupin po dvaceti. První skupina klíšťat byla napíchnána 1  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, druhá suspenzí G+ bakterií *Micrococcus luteus* o OD=1 skupiny a poslední skupina G- bakteriemi *Escherichia coli*. Po pěti dnech sání na morčatech byly vypitvány orgány. Vzorky z těchto orgánů byly zpracovány a analyzovány postupy RT-PCR a Western blot.

PCR pro vzorky ze střeva a ovárií z klíšťat napíchných vodou, G+ a G- bakteriemi trvala 40 cyklů, protože bylo zjištěno, že v průběhu 30 cyklů nedošlo k viditelné amplifikaci. K nejvyššímu nárůstu množství transkriptu c90 dochází po napíchním klíšťat vodou, a to ve všech třech testovaných tkáních. V ostatních kategoriích se mezi sebou jednotlivé tkáně výrazně lišily. Zatímco ve střevech a ováriích byl transkript pro c90 detekován po napíchním oběma typy bakterií, ve slinných žlázách nebyla jeho exprese vůbec detekována (Obr. 20).



**Obr. 20: Shrnutí** (1- klíšťata napíchaná GFP, 2- knocked-down (c90), 3- nenapíchaná klíšťata, 4- klíšťata napíchaná vodou, 5- klíšťata napíchaná G+ baktériemi, 6- klíšťata napíchaná G-baktériemi).



**Obr. 21: Přítomnost proteinu c90 ve tkáních** (M-marker, 1-slinné žlázy, 2-střevo, 3-ovaria, 4-hemolymfa, 5-pozitivní kontrola)

Na membráně byly opět viditelné bandy odpovídající velikosti monomeru, dimeru a trimeru c90 v ováriích ve všech třech zkoumaných skupinách a navíc ještě ve slinných žlázách ve skupině samic napíchaných G- bakteriemi (Obr. 21). Na membráně jsou zřetelné i proužky o velikosti multimerů odštěpeného fragmentu c90 o molekulové hmotnosti asi 14 kDa.

## 5. DISKUZE

Zástupci proteinových rodin 18,7 a 19 kDa byly popsány poprvé v klíštěti *Ixodes scapularis* jako jedna ze skupin při katalogizaci sialomu tohoto druhu. (Ribeiro a kol., 2006). Homologní geny kódující tyto proteiny byly nalezeny i v evropském klíštěti *Ixodes ricinus*, u kterého se navíc ukázalo, že exprese těchto genů je silně zvýšená již první den po přísátí. Logicky se tedy zdá, že se jedná o skupinu důležitou pro sání klíštěte. O funkci těchto proteinů se však dalo pouze spekulovat, protože žádné funkční pokusy nebyly provedeny a co je zajímavější, nebyly nalezeny žádné homology u jiných organismů než u klíšťat rodu *Ixodes*. Zdá se tedy, že se jedná o skupinu unikátní právě pro klíšťata. Fylogenetickou analýzou všech dostupných sekvencí bylo zjištěno, že rodina 18,7 kDa se skládá ze tří podskupin, které jsou pravděpodobně přítomné u všech tří druhů. U *Ixodes pacificus* (Francischetti a kol., 2005) to zdánlivě neplatí, jde ale pravděpodobně jen o nedostatek dat. V rámci jednotlivých skupin jsou si příbuznější proteiny z jednoho druhu, z čehož se dá usuzovat, že u předka všech tří druhů existovaly minimálně tři geny, které dále po speciaci podléhaly další evoluci mechanismem genové duplikace a následným hromaděním mutací.

Všichni zástupci sdílejí konzervovanou cysteinovou kostru složenou z 12-ti cysteinů a několik shodných domén, které naznačují podobnou terciární strukturu. Jedna podskupina obsahuje dokonce ještě dva cysteiny navíc.. Právě terciární struktura bývá často pro funkci proteinů důležitější než individuální aminokyselinové složení. Proteiny tedy sdílejí konzervovanou strukturu, která je udržována v evoluci, zatímco ostatní aminokyseliny podléhají poměrně rychlému vývoji.

