

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity
v Českých Budějovicích



**Peptidázy v trávicích buňkách střeva klíštěte
Ixodes ricinus – lokalizace a funkce**

Magisterská diplomová práce

Bc. Helena Pěničková

Vedoucí práce: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

2009

Magisterská diplomová práce

Pěničková, H., 2009: Peptidázy v trávicích buňkách střeva klíštěte *Ixodes ricinus* – lokalizace a funkce [Peptidases in digestive cells in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus* – localization and function, Mgr. Thesis, in Czech] – 40p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Light microscopy was used to characterize digestive cells in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus* during feeding and different phases of digestion.

Indirect immunofluorescent microscopy was used to localize three digestive peptidases - cathepsin B, cathepsin L and cathepsin D in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*.

Tato práce byla vypracována s podporou grantu GAČR 206/06/0865 (řešitel P. Kopáček) a Výzkumného centra LC 06009.

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

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

Děkuji svému školiteli RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a čas, který mi při této práci věnoval a také za umožnění odborné stáže v zahraničí, kde jsem nabyla nových zkušeností a chuti stále bádát. Mé díky patří také celé naší laboratoři za ochotu vždy poradit a pomoci a za vytvoření prostředí, ve kterém je radost pracovat. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině a Zdenymu za podporu nejen při mých vysokoškolských studiích.

Obsah

1. Úvod	5
1.1 Klíště <i>Ixodes ricinus</i>	5
1.2 Trávení krve u klíšťat, cysteinové a aspartátové peptidázy.....	6
1.3 Střevo klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	9
2. Cíle práce	12
3. Materiál a metody	13
3.1 Chov <i>Ixodes ricinus</i>	13
3.2 Histochemie – LR White.....	13
3.3 Histochemie – Epon.....	14
3.4 Příprava imunních sér pro imunocytochemii.....	14
3.4.1 Izolace Ig frakce protilátek.....	14
3.4.2 Purifikace protilátek pomocí afinitní chromatografie.....	15
3.5 Imunocytochemie na poloténkách řezech.....	16
3.6 Imunocytochemie na totálních preparátech.....	17
4. Výsledky a diskuze	18
4.1 Studium funkční morfologie trávicích buněk ze střeva klíštěte <i>Ixodes ricinus</i> světelnou mikroskopií.....	18
4.1.1 Artefakty – histochemie LR White.....	22
4.2 Lokalizace trávicích peptidáz katepsinu B, L, D ve střevě klíštěte <i>I. ricinus</i>	24
4.2.1 Purifikace protilátek - porovnání lokalizace trávicích peptidáz před a po čištění primárních protilátek.....	24
4.2.2 Imunolokalizace katepsinu B ve střevě klíštěte <i>I. ricinus</i> v průběhu sání.....	26
4.2.3 Lokalizace katepsinu B v totálních preparátech.....	29
4.2.4 Imunolokalizace katepsinu L ve střevě klíštěte <i>I. ricinus</i> v průběhu sání.....	30
4.2.5 Imunolokalizace katepsinu D ve střevě klíštěte <i>I. ricinus</i> v průběhu sání.....	33
5. Závěr	36
6. Seznam použité literatury	37

Seznam použitých zkratek

BSA (Sigma – Aldrich)	bovinní sérový albumin
DABCO (Sigma – Aldrich)	3.3'-diaminobenzidin
DAPI (Sigma – Aldrich)	1.4 -diamino-2-fenylindol
PBS	fyzilogický fosfátový pufr (8g NaCl, 0.2g KH ₂ PO ₄ , 2.9g Na ₂ HPO ₄ , 0.2g KCl do 11 dH ₂ O)
PBS – T	fyzilogický fosfátový pufr s Tween [®] 20; 0.3% (Sigma – Aldrich)
PBS – Tr	fyzilogický fosfátový pufr s Triton [®] X-100; 0.3% (Fluka AG)
RT	laboratorní teplota
EPON	epoxidová pryskyřice, složení: Poly/Bed [®] 812 (Polyscience, Inc.) 51.13g DDSA – Dodecenylsuccinic Anhydride (Polyscience, Inc.) 27.02g DMP 30 – Epoxy accelerator (SPI-CHEM) 2ml NMA – Nadic Methyl Anhydride (Polyscience, Inc.) 21.84g
NGS	kozí sérum
IrCB	katepsin B
IrCL	katepsin L
IrCD	katepsin D

1. Úvod

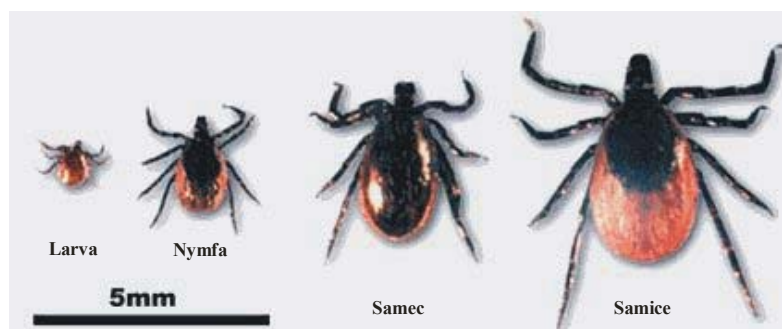
Klíšťata jsou vysoce specializovaní krevsající ektoparazité. Dle internetové databáze Integrovaného konsorcia pro klíšťata a klíšťaty přenášené nemoci - ICTTD (<http://www.icctd.nl/>) je v současné době na světě popsáno 889 druhů klíšťat ve třech čeledích. Z uvedených informací vyplývá, že přibližně 80% světové populace klíšťat řadíme do čeledi *Ixodidae*. Tato čeleď je zastoupena 702 druhy. Čeleď *Argasidae* čítá 186 druhů klíšťat a čeleď *Nuttalliellidae* druh pouze jeden. Navzdory relativně malému počtu druhů, mají klíšťata mimořádný lékařský a veterinární význam. Přenášejí velké množství patogenů způsobujících závažná onemocnění člověka i zvířat (Jongejan a Uilenberg, 2004).

Klíšťata čeledi *Ixodidae* prochází čtyřmi vývojovými stádii: vajíčko, larva, nymfa, dospělec. Podle počtu hostitelů, které během svého životního cyklu vystřídají, rozlišujeme tato klíšťata na jedno-, dvou- či troj-hostitelská (Jongejan a Uilenberg, 2004).

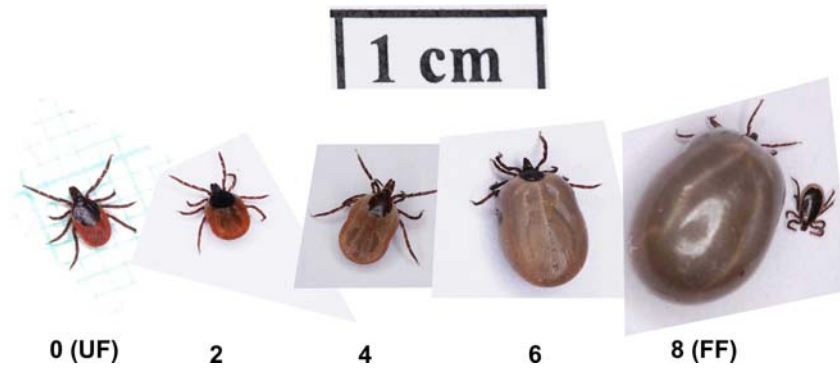
1.1 Klíště *Ixodes ricinus*

Klíště *I. ricinus* je rozšířeno v Evropě a Asii a vyskytuje se převážně na otevřených prostranstvích, vlhčích loukách a lesích. Je typickým trojhostitelským druhem. K metamorfózám mezi vývojovými stádii (**Obr.č.1A**) dochází mimo hostitele a každé další stádium musí vyhledat hostitele nového. Oploďná samice se plně nasaje hostitelskou krví (**Obr.č.1B**), kterou nutně potřebuje pro následnou tvorbu a vývoj vajíček. Po naklazení vajíček samice umírá. Střídání různých hostitelů dělá z tohoto klíštěte významného vektora velkého počtu nemocí (Jongejan a Uilenberg, 2004). Mezi nejzávažnější patogeny tímto klíštětem přenášené patří spirochéta *Borrelia burgdorferi* sensu lato, způsobující lymeskou boreliózu, a virus klíšťové encefalitidy (Nuttall, 1999).

A



B



Obr.č.1: Klíště *Ixodes ricinus*. A, všechna vývojová stádia. B, dospělá samice v různém stupni sání (nenasátá, dva, čtyři, šest dní po začátku sání a plně nasátá), snímky © Jan Erhart, Parazitologický ústav, Biologické centrum AV ČR.

1.2 Trávení krve u klíšťat, cysteinové a aspartátové peptidázy

Trávení hostitelské krve je velice důležitým procesem v biologii klíšťat. Získání živin z krve je následováno metamorfózou mladších vývojových stádií či tvorbou vajíček u oplodněných samic (Grandjean, 1984). Trávení krve probíhá, na rozdíl od většiny ostatních živočichů, intracelulárně - uvnitř buněk střevního epitelu (Sonenshine, 1991) a při hodnotách pH daleko nižších než je pH 6,3-6,5 střevního obsahu (Grandjean, 1984). Trávení hemoglobinu, hlavní proteinové složky krve, se účastní množství proteáz, které jsou obsaženy v trávicích vakuolách střevních buněk. Navzdory tomu, jak moc důležitým pochodem trávení hemoglobinu u klíšťat je, naše současné znalosti molekul podílejících se na trávení krve u klíšťat jsou minimální ve srovnání se znalostmi těchto pochodů u jiných krevsajících parazitů. Předchozí studie se zaměřily na enzymy u jednotlivých druhů klíšťat a identifikovaly cysteinové nebo aspartátové peptidázy. Cysteinová peptidáza typu katepsinu L byla popsána u klíštěte *Boophilus microplus* (Renard a kol., 2000, 2002), dvě formy katepsinu L u klíštěte *Haemaphysalis longicornis* (Mulenga a kol., 1999) a aspartátová peptidáza - tzv. longepsin (katepsin D) u *H. longicornis* (Boldbaatar a kol., 2006). Asparaginylová endopeptidáza, legumain (IrAE), patřící do rodiny cysteinových peptidáz byla charakterizována u klíštěte *I. ricinus* (Sojka a kol., 2007) či *H. longicornis* (Alim a kol., 2007).