Právě vysoké množství cysteinů může způsobovat vzájemné propojování jednotlivých molekul mezi sebou. To se děje i u proteinů z rodiny 18,7 kDa. Teorii, že proteiny této skupiny mají sklon tvořit multimery, podporují výsledky dosažené v této práci. Vznik multimerů byl pozorován při purifikaci rekombinantního proteinu. Na SDS-PAGE gelu jsou zřetelně vidět proteiny o vyšší molekulové hmotnosti než c90, z nichž některé jsou s největší pravděpodobností jeho multimery držené pohromadě disulfidickými můstky. To bylo potvrzeno provedením SDS-PAGE ve dvou typech pufrů, v redukujícím a neredukujícím. Redukční podmínky mají za následek přerušení disulfidických vazeb uvnitř proteinu i mezi molekulami, takže výsledkem by mělo být zmizení proužků představujících multimery. Skutečně se ukázalo, že některé z proužků o velikostech odpovídajících multimerům byly v redukujících podmínkách slabší ve srovnání s neredukujícími podmínkami, zatímco

proužky o velikosti monomeru byly výraznější. To je důkazem skutečnosti, že rekombinantní c90 skutečně tvoří in vitro multimery pomocí disulfidických můstků. Obdobně data získaná z Western blotu tkání klíštěte vykazují na membránách přítomnost proužků, které odpovídají velikostí násobkům molekulové hmotnosti 18,7 kDa. Tato data nabízejí závěr, že proteiny skupiny 18,7 kDa tvoří multimery i v podmínkách in vivo, a že se tedy jedná o přirozenou vlastnost těchto proteinů. Z těchto výsledků je možné vyvodit, že zkoumané proteiny jsou schopné se síťovat.

Na Western blotech bylo anti-c90 sérem detekováno větší množství proužků, které velikostí neodpovídají násobkům monomeru c90. U vzorků z Mono Q byl navíc pozorován fragment o velikosti asi 14 kDa, který v předchozích pokusů přítomen nebyl. Tento fragment c90 možná vznikl odštěpením nebo degradací. Podobný fragment byl detekován i v tkáních, je proto možné, že se jedná o přirozený jev. Schopnost tohoto fragmentu spojovat se s ostatními molekulami c90 by mohla vysvětlit přítomnost tak velkého množství různě velkých proteinů detekovaných pomocí Western blotu. Tuto schopnost, tedy tvořit multimery, má i odštěpený fragment c90 o velikosti 14 kDa, protože na membráně jsou zřetelné i proužky odpovídající násobkům čtrnácti. Přímý důkaz by podalo přímé sekvenování peptidu nebo hmotnostní spektrometrie.

Přítomnost genu c90 v klíšťatech z pokusů, které předcházely RNA interferenci, byla prokázána pouze ve slinných žlázách nenasátých, dvoudenních a čtyřdenních samic. Ve střevní tkáni ani v ováriích přítomnost genu c90 potvrzena nebyla. Následující pokus s pětidenními klíšťaty ale gen c90 odhalil i ve střevě. Tento rozpor ve výsledcích by mohl být způsoben faktem, že pro pokusy byly použity různé vyizolované cDNA. V pokusu s různými vývojovými stádii klíštěte byl gen c90 detekován v nymfě a v nenasáté samici. Nepřítomnost genu v nasáté samici je pravděpodobně způsobena tím, že šlo o klíště po pěti dnech sání, kdy už je produkce c90 velmi slabá.