Identifikace jednotlivých proteáz u různých druhů klíšťat vedla k vytvoření hypotézy, že trávicí systém je podobný kaskádě cysteinových a aspartátových proteáz, které byly identifikovány například u krevsající motolice *Schistosoma mansoni* (Caffrey a kol., 2004) nebo krevního parazita *Plasmodium falciparum* (Goldberg a kol., 2005).

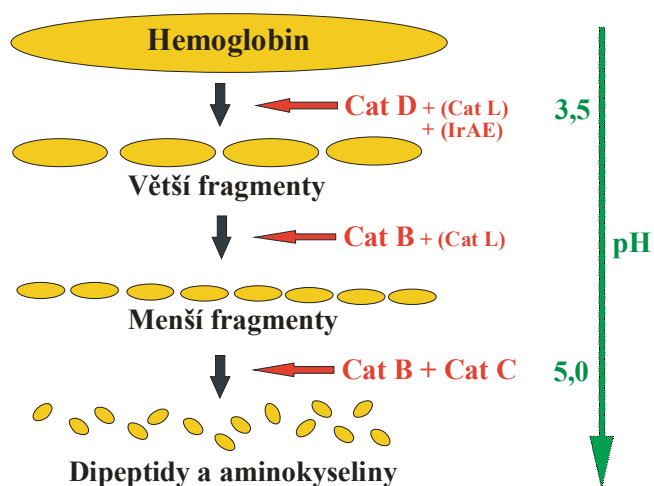
V naší laboratoři jsme se zaměřili na komplexní studii trávení hostitelské krve u klíštěte *I. ricinus*. Ze střevní cDNA byly identifikovány následující cysteinové peptidázy – katepsin B1, B2, L, C, asparaginylová endopeptidáza - IrAE, a aspartátová peptidáza – katepsin D (**Tab.č.1**). Ze získaných dat byla v roce 2008 publikována analýza zabývající se proteolytickými enzymy vyskytujícími se ve střevě klíštěte *I. ricinus* (Sojka a kol., 2008). Tato studie skutečně potvrdila existenci evolučně zachovalého systému aspartátových a cysteinových peptidáz účastnících se trávení ve střevě *I. ricinus*.

Tab.č.1: Přehled trávicích proteáz klíštěte *I. ricinus*

Cysteinové peptidázy	Přístupové číslo- Genebank	Hodnota pH – funkční aktivita peptidázy	cDNA sekvence [bp]
Catepsin L	EF428205	4-6	1151
Catepsin B	EF428206	4-6	1073
Catepsin C	EU128750	4-6	1597
IrAE	AY584752	4-6	1461
Aspartátová peptidáza			
Catepsin D	EF428204	3-4	1304

V navazující studii byla pomocí specifických substrátů a inhibitorů odhalena funkce výše zmíněných trávicích peptidáz při degradaci hemoglobinu (Horn a kol., 2009). Z uvedených výsledků vyplývá, že aspartátová peptidáza katepsin D podporovaná cysteinovou peptidázou katepsinem L a legumainem (IrAE) je zodpovědná za primární štěpení hemoglobinu. Následné štěpení a produkce menších fragmentů je zajištěna endopeptidázovou aktivitou katepsinu B. Rozštěpení vzniklých fragmentů na dipeptidy či jednotlivé aminokyseliny je způsobeno carboxy-dipeptidázovou aktivitou katepsinu B a amino-dipeptidázovou aktivitou katepsinu C (**obr.č.2**). Tyto dvě naposledy zmiňované peptidázy jsou ve střevní tkáni zastoupeny v daleko větším množství než peptidázy účastnící se první fáze degradace hemoglobinu (Horn a kol., 2009).

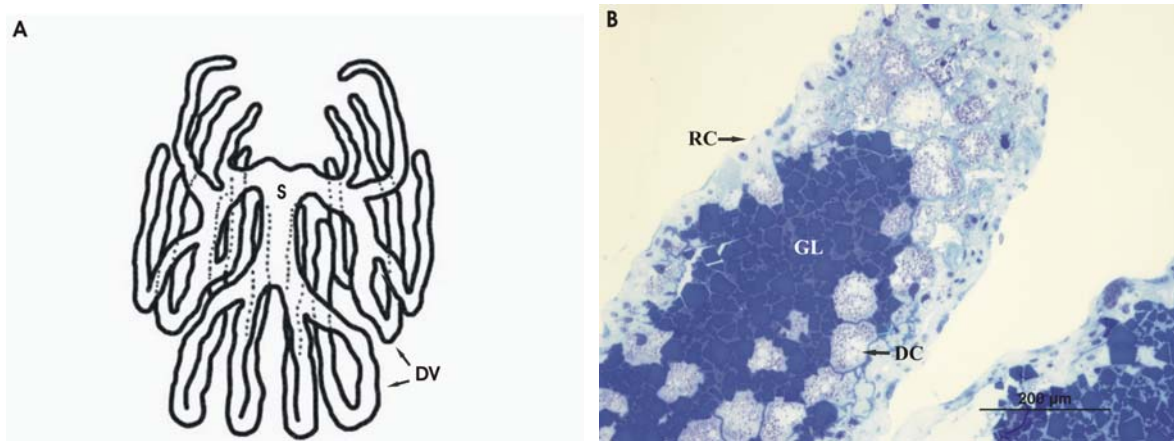
Degradace hemoglobinu proteázami obsaženými v extraktu ze střevní tkáně klíštěte probíhala optimálně při kyselém pH 3.5-4.5, a nebyla pozorována při pH vyšším než 5.5.



Obr.č.2: Schematické znázornění degradace hemoglobinu v trávicích vakuolách trávicích buněk *I. ricinus* za účasti trávicích peptidáz (upraveno podle Horn a kol., 2009).

1.3 Střevo klíštěte *Ixodes ricinus*

Střevo „midgut“ se skládá z krátké centrální části zvané žaludek „stomach“ a sedmi párů tubulárních slepých výběžků „diverticulae“ (**Obr.č.3**).



Obr.č.3: Struktura „midgut“ u čeledi *Ixodidae*. Panel A, schematické znázornění (dle Balashov, 1972); S – žaludek, DV – slepé výběžky. Panel B, polotenký řez divertikulem barvený toluidinovou modří; RC – zásobní buňky, DC – trávicí buňky, GL – střevní lumen.

Ačkoli je střevo značně morfologicky různorodé, všechny jeho části jsou histologicky identické. Stěna střeva je tvořena vrstvou epiteliálních buněk nasedajících na tenkou bazální laminu. Vně bazální laminy se nachází síť svalů. Funkce střevních epiteliálních buněk během trávení a jejich ultrastruktura je neustálým předmětem diskuze. Nepochybná je přítomnost rezervních buněk, ze kterých vznikají buňky se specializovanou funkcí. Některé studie získané pomocí světelné a elektronové mikroskopie tvrdí, že z rezervních buněk vznikají buňky sekreторické „secretory“ a trávicí „digestive“ (Raikhel, 1983). Výsledky novějších studií naznačují, že buňka diferencovaná z rezervní buňky je schopná plnit funkci sekreторickou i trávicí (Sonenshine, 1991, Agyei, 1992). Během hladovění (u nenasátých klíšťat) jsou ve střevě přítomny pouze rezervní buňky a dále trávicí buňky zachované z předchozího vývojového stádia (Raikhel, 1983).

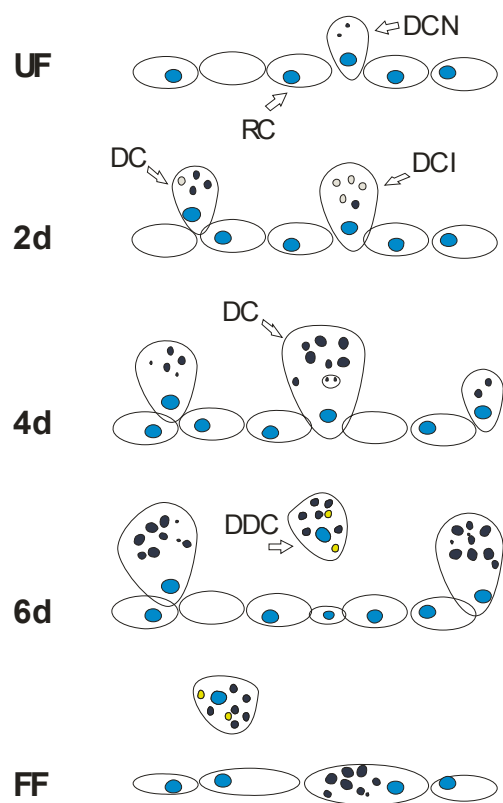
Příjem hostitelské krve probíhá ve dvou fázích. V první fázi „slow feeding“ klíště přijímá relativně malé množství hostitelovy krve a akumuluje ji. Dochází k tzv. první kontinuální fázi trávení. Na začátku této fáze se začínají objevovat buňky, ze kterých jsou exocytózou uvolňovány sekreторická granula obsahující glykoproteinový materiál s enzymy, způsobujícími hemolýzu erytrocytů (Miyoshi a kol., 2007). Dále se objevují trávicí buňky, ve kterých je zahájen proces intracelulárního trávení. Probíhá zde receptory zprostředkovaná endocytóza a fagocytóza složek hostitelské krve - hemoglobinu, leukocytů, jejich částí, granul

či dalších fragmentů hostitelské tkáně ve formě váčků - „coated pits“. Vznikající trávicí vakuoly (endozomy) postupně plní cytoplazmu zvětšujících se trávicích buněk. Endozomy fúzí s lysozomy (tam se nacházejí lysozomální enzymy) a vznikají tzv. sekundární lysozomy, ve kterých dochází k vlastnímu trávení. Zpracování hemoglobinu bylo popsáno v těle klíštěte *Boophilus microplus* (Lara a kol., 2003; Lara a kol., 2005). Většina hemu produkovaného degradací hemoglobinu je ve formě agregátů akumulována v residuálních tělískách (hemozomech), která vznikají ze sekundárních lysozomů. Residuální tělíska jsou hlavním místem ukládání hemu a jsou tedy považována za hlavní detoxikační mechanismus klíštěte (Lara a kol., 2003). Vyčerpané trávicí buňky obsahující residuální tělíska a inkluze lipidů se oddělují od střevního epitelia, dostávají se do lumen střeva, kde se stanou součástí defekovaného materiálu (Coons a Alberti, 1999).

Pokud je samice během první fáze oplodněna, začíná druhá fáze příjmu hostitelské krve, která je nazývána „rapid engorgement“. Během této krátké fáze (12-36h) dochází k natažení střevní stěny a příjmu velkého množství krve. Samička zvětší svoji váhu až stokrát. Střevo v tomto případě slouží jako zásobárna krve a intracelulární trávení je v této fázi zpomalené (Coons a Alberti, 1999). Trávicí buňky přijímají složky krve, převážně hemoglobin, a ukládají je do velkého počtu endozomů, které plní apikální část těchto buněk (Sonenshine, 1991). Schematické znázornění tvorby trávicích buněk během sání klíštěte na hostiteli je znázorněno na **obr.č.4**.

Druhá kontinuální fáze trávení nastává po puštění plně nasátých larev, nymf nebo oplodněných samic z hostitelského zvířete. Nedospělá stádia se připravují na metamorfózu v následující stádium a oplodněné samice na tvorbu a kladení tisíců vajíček (Sonenshine, 1991). Opět je obnoveno lysozomální trávení hemoglobinu uvnitř endozomů. Většina velkých endozomů je lyzována, vytvářejí se sekundární lysozomy a dochází k akumulování residuálních tělísek. Likvidace odpadního materiálu je v této fázi zajištěna více exocytózou než oddělením celých buněk od epithelia (Sonenshine, 1991).

V roce 1991 byla u *I. ricinus* popsána přítomnost peritrofické membrány (Zhu a kol.). Peritrofická membrána se nachází mezi epiteliálními buňkami střeva a střevním lumen, minimalizuje poškození epiteliálních buněk a zároveň snižuje možnost napadení klíštěte patogenními organismy. Formování této membrány bylo již dříve popsáno u *Ixodes dammini* (Rudzinska a kol., 1982) a u *Ornithodoros moubata* (Grandjean, 1984).



Obr. č.4: Schematické znázornění tvorby trávicích buněk ve střevě samičky klíštěte *Ixodes ricinus*.
UF, střevo nenasátého klíštěte; **RC** – rezervní buňky, **DCN** – trávicí buňky z předchozího (nymfálního) stádia.
2d, střevo klíštěte 2 dny po zahájení sání; **DC** – trávicí buňka, **DCI** – trávicí buňka v rané fázi trávicího procesu.
4d, střevo klíštěte 4 dny po zahájení sání; buňka se začíná plnit endozomy. **6d**, střevo klíštěte 6 dnů po zahájení sání; **DDC** – buňka uvolněná od epitelia. **FF**, střevo plně nasátého klíštěte.

2. Cíle práce

1. Studium funkční morfologie trávicích buněk ze střeva klíštěte *Ixodes ricinus* světelnou mikroskopií v průběhu sání.
2. Vnitrobuněčná lokalizace trávicích peptidáz (katepsinu B, L, D) v průběhu sání nepřímou imunofluorescencí.

3. Materiál a metody

3.1 Chov *Ixodes ricinus*

Klíšťata *I. ricinus* byla sbírána vlnkováním a umístěna v laboratorním chovu Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích. Samci a samice jsou uchováváni odděleně ve skleněných nádobkách v boxech s vlhkostí kolem 95%, při konstantní teplotě vzduchu 26°C s fotoperiodou L:D 12:12.

3.2 Histochemie – LR White

Pro pokusy byla použita střeva klíšťat, která byla pitvána v různých časových intervalech (nenasátá, dva, čtyři a šest dní sání na morčeti, a plně nasátá).

Klíšťata byla přichycena na Petriho misku naplněnou ztuhlým voskem a pitvána v PBS pod binokulárním mikroskopem. Pomocí nůžek byla odstraněna posteriorní kutikula. Střevo bylo vypitváno a přeneseno do fixáže (roztok 4% formaldehydu a 0.5% glutaraldehydu v 0.1M Na-fosfátovém pufru, pH 7.2).

Tkáně byly fixovány přes noc při 4°C. Druhý den byla střeva promyta (3 x 10 min) ve vypíracím roztoku (4% glukóza v 0.1 M Na-fosfátovém pufru, pH 7.2). Odvodňování střevní tkáně probíhalo pomocí etanolové řady. K jednotlivým vzorkům byly přidávány roztoky o různé koncentraci etanolu (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%). V každém roztoku byly vzorky ponechány 15 minut. Následně byly ke vzorkům přidávány roztoky 90% etanolu a pryskyřice LR White (London Resin Company Ltd.) v poměrech 2:1, 1:1, 1:2. V každém roztoku byly tkáně ponechány 1 hodinu při 4°C. Přes noc byly vzorky při 4°C prosycovány čistou pryskyřicí. Druhý den byla střeva umístěna do želatinových kapslí, které byly zcela naplněny pryskyřicí. Vzorky polymerovaly při teplotě 50°C po dobu 48 hodin. Na závěr byla z polymerovaných vzorků odstraněna želatinová kapsle.

Při výše zmíněném postupu přípravy tkáňových bločků byla použita mikrovlnná trouba (nastavená na nejnižší výkon – 80W či stupeň rozmrazování). Mikroskopické vzorky s tkáněmi v různých roztocích byly umístovány do vodní lázně, kde byly vždy třikrát po dobu 30 vteřin vystaveny působení mikrovln a následně v přibližně pětiminutových intervalech třepány v nádobě s ledem.

Z pryskyřicových bločků byly na mikrotomu (Leica Ultracut UCT) krájeny polotenné řezy (0,5 μm), které byly nanášeny na sklíčka (SuperFrost®Plus). Struktura střevní tkáně byla pozorována světelným mikroskopem (Olympus CX41 vybavený fotoaparátem Olympus 510) po obarvení toluidinovou modří (1% toluidinová modř v 1% tetraboritanu sodném, 1:1). Digitální fotografie byly nasnímány softwarem QuickPHOTO CAMERA 2.2.

3.3 Histochemie – Epon

Po vypitvání byla klišťecí tkáň přes noc při 4°C fixována 2.5% glutaraldehydem v 0.1M Na-fosfátovém pufru. Poté byla 3 x 5 minut proprána ve vypíracím roztoku (4% glukosa v 0.1M Na-fosfátovém pufru, pH 7.2). Následně byla tkáň dvě hodiny fixována pomocí 4% roztoku OsO_4 v 0.1M Na-fosfátovém pufru v poměru 1:1. Následovalo promytí ve vypíracím roztoku (3 x 5 minut). Vzorky byly odvodněny acetonovou řadou (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%). V každém stupni byly ponechány 15 minut. Následně byly vzorky postupně umisťovány do roztoků 100% acetonu a pryskyřice Epon v poměrech 2:1, 1:1, 1:2. Inkubace probíhala vždy hodinu. Přes noc byly vzorky prosycovány čistou pryskyřicí a následující den zality do formiček a umístěny na 48h do termostatu (60°C). Z pryskyřicových bločků byly krájeny polotenné řezy, které byly vyhodnoceny pomocí světelného mikroskopu (viz výše). Ultratenké řezy (70 nm) byly sbírány na sítky, kontrastovány (octanem uranylu a citrátem olova) a prohlíženy transmisním elektronovým mikroskopem (JOEL 1010, Kamera Mega ViewIII, software AnalySIS – Olympus).

3.4 Příprava imunních sér pro imunocytochemii

Primární protilátky proti testovaným peptidázám byly připraveny v naší laboratoři imunizací králíků rekombinantními proteiny, získanými expresí v *E. coli* (Sojka a kol., 2007). Pro získání vysoce specifických protilátek byly provedeny purifikační metody popsané níže.

3.4.1 Izolace Ig frakce protilátek

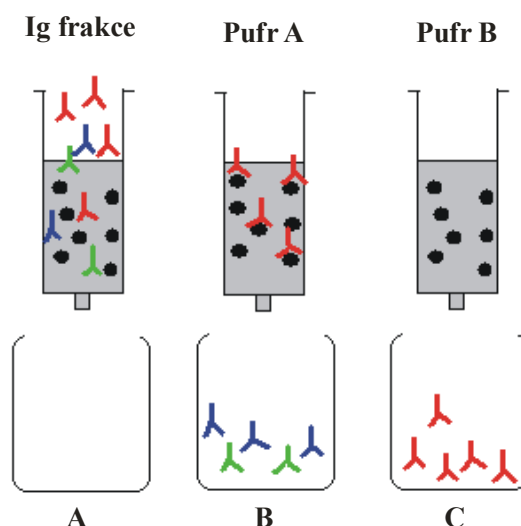
Imunoglobulinová frakce byla izolována z imunního séra srážením pomocí kyseliny kaprylové. Jeden díl séra byl smíchán se dvěma díly 50mM Na-acetátového pufru, pH 4.0. K vzniklému roztoku byla po menších dávkách s přibližně pětiminutovými intervaly postupně přidávána kaprylová kyselina (celkem 25 $\mu\text{l/ml}$ směsi). Následovalo srážení séra při pokojové

teplotě po dobu 1.5 hodiny. Všechny doposud popsané kroky byly prováděny za stálého míchání. Následně byla směs rozdělena do 15ml zkumavek typu Falcon, 10 minut centrifugována při 5.000 otáčkách. Supernatant byl přečištěn přes filtrační papír a dialyzován proti dvěma litrům 5mM Na₂HPO₄ přes noc v chladu.