Původním záměrem bylo uskutečnit pokus s vypnutím genu pro c90 pomocí RNAi a sledovat, zda knock-outované sliny ovlivňují imunitu a jestli vypnutí genu ovlivňuje klíště samotné. Tyto pokusy nakonec provedeny nebyly, protože se ukázalo, že vypnutí genu nefungovalo podle očekávání. Namísto předpokládaného snížení tvorby nebo dokonce vypnutí genu c90 došlo k jeho upregulaci. Tento jev byl pozorován během pokusů RT-PCR. Ukázalo se, že transkripce c90 je ovlivněna při procesu vypínání genu, s největší pravděpodobností vpichem. Proto následovaly pokusy s klíšťaty napíchanými vodou, baktériemi a jinými knockouts. Výsledky pokusu s klíšťaty napíchanými vodou, G+ a G- bakteriemi ukázaly, že nejbouřlivější reakce ve všech tkáních způsobil vpich vody. Tato



skutečnost by se možná dala vysvětlit jako odpověď organismu klíštěte na změnu osmotického tlaku v hemolymfě. Výsledky dosažené v jednotlivých tkáních jsou jinak velice různorodé. V ováriích a ve střevě je nápadná podobnost v reakci na vodu a bakterie, ale ve střevě je navíc patrná reakce na knock-outovaný c90. Naopak slinné žlázy reagují kromě vpichu vody i na knock-out GFP a c90. Získaná data vykazují jistou rozporuplnost, která by mohla být důsledkem toho, že byly použity různé izolace cDNA. Výsledky jsou ale reprodukovatelné v rámci jedné dané izolace cDNA, protože pokusy PCR byly opakovány třikrát vždy s totožným výsledkem. Tím je tedy vyloučena metodická chyba. Navíc Western blot přítomnost c90 v tkáních potvrzuje. Na expresi c90 tedy asi bude mít vliv ještě jiný faktor, jaký se ale nepodařilo objevit.

Ze získaných informací a výsledků vyvstávají mnohé otázky, na které by bylo potřeba nalézt uspokojivé odpovědi. Příkladem je nejednotnost výsledků z různých pokusů RT-PCR, proto by bylo v budoucnosti vhodné pro všechny pokusy použít stejné vyizolované cDNA. Klíšťaťata ale také mohou reagovat různě na různé vpichy v důsledku nestejně manipulace. Na práci s živým organismem má vliv řada jiných faktorů, třeba i stav klíštěte. Tato skutečnost by měla být potlačena použitím většího počtu klíšťaťat. Bylo by třeba věnovat se i výsledkům z SDS-PAGE a Western blotu, které ukazují multimery c90, zde by bylo na místě sekvenování peptidu, případně hmotnostní spektrometrie. Zajímavá je i skutečnost, že zatímco sialomová práce (Chmelař a kol., 2008) hovoří o výrazném rozdílu v produkci c90 mezi nenasátými a částečně nasátými samičkami, pokusy RT-PCR uskutečněné v této práci tento markantní nárůst nepotvrdily. Vysvětlením této skutečnosti je pravděpodobně to, že původní předpoklad, že dochází k upregulaci, je založen na informacích z cDNA knihovny, které vypovídají o celé skupině proteinů. Výsledky z RT-PCR jsou konkrétní, a proto relevantní.

## 6. ZÁVĚR

Podářilo se vytvořit rekombinantní protein c90 a polyklonální protilátky proti tomuto proteinu. Byla připravena dvouvláknová RNA pro pokusy s RNA interferencí. Z tkání získaných z klíšťat napíchaných touto dsRNA po pěti dnech sání byly připraveny vzorky pro RT-PCR a Western blot. Dosažené výsledky naznačovaly, že protein c90 se uplatňuje v těle klíštěte v reakci na poranění, a proto byl uskutečněn pokus s klíšťaty napíchanými vodou, G+ bakteriemi a G- bakteriemi.