3.4.2 Purifikace protilátek pomocí afinitní chromatografie

Postup purifikace protilátek byl s několika obměnami proveden dle Camenisch a kol. (1999). Lyofilizovaná CNBr-aktivovaná sefaróza 4B (0.5g) - Pharmacia - byla nabobtnána ve 20 ml 1mM HCl. Po 30 minutách stálého míchání byla sefaróza 15 minut promývána na skleněné fritě 500 ml 1mM HCl v několika dávkách. Následovalo promytí sefarózy pomocí vazebného pufru - B2 (0.5M NaCl, 100mM NaHCO₃, pH 8.3) a resuspendování ve stejném množství pufru, v jakém byl rozpuštěn fúzní protein. Rekombinantní fúzní protein (100-200 µg/ml) byl dialyzován proti pufru B2 a přidán k sefaróze. Po dvouhodinové inkubaci sefarózy s proteinem na rotačním inkubátoru při RT a centrifugaci při 40 x g po dobu pěti minut, bylo k peletu přidáno blokovací medium (0.2M glycin, pH 8.0, 4°C, 16 hod). Tímto byla zajištěna inaktivace aktivních skupin sefarózy, na které se další protein nemohl vázat.

Druhý den byl pelet resuspendován v B2 pufru (30 ml), následně promyt na fritě. Následovalo promytí acetátovým pufrům - B3 (0.5M NaCl, 0.1M octan amonný, pH 4.0, 50ml). Střídání pufrů B2 a B3 bylo pětkrát opakováno. Před nanesením na kolonu byla sefaróza s navázaným proteinem převedena do sterilního PBS. V chladové místnosti byla kolona promyta sterilním PBS (přibližně 50 ml) a v zápětí nanesena Ig frakce protilátek (1ml/min). Po promytí kolony sterilním PBS (50 ml) byly navázané Ig protilátky vymyty elučním pufrům (0.15M NaCl, 0.2M glycin, pH 2.2). Najímané frakce byly ihned neutralizovány 1M Tris base. Kolona byla promyta PBS s 0.02% NaN₃ a uchována při 4°C pro opětovné použití.



Obr.č.5: Schéma afinitní purifikace. **A**, Ig frakce protilátek nanesena na kolonu s navázaným rekombinantním proteinem. **B**, kolona promyta sterilním PBS (pufř A), odmytí nespecifických protilátek. **C**, kolona promyta elučním pufřem (pufř B), získání specifických protilátek.

3.5 Imunocytochemie na polotenkových řezech

Pro lokalizaci daných trávicích peptidáz nepřímou imunofluorescencí byly použity přečištěné králičí protilátky. Celý proces značení probíhal ve vlhké komůrce, aby řezy při přípravě nevyschly, a na kývající platformě (pro lepší přístup protilátek k antigenům).

Pro vyblokování nespecifických vazeb bylo na řezy naneseno 50 μ l blokovacího roztoku (1% BSA, 10% sušené mléko, v PBS-T). Blokovací roztok byl před použitím centrifugován při 13 000 otáčkách 8 minut a následně přefiltrován přes 0.22 μ m filtr (Millipore).

Po 10 minutovém působení blokovacího roztoku byly řezy promyty (2 x 5 minut) pomocí PBS-T. Poté byly inkubovány 3.5 hodiny s 50 μ l primární protilátky, RT. Všechny použité primární protilátky byly před nanesením vyředěny v PBS-T na koncentraci 30 μ g/ml a dvě minuty centrifugovány při 10.000 otáčkách. Po inkubaci řezů s primární protilátkou následovalo promytí pomocí PBS-T (4 x 5 minut). Sekundární protilátka Alexa Fluor[®] 488 (Molecular Probes) byla naředěna 1:200 v PBS-T. Inkubace trvala 45 minut, RT. Po uplynutí této doby opět následovalo promytí řezů PBS-T (4 x 5 minut). Pro lepší orientaci ve střevní struktuře byla jádra buněk barvena 7 minut pomocí DAPI (4'.6'-diamidino-2-fenylindol; 2.5 μ g DAPI na 1ml destilované vody; Sigma-Aldrich). Následovalo promytí destilovanou vodou (3 x 5 minut). Na závěr byla sklíčka s řezy vysušena a zalita do 2.5% DABCO (Sigma-Aldrich) v glycerolu.

Řezy byly vyhodnoceny pomocí konfokálního mikroskopu Olympus FW1000 a dále zpracovávány v programu Fluoview (FV10-ASW, Ver1.7).

3.6 Imunocytochemie na totálních preparátech

Pro lokalizaci trávicích peptidáz v totálních preparátech bylo vypitvané klíštěcí střevo roztrženo, aby byly buňky lépe přístupné protilátce, a na rotačním inkubátoru fixováno při 4°C přes noc v 4% formaldehydu. Následující den bylo střevo promyto (3 x 10 minut) 0.3% PBS-Tr a následně na rotačním inkubátoru hodinu blokováno 0.1% BSA v PBS-Tr a 5% kozím sérem (NGS). Primární protilátka byla naředěna v 1% NGS na koncentraci 30 µg/ml a inkubována s tkání přes noc při 4°C na rotačním inkubátoru. Následovalo promytí tkáně pomocí PBS-Tr (6 x 10 minut) a blokování po dobu 30 minut pomocí 1% NGS v PBS-Tr. Sekundární protilátka Alexa Fluor[®] 488 byla naředěna 1:200 v 1% NGS v PBS-Tr a inkubována s tkání přes noc při 4°C, na rotátoru. Poté následovalo promytí PBS-Tr (6 x 10 minut). Ve čtvrtém promytí bylo do PBS-Tr přidáno DAPI. Na závěr bylo PBS-Tr nahrazeno PBS. Tkáně byly přeneseny do kapičky zalévacího média – Vectashield[®] Hard Set (Vector) a následně vyhodnoceny konfokálním mikroskopem Olympus FV1000 a dále zpracovávány v programu Fluoview (FV10-ASW, Ver1.7).

4. Výsledky a diskuze

4.1 Studium funkční morfologie trávicích buněk ze střeva klíštěte *Ixodes ricinus* světelnou mikroskopií

V této diplomové práci byla pomocí světelné mikroskopie studována funkční morfologie trávicích buněk ze střeva klíštěte *I. ricinus* v různých časových intervalech (klíšťata: nenasátá, dva, čtyři a šest dní sání na morčeti, a plně nasátá) **obr.č.6**.

Střevní epitelium nenasátých, hladovějících samic je charakteristické přítomností rezervních buněk a trávicích buněk zachovaných z předchozího nymfálního stádia (**Obr.č.6-UF**). Střevní lumen, které je buňkami obklopeno, je velice úzké. Trávicí buňky mohou obsahovat endozomy s nestráveným hemoglobinem a residuální tělíska se zbytky z lysozomálního trávení nymfálního stádia. Přítomné jsou rovněž lipidové inkluze.

Jakmile se krev dostane do střevního lumen, rezervní buňky začnou růst a mnohé z nich se diferencují v buňky trávicí (Agyei a Runham, 1995). Tento stav pozorujeme druhý den po začátku sání klíštěte. Střevní lumen se s příjmem tekutin zvětšuje. Ve střevě se začínají objevovat trávicí buňky (**Obr.č.6-2d**).

Čtvrtý den po zahájení sání dochází k vstřebávání hemoglobinu a tvorbě hemozomů. Zároveň se akumulují vakuoly lipidové povahy. Trávicí buňky se v důsledku těchto změn zvětšují. V této době se začínají objevovat první buňky, které se oddělují od epitelia (**Obr.č.6-4d**).

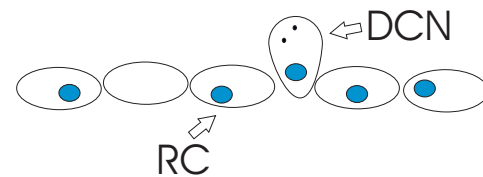
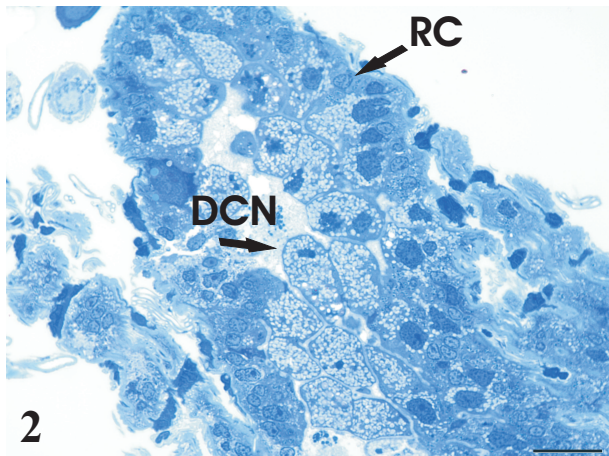
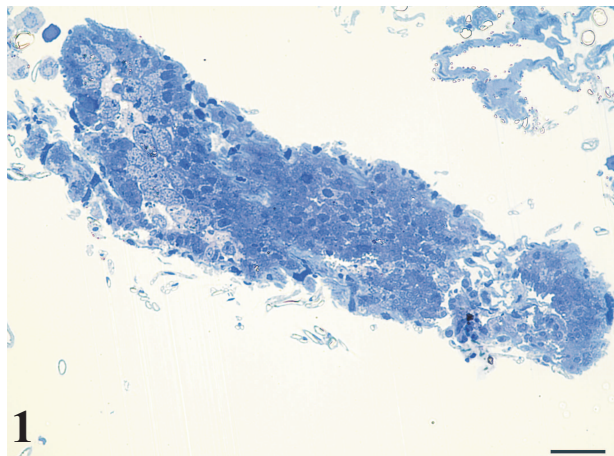
Šestý den od počátku sání jsou trávicí buňky přítomné ve velkém počtu (**Obr.č.6-6d**). Dochází k akumulaci hemozomů (residuálních tělísek) a rovněž lipidových inkluzí. Po nahromadění mnoha odpadních produktů se trávicí buňka oddělí od epithelia a dostane se do lumen střeva, kde se stane součástí defekovaného materiálu. Sonenshine (1991) lokalizoval velké množství hematinu a nestráveného hemoglobinu v rektální žláze. Někteří autoři popisují přítomnost residuálních tělísek v lumen střeva, kam se dostaly exocytózou trávicích buněk nebo po jejich rozpadu (Agyei a Runham, 1995; Tarnowski a Coons, 1989; Sonenshine, 1991). Během našeho zkoumání nebyla přítomnost odpadních produktů či rozpadlých buněk v lumen střeva pozorována.

Přibližně šestý až sedmý den od počátku sání klíštěte na hostiteli navazuje na fázi pomalého příjmu hostitelské krve fáze nazývaná „rapid engorgement“. Během krátkého časového úseku přijme oplodněná samice velké množství hostitelovy krve. Střevo plně

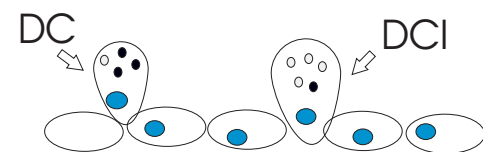
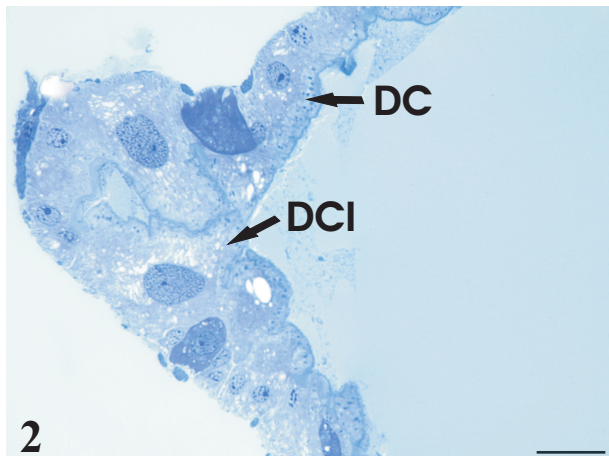
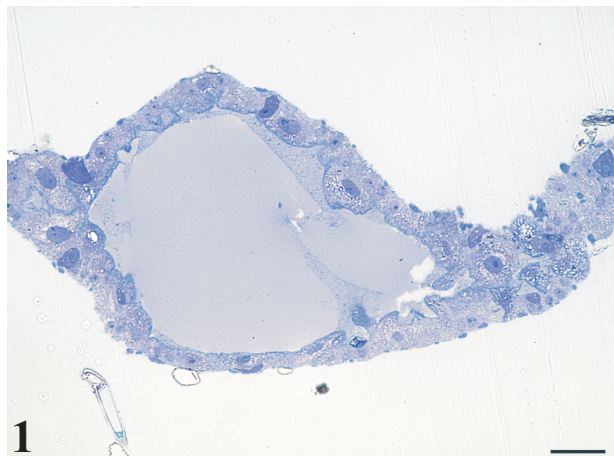
nasátých samic je charakteristické přítomností zploštělých trávicích buněk a masivním zvětšením střevního lumen (**obr.č.6-FF**). Uvolňování trávicích buněk do střevního lumen nebylo v této fázi pozorováno.

Ve své práci jsem se dosud nezabývala druhou kontinuální fází trávení, tzn. fází, která probíhá po puštění klíštěte z hostitele. Z hlediska vztahu vektor – hostitel je tato fáze méně zajímavá, ovšem její znalost je nutná z hlediska pochopení fyziologie trávení u klíšťat. Studium této fáze kontinuálního trávení bude proto zahrnuto v navazujících experimentech.

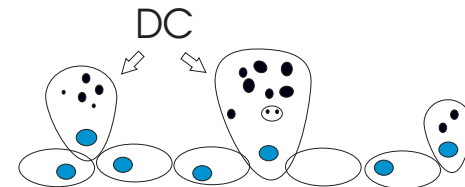
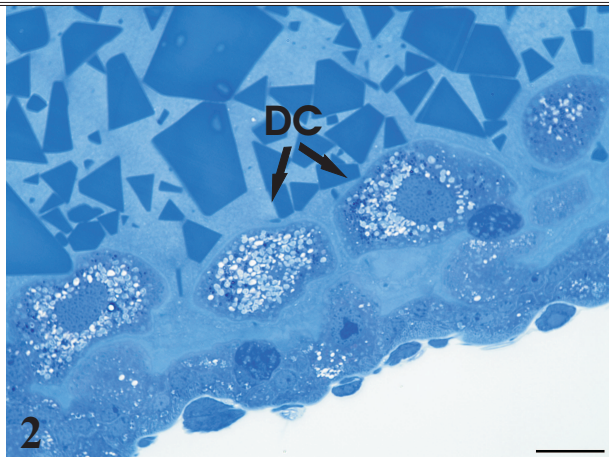
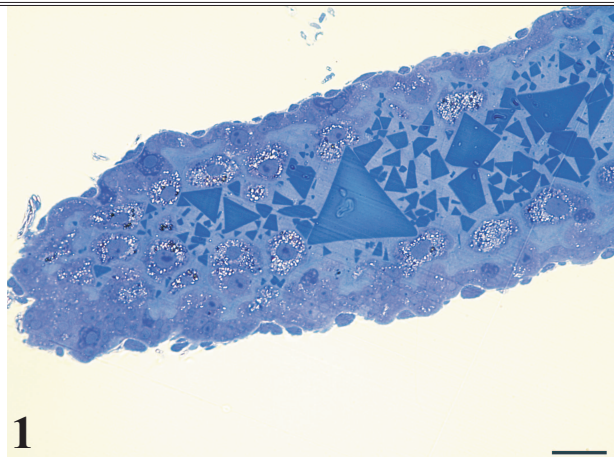
UF