V průběhu získávání dat pro tuto diplomovou práci bylo zjištěno, že zkoumané proteiny mají schopnost tvořit multimery, a že při RNA interferenci nedochází k vypnutí genu, ale naopak k jeho upregulaci. Ve světle těchto informací společně s bioinformatickou analýzou vyvstává možný závěr, že proteiny o molekulové hmotnosti 18,7 a 19 kDa jsou pravděpodobně důležité ve fyziologii klíštěte. Tyto proteiny mají s největší pravděpodobností strukturní funkci v těle klíštěte a jejich produkce může být reakcí na poranění, v případě RNAi vpichu, spíš než v antiimunitě. Současně ale i skutečnost, že u normálního klíštěte jsou proteiny 18,7 kDa exprimované ve větší míře na začátku sací periody nabízí k úvaze to, že i v hostiteli mají tyto proteiny přece jen svou funkci.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- Alarcon-Chaidez, F. J., Muller-Doblies, U. U., Wikel, S., 2003: Characterization of a recombinant immunomodulatory protein from the salivary glands of *Dermacentor andersoni*, *Parasite Immunol.* 25: 69-77.
- Alarcon-Chaidez, F. J., Sun, J., Wikel, S. K., 2007: Transcriptome analysis of the salivary glands of *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae), *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 37: 48-71.
- Aljamali, M. N., Bior A. D., Sauer J. R., Essenberg R. C., 2003: RNA interference in ticks: a study using histamine binding protein dsRNA in the female tick *Amblyomma americanum*, *Insect. Mol. Biol.* 12: 299–305.
- Allen, J. R., 1973: Tick resistance: Basophils in skin reactions of resistant guinea pigs, *Int. J. Parasitol.* 3: 195-200.
- Anguita, J., Ramamoorthi, 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.
- Arolas, J. L., Lorenzo J, Rovira A, Castellà J, Aviles FX, Sommerhoff CP., 2005: A carboxypeptidase inhibitor from the tick *Rhipicephalus bursa*: isolation, cDNA cloning, recombinant expression, and characterization, *J. Biol. Chem.* 280: 3441-3448.
- 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, *Arch. Biochem. Biophys.* 417: 176-182.
- 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, *Immunol. rev.* 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, *J. Parasitol.* 86: 516-525.
- Bergman, D. K., Ramachandra, R. N., Wikel, S. K., 1998: Characterization of an immunosuppressant protein from *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary glands, *J. Med. Entomol.* 35: 505-509.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., Hannon, G. J., 2001: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference, *Nature* 409: 363-366.
- Bowman, A. S., Coons, L. B., Needham, G. R., Sauer J. R., 1997: Tick saliva: Recent advances and implications for vector competence, *Med. Vet. Entmol.* 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.

- Cochrane, D. G., Elder, H. Y., 1967: Morphological changes in insect muscle during influx and efflux of potassium ions, chloride ions and water, *J. Physiol.* 191: 30-31.
- Cook, J. C., Schultz, L. D., Huang, J., George, H. A., Herber, W. K., Joyce, J. G., Mao, S. S., Markus, H. Z., Miller, W. J., Sardana, M. K., Lehman, E. D., 1998: Expression and purification of recombinant tick anticoagulant peptide (Y1W/D10R) double mutant secreted by *Saccharomyces cerevisiae*, *Protein. Expr. Purif.* 13: 291-300.
- Daniel, M., Danielová, V., Kříž, B., Kott, I., 2004: An attempt to elucidate the increased incidence of tick-borne encephalitis and its spread to higher altitudes in the Czech Republic, *Int. Med. Microbiol.*, 293 Suppl37: 55-62.
- Das, S., Banerjee, G., Deponte, K., Marcantonio, N., Kantor, F. S., Fikrig, E., 2001: Salp25D, an *Ixodes scapularis* antioxidant, is 1 of 14 immunodominant antigens in engorged tick salivary glands *J. Infect. Dis.* 184: 1056-1064.
- Das, S., Marcantonio, N., Deponte, K., Telford, S. R. 3rd, Anderson, J. F., Kantor, F. S., Fikrig, E., 2000: Slap16, a gene induced in *Ixodes scapularis* salivary glands during tick feeding, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62: 99-105.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001: RNA interference is mediated by 21- and 22- nucleotide RNAs, *Genes. Dev.* 15: 188-200.
- Ferreira, B. R., Szabo, M. J., Cavassani, K. A., Bechara, G. H., Silva, J. S., 2003: Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* tick elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals, *Vet. Parasitol.* 115: 35-48.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S., Driver, S., Mello, C., 1998: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* 391: 806-811.
- 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. off, *Vaccine* 16: 1990-1992.
- Francischetti, I. M., Mather, T. N., Ribeiro, J. M., 2003: Cloning of a salivary metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305: 869-875.
- Francischetti, I. M., Mather, T. N., Ribeiro, J. M., 2004: Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*, *Thromb. Haemostasis.* 91: 886-898.
- Francischetti, I. M.; Valenzuela, J. G.; Andersen, J. F.; Mather, T. N.; Ribeiro, J. M. C., 2002: Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and Xa as scaffold for the inhibition of factor VIIa(tissue factor complex), *Blood* 99: 3602-3612.