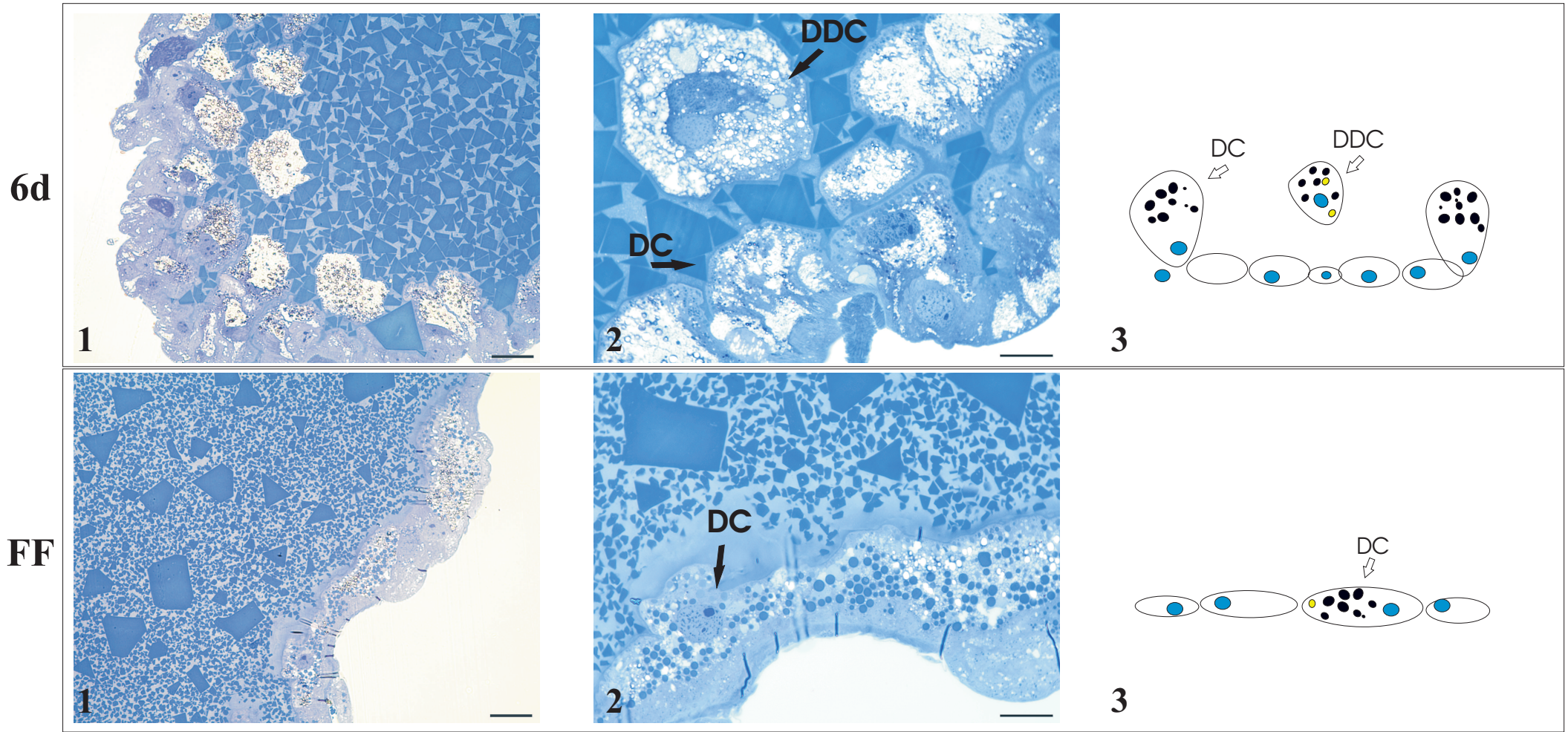


2d



4d





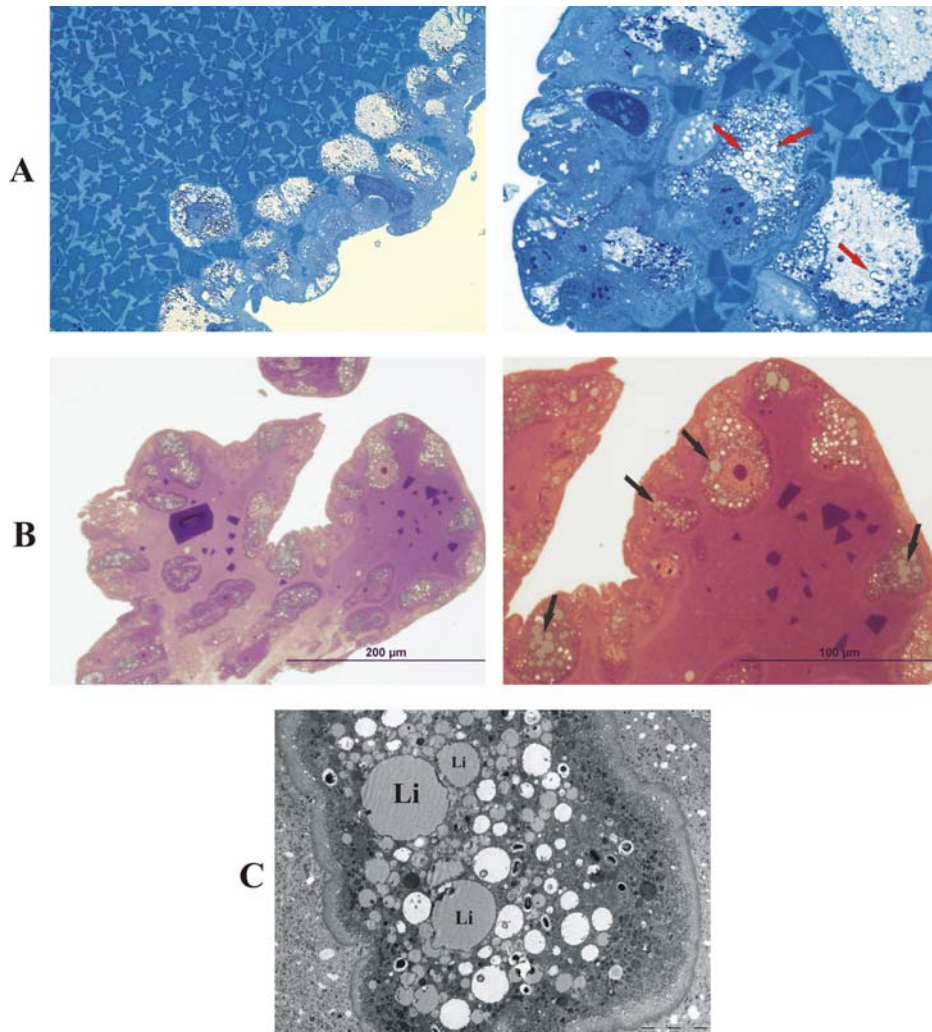
Obr.č.6: Struktura střeva klíštěte *I. ricinus* v různých časových intervalech. Poloténkové řezy barveny toluidinovou modří. UF, střevo nenasátého klíštěte. 2d, dva, 4d, čtyři a 6d, šest dnů po začátku sání. FF, střevo plně nasátého klíštěte. 1, měřítko 40µm. 2, měřítko 20µm. 3, schematické znázornění. Zkratky dle obr.č.3.

4.1.1 Artefakty – histochemie LR White

Počínaje čtvrtým dnem jsme v trávicích buňkách střeva zalitého v pryskyřici LR White pozorovali kulaté či oválné struktury (díry) – **obr.č.7A**. Při pátrání po původu těchto děr jsme studovali strukturu střeva, pro které byla jako zalévací médium použita epoxidová pryskyřice Epon a srovnávali ji se strukturou střev zalitých v LR White. Po obarvení polotenkých řezů toluidinovou modří jsme zjistili, že u vzorků zalitých v Eponu se díry nevyskytují. Na místech, kde bychom tyto díry očekávali, byly přítomné vakuoly, které se barvením naznačily šedozeleně (**Obr.č.7B**). Šedozelené zbarvení vakuol po obarvení řezů toluidinovou modří poukazuje na přítomnost lipidových složek (Dykstra, 2004). Domníváme se tedy, že námi pozorované vakuoly jsou lipidové povahy. Toto zjištění koreluje také s faktem, že v důsledku probíhající první kontinuální fáze trávení dochází k akumulaci lipidových vakuol.

Pro podpoření naší teorie jsme dále studovali ultratenké řezy, zalité v pryskyřici Epon, transmisním elektronovým mikroskopem. Za pomoci této techniky jsme pozorovali vakuoly (**Obr.č.7C**, značené - Li), které svým vzhledem přesně odpovídaly lipidovým vakuolám popsaným na fotografiích z transmisního elektronového mikroskopu publikovaným v Atlasu ultrastruktury klíšat čeledi *Ixodidea* (Balashov, 1983).

Domníváme se tedy, že díry vyskytující se u řezů zalitých v pryskyřici LR White vznikají rozpouštěním těchto lipidových vakuol. K rozpouštění nejspíše dochází při přípravě vzorků (histochemii). Naproti tomu oxid osmičelý, který se používá v případě zalévání tkání do Eponu jako fixační činidlo, je do jisté míry schopen fixovat lipidový materiál. Pokud vynecháme fixaci oxidem osmičelým, získáme vzorky, ve kterých je většina lipidových složek extrahována (Dykstra, 2004). Pro imunolokalizační metody je ale bohužel použití oxidu osmičelého nevhodné, neboť degraduje antigeny rozpoznávané protilátkami.

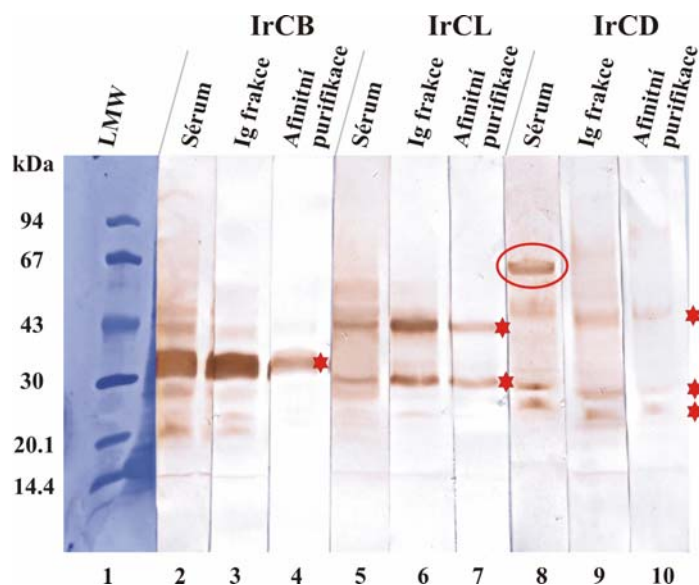


Obr.č.7: Porovnání struktury klíštěcího střeva – LR White vs. Epon. A, tkáň připravena dle protokolu pro zalévání do pryskyřice LRW, červené šipky - díry v trávicí buňce, světelná mikroskopie. **B,** tkáň připravena dle protokolu pro zalévání do pryskyřice Epon, černé šipky – lipidové vakuoly, světelná mikroskopie. **C,** tkáň připravena dle protokolu pro zalévání do pryskyřice Epon, Li – lipidové vakuoly, transmisní elektronová mikroskopie.

4.2 Lokalizace trávicích peptidáz katepsinu B, L, D ve střevě klíštěte *I. ricinus*

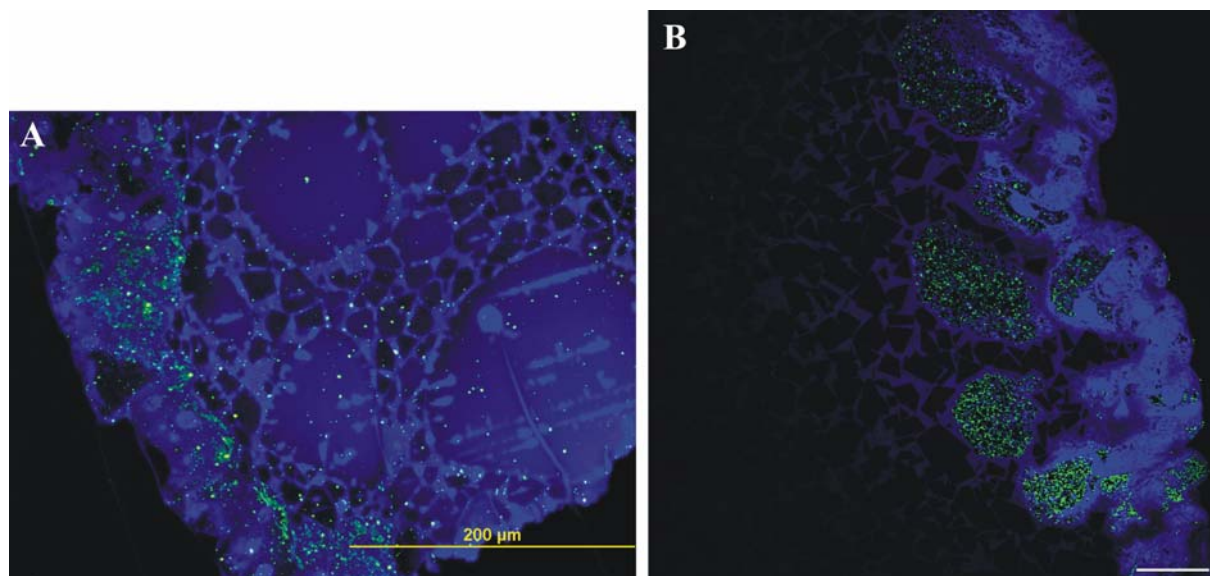
4.2.1 Purifikace protilátek - porovnání lokalizace trávicích peptidáz před a po čištění primárních protilátek

V naší laboratoři byly osekvenovány geny pro cysteinové peptidázy katepsin B (IrCB), katepsin L (IrCL) a aspartátovou proteázu katepsin D (IrCD) - Sojka a kol., 2008. Z těchto sekvencí byly navrženy specifické primery vhodné pro zaklonování do expresního vektoru (pET100, Invitrogen). Získané rekombinantní proteiny byly použity pro přípravu polyklonálních králičích protilátek. Vysrážením získaného séra pomocí kaprylové kyseliny se nám podařilo vyizolovat Ig frakci protilátek, která byla následně přečištěna afinitní chromatografií s rekombinantními proteiny navázanými na CNBr-sefarózu. Specifita protilátek byla otestována metodou Western-blot na rozděleném střevním extraktu. Na **obr.č.8** vidíme identifikaci vybraných trávicích peptidáz na střevních homogenátech klíštěte šest dní po začátku sání. Je zde patrná zvyšující se specifita protilátek vlivem čištění.