- Fransichetti, I. M., My Pham, V., Mans B. J., Andersen, J. F., Mather, T. N., Lane, R. S., Ribeiro J. M., 2005: The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari:Ixodidae), *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 35: 1142-1161.
- Ganapamo, F., Rutti, B., Brossard, M., 1995: In vitro production of interleukin-4 and interferon-gamma by lymph node cells from BALB/c mice infested with nymphal *Ixodes ricinus* ticks. *Immunology* 85: 120-124.
- Ganapamo, F., Rutti, B., Brossard, M., 1996: Cytokine production by lymph node cells from mice infested with *Ixodes ricinus* ticks and the effect of tick salivary gland extracts on IL-2 production, *Scand. J. Immunol.* 44: 388-393.
- 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. *Exp. Appl. Acarol.* 23: 717-29.
- Hannier, S., Liversidge, J., Sternberg, J. M., Bowman, A. S., 2003: *Ixodes ricinus* tick salivary gland extract inhibits IL-10 secretion and CD69 expression by mitogen-stimulated murine splenocytes and induces hyporesponsiveness in B lymphocytes, *Parasite Immunol.* 25: 27-37.
- Hill, C. A., Gutierrez, J. A., 2000: Analysis of the expressed genome of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) using an expressed sequence tag approach, *Microb. Comp. Genomics.* 5: 89-101.
- Champagne, D. E., 1994: The role of salivary vasodilators in bloodfeeding and parasite transmission, *Parasitol. Today* 10: 430-433.
- Chmelař, 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.
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., Linsley, P. S., 2003: Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol.* 21: 635-637.
- Jones, L. D., Hodgons, E., Williams, T., Higgs, S., Nuttal, P. A., 1992: Saliva activated transmission (SAT) of Togotho virus: relationship with vector potential of different haematophagous arthropods, *Med. Vet. Entomol.* 6: 261-265.
- Julius, D., Basbaum, A. I., 2001: Molecular mechanisms of nociception, *Nature.* 413: 203-210.
- Karczewski, J., Waxman, L., Endris, R. G., Connolly, T. M., 1995: An inhibitor from the argasid tick *Ornithodoros moubata* of cell adhesion to collagen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208: 532-541.

- 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*, *Thromb. Haemost.* 93: 359-367.
- Kaufman W. R., 1989: Tick-host interaction: a synthesis of current concepts, *Parasitol. Today* 5: 47-56.
- Kopecký, J., Kuthejlová, M., 1998: Suppressive effect of *Ixodes ricinus* salivary gland extract on mechanism of natural immunity in vitro, *Parasite Immunol.* 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 Immunol.* 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, *J. Immunol.* 181: 5209-5212.
- Kovář, L., 2004: Tick saliva in anti-tick immunity and pathogen transmission, *Folia Microbiol.* 49: 327-336.
- Kovář, L., Kopecký, J., Říhová, B., 2001: Salivary gland extract from *Ixodes ricinus* tick polarizes the cytokine profile toward Th2 and suppressed proliferation of T lymphocytes in human PBMC culture, *J. Parasitol.* 87: 1342-1348.
- Kubeš, M., Fuchsberger, N., Labuda, M., Žuffová, E., Nuttall, P. A., 1994: Salivary gland extract of partially fed *Dermacentor reticularis* ticks decrease natural killer cell activity in vitro, *Immunology* 82: 113-116.
- Kýčková, K., Kopecký, J., 2006: Effect of tick saliva on mechanism of innate immune response against *Borrelia afzelii*, *J. Med. Entomol.* 43: 1208-1214.
- Labuda, M., Jones, L. D., Williams, T., Nuttall, P. A., 1993: Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts, *Med. Vet. Entomol.* 7: 193-196.
- Lai, R., Takeuchi, H., Lomas, L. O., Jonczyk, J., Rigden, D. J., Rees, H. H., Turner, P. C., 2004: A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*, *FASEB J.* 18: 1447-1449.
- Law, J. H., Ribeiro, J. M. C., Wells, M. A., 1992: Biochemical insights derived from insect diversity, *Annu. Rev. Biochem.* 64: 87-111.
- Lawrie, C. H., Randolph, S. E., Nuttall, P. A., 1999: *Ixodes* ticks: Serum species sensitivity of anticomplement activity, *Exp. Parasitol.* 93: 207-214.
- Lawrie, C. H., Sim, R. B., Nuttall, P. A., 2005: Investigation of the mechanism of anti-complement activity in *Ixodes ricinus* ticks, *Mol. Immunol.* 42: 31-38.