Obr.č.8: Identifikace trávicích peptidáz (IrCB, IrCL, IrCD) ve střevních homogenátech, Western-blot. 1, proteinový marker. 2, 5, 8, detekce za použití plného séra z imunizovaných králíků. 3, 6, 9, detekce za použití Ig frakce protilátek. 4, 7, 10, detekce pomocí specificky purifikované protilátky. Hvězdičky označují specifické proužky – aktivní enzym, popř. proenzym. V případě IrCD je patrné účinné odstranění silně reagujícího nespecifického antigenu (zakroužkováno).

Získané purifikované protilátky byly použity pro lokalizaci daných peptidáz nepřímou imunofluorescencí. Na **obr.č.9** je patrný rozdíl v lokalizaci katepsinu B při použití nepřečištěného séra (A) a séra přečištěného výše popsanými metodami (B). Nepřečištěné sérum vykazuje značné pozadí a v určitých případech je katepsin B falešně lokalizován mimo trávicí buňky.



Obr.č.9: Porovnání lokalizace katepsinu B za použití plného séra a přečištěných protilátek. A, nepřečištěné sérum získané imunizací králíka rekombinantním katepsinem B. B, afinitně purifikovaná protilátka. Jádra buněk barvena DAPI, sekundární protilátka Alexa Fluor® 488.

4.2.2 Imunolokalizace katepsinu B ve střevě klíštěte *I. ricinus* v průběhu sání

Jedním z hlavních úkolů této práce byla vnitrobuněčná lokalizace katepsinu B (IrCB). Jako negativní kontrola bylo použito barvení řezů pouze sekundární protilátkou. Jiný typ kontroly nebyl použit, neboť metodou afinitní purifikace jsme získali protilátky, které vykazovaly vysoce specifickou vazbu k příslušným antigenům.

Lokalizace výše zmíněných peptidáz byla prováděna na polotenkých řezech střeva *I. ricinus* získaných v různých časových intervalech sání. Přítomnost IrCB byla v různé míře zjištěna ve všech fázích sání: u klíšťat nenasátých, dva, čtyři, šest dní po začátku sání a u klíšťat plně nasátých.

V případě nenasátých klíšťat byla zjištěna minimální přítomnost IrCB (**Obr.č.10-UF**). V této fázi ještě nedochází k trávení hostitelské krve, nicméně určitá hladina trávicích proteáz může být zachována z trávení v předchozím vývojovém stádiu.

Také u klíšťat, která sála na hostiteli po dobu dvou dnů pozorujeme minimální přítomnost IrCB (**Obr.č.10-2d**). Výsledek imunolokalizace se shoduje s výsledkem funkční morfologie trávicích buněk, kdy byla zjištěna pouze minimální přítomnost těchto buněk.

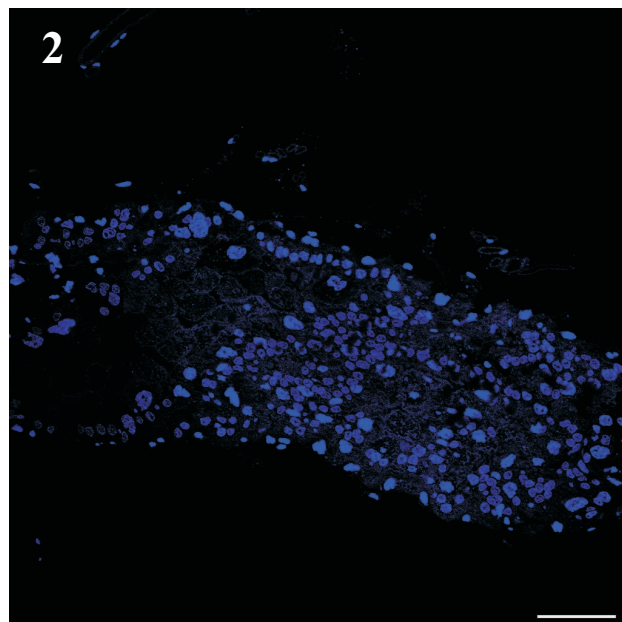
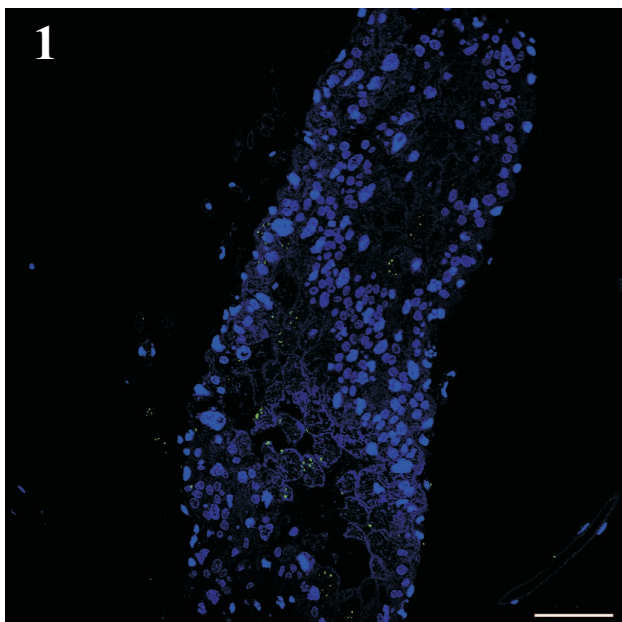
Čtvrtý den po začátku sání dochází ke vstřebávání hostitelského hemoglobinu a následnému intracelulárnímu trávení. V této době pozorujeme lokalizaci IrCB v trávicích buňkách ve větším množství (**Obr.č.10-4d**).

Nejsilnější signál pro IrCB byl zachycen šestý den od začátku sání. IrCB byl lokalizován v trávicích buňkách a současně i v buňkách, které se nacházely volně v lumen střeva (**Obr.č.10-6d**).

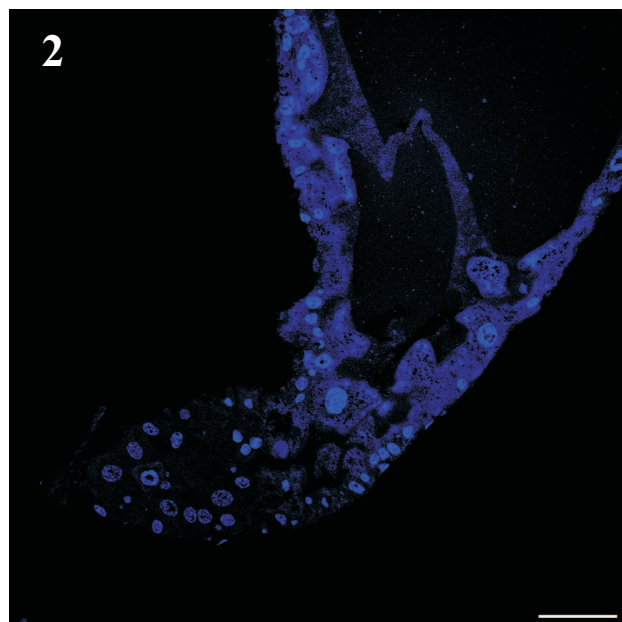
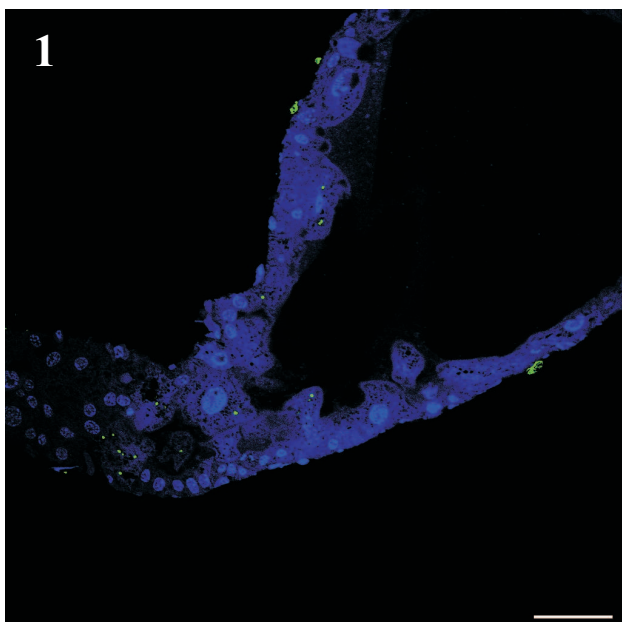
V trávicích buňkách plně nasátých samic - v průběhu fáze „rapid engorgement“, až do puštění klíštěte z hostitele - dochází ke zpomalení trávení a hladina IrCB je oproti šestému dni snížena. Pouštění trávicích buněk do lumen střeva nebylo v této fázi pozorováno (**Obr.č.10-FF**).

Mikroskopická lokalizace IrCB je ve shodě s průběhem aktivity a proteinovým profilem IrCB v průběhu sání zjištěným v naší laboratoři (Konvičková, 2009). S tímto také koreluje výsledky průběhu hemoglobinolýzy (rozhraní mezi fázemi „slow feeding“ a „rapid engorgement“), kdy byl mezi čtvrtým a šestým dnem zjištěn výrazný nárůst hemoglobinolytické aktivity (Horn a kol., 2009).

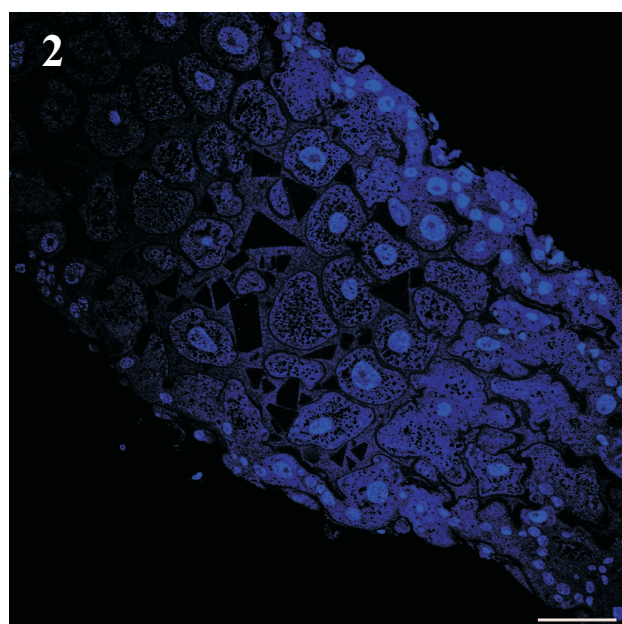
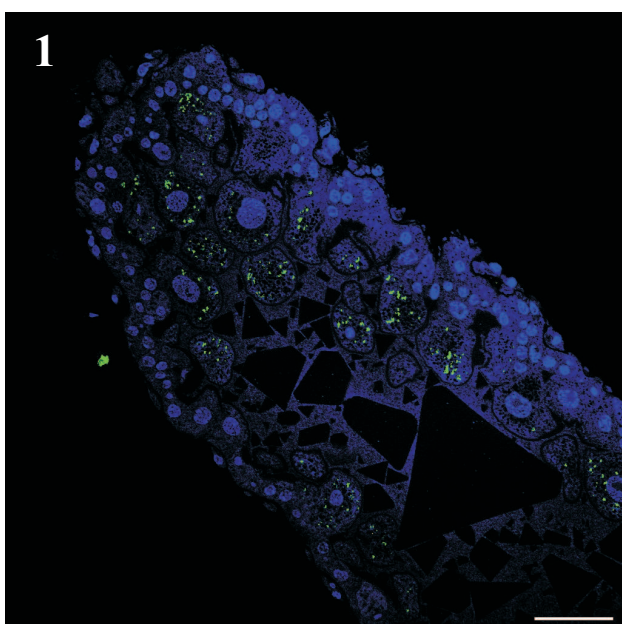
UF

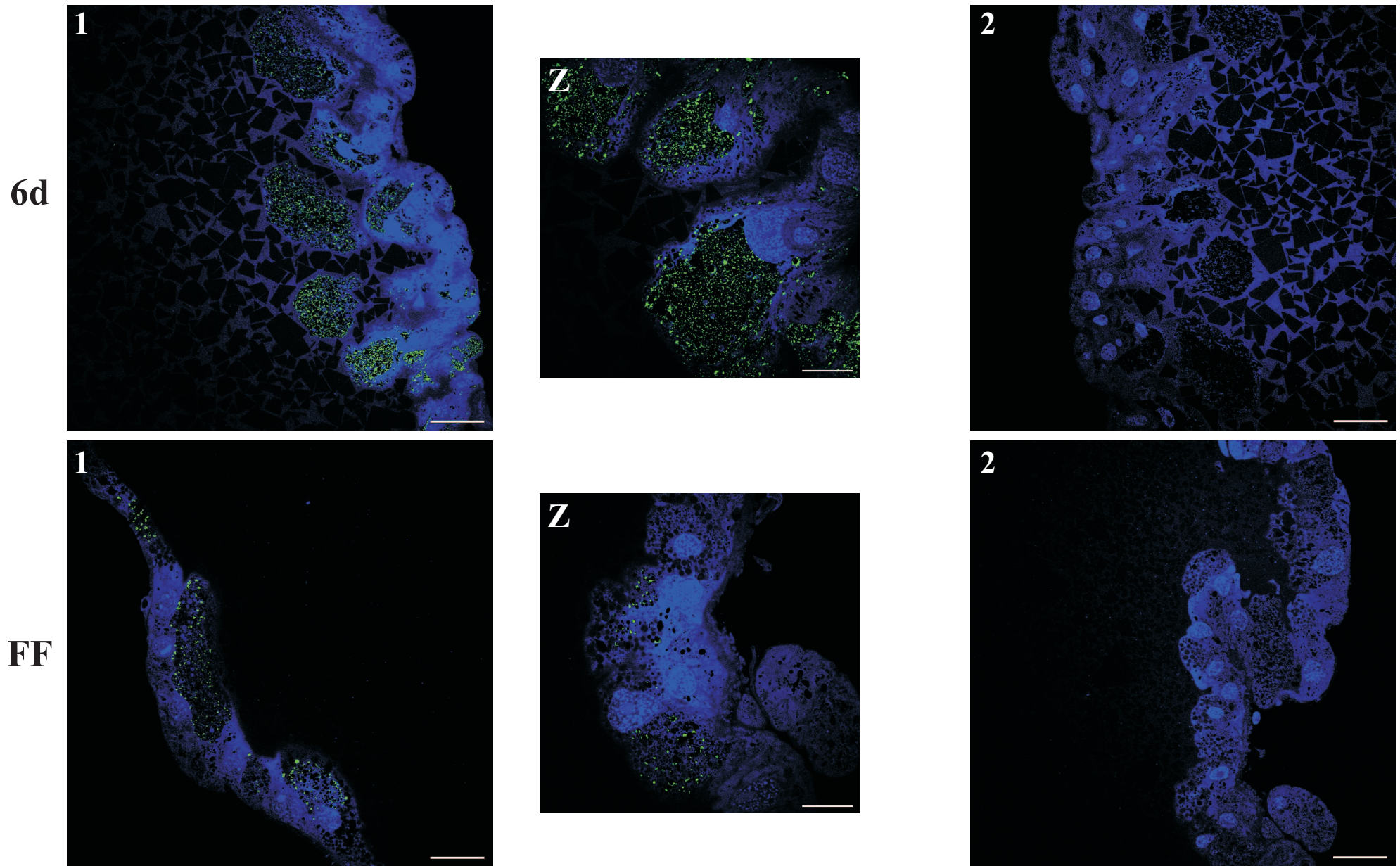


2d



4d

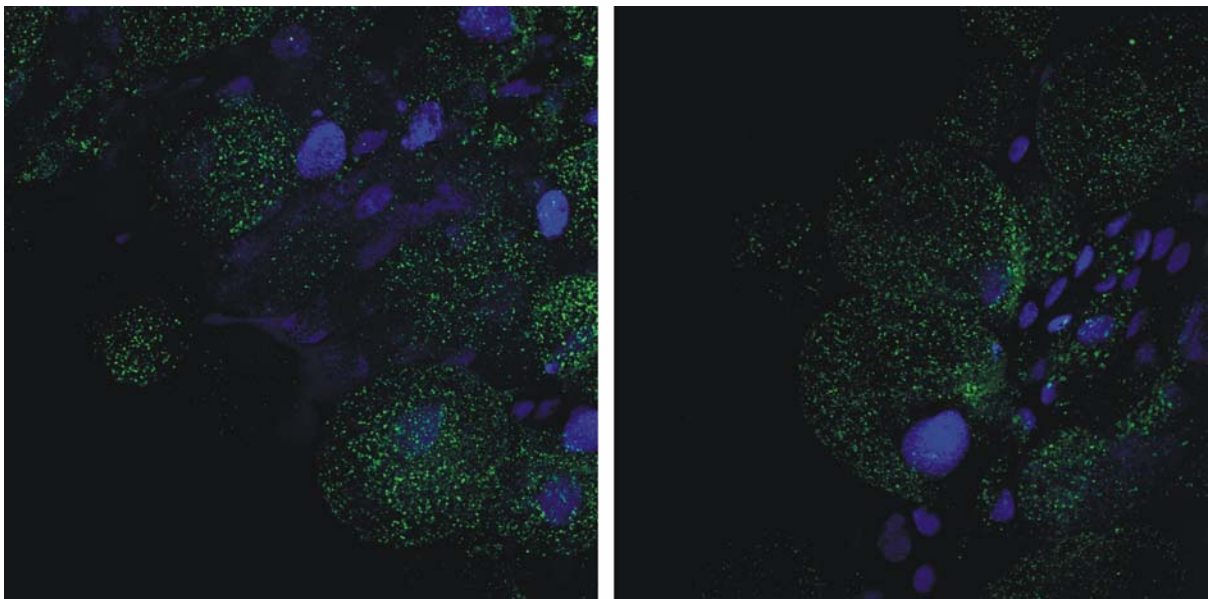




Obr.č.10: Lokalizace katepsinu B ve střevě klíštěte *I. ricinus* nepřímou imunofluorescencí v průběhu sání. Jádra buněk barvena DAPI, sekundární protilátka Alexa Fluor® 