- Lebouille, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., Godfroid, E., 2002: Characterization of novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks, *J. Biol. Chem.* 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, *J. Biol. Chem.* 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 Parasitol.* 23: 397-407.
- Mejri, N., Franscini, N., Rutti, B., Brossard, M., 2001: Th2 polarization of the immune response of BALB/c mice to *Ixodes ricinus* instars, importance of several antigens in activation of specific Th2 subpopulations, *Parasite Immunol.* 23: 61-69.
- Mosmann, T. R., Coffman, R. L., 1989: Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells, *Adv. Immunol.* 46: 111-147.
- Mulenga, A., Sugimoto, C., Ingram, G., Ohashi, K., Misao, O., 2001: Characterization of two cDNA encoding serine protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31: 817-825.
- Mulenga, A., Sugimoto, C., Onuma, M., 2000: Issues in tick vaccine development: Identification and characterization of potential candidate vaccine antigens, *Microbes and Infect.* 2: 1353-1361.
- Munderloch, U. G., Kurtti, T. J., 1995: Cellular and molecular interrelationship between ticks and prokaryotic tick-borne pathogens, *Annu.Rev.Entomol.* 40: 221-243.
- Narasimhan, S., Koski, R. A., Beaulieu, B., Anderson, J. F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., Capello, M., Fikrig, E., 2002: A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*, *Insect. Mol. Biol.* 11: 641-650.
- Nene, V., Lee, D., Kang´a, S., Skilton, R., Shah, T., de Villiers, E., Mwaura, S., Taylor, D., Quackenbush, J., Bishop, R., 2004: Genes transcribed in the salivary glands of female *Rhipicephalus appendiculatus* ticks infected with *Theileria parva*, *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 34, 1117-1128.
- 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*, *Int. J. Parasitol.* 32: 1447-1456.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K., Ullu, E., 1998: Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 14687-14692.
- 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), *Exp. Parasitol.* 93: 82-91.

- Nishikura, K., 2001: A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst, *Cell*. 107: 415-418.
- Nuttall, P. A., 1998: Displaced tick-parasite interactions at the host interface, *Parasitology* 116: 65-72.
- Nuttall, P. A., Paesen, G. C., Lawrie, C. H., Wang, H., 2000: Vector-host interactions in disease transmission, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2: 381-386.
- Olsén, B., Jaenson, T. G. T., Bergstrom, S., 1995: Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato – infected ticks on migrating birds, *Appl. Environ. Microbiol.* 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, *Mol. Cell* 3: 661-671.
- Pechová, J., Štěpánová, G., Kovář, L., Kopecký, J., 2002: Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes, *Folia Parasitol.* 49: 153-159.
- Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pai, U., Bao, F., Yang, X. F., Fish, D., Anguita, J., Norgard, M. V., Kantor, F. S., Anderson, J. F., Koski, R. A., Fikrig, F., 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, *Exp. Parasitol.* 64: 347-353.
- Ribeiro, J. M. C., Weis, J. J., Telford, S. R. 3rd, 1990: Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function, *Exp. Parasitol.* 70: 382-388.
- Ribeiro, J. M., 1995: Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologist, *Infect. Agents. Dis.* 4: 143-152.
- Ribeiro, J. M., Alarcon-Chaidez, F., Francischetti, I. M., Mans, B. J., Mather, T. N., Valenzuela, J. G., Wikel, S. K., 2006: An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks, *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 36: 111-129.
- Ribeiro, J. M., Makoul, G. T., Levine, J., Robinson, D. R., Spielman, A., 1985: Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*, *J. Exp. Med.* 161: 332-344.
- Ribeiro, J. M.; Mather, T. N., 1998: *Ixodes scapularis*: salivary kininase activity is a metallo dipeptidyl carboxypeptidase, *Exp. Parasitol.* 89: 213-221.
- Sa-Nunes, A., Bafica, A., Lucas, D. A., Conrads, T. P., Veenstra, T. D., Andersen, J. F., Ribeiro, J. M., Francischetti, I. M., 2007: Prostaglandin E<sub>2</sub> is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva, *J. Immunol.* 179: 1497-1505.



- Sauer, J. R., Essenberg, R. C., Bowman A. S., 2000: Salivary gland in ixodid tick: Control and mechanism of secretion, *J. Insect. Physiol.* 46: 1069 – 1078.
- Seder, R. A., Paul, W. E., 1994: Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells, *Annu. Rev. Immunol.* 12: 635-673.
- Schoeler, G. B., Wikel, S. K., 2001: Modulation of host immunity by haematophagous arthropods, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 95: 755-771.
- Singh, S. K., Girschick, H. J., 2003: Tick-host interactions and their immunological implications in tick-borne diseases, *Curr. Sci.* 85: 1284-1298.
- Sonenshine, D. E., 1991: *Biology of ticks*, vol. 1, Oxford university Press, New York.
- St Charles, R., Padmanabhan, K., Arni, R. V., Padmanabhan, K. P., Tulinsky, A., 2000: Structure of tick anticoagulant peptide at 1.6 Å resolution complexed with bovine pancreatic trypsin inhibitor, *Protein Sci.* 2: 265-272.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., Mello, C. C., 1999: The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*, *Cell.* 99: 123-132.
- 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.
- 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 Immunol.* 28: 131-141.
- Titus, R. G., Ribeiro, J. M. C., 1988: Salivary gland lysates from the sandfly *Lutzomya longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity, *Science* 239: 1306-1308.
- Tuschl, T., 2001: RNA interference and small interfering RNAs, *ChemBiochem.* 4: 239-245.
- 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, *J. Exp. Med.* 180: 1077-1085.
- 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*, *J. Exp. Biol.* 205: 2843-2864.
- Valenzuela, J. G., Charlab, R., Mather, T. N., Ribeiro, J. M., 2000: Purification, cloning and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*, *J. Biol. Chem.* 275: 18717-18723.
- 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.

- Waxman, L., Connolly, T. M., 1993: Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubat*, J. Biol. Chem. 268: 5445-5449.
- Wikel, S. K., 1982: Influence of *Dermacentor andersoni* infestation on lymphocyte responsiveness to mitogens, Ann. Trop. Med. Parasitol. 76: 627-632.
- Wikel, S. K., 1996: Host immunity to ticks, Annu. Rev. Entomol. 41: 1-22.
- Wikel, S. K., 1999: Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission, Int. J. Parasitol. 29: 851-859.
- Wikel, S. K., Osburn, R. L., 1982: Immune responsiveness of the bovine host to repeated low-level infestation with *Dermacentor andersoni*, Ann. Trop. Med. Parasitol. 76: 405-414.
- Wikel, S. K., Ramachandra, R. M., Bergman, D. K., 1994: Tick-induced modulation of the host immune response, Int. J. Parasitol. 24: 59-66.
- Willadsen, P., Bird, P., Cobon, G. S., Hungerford, J., 1995: Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*, Parasitology 110: 43-50.
- Zamore, P. D., 2001: RNA interference: listening to the sound of silence, Nat. Struct. Biol. 8: 746-750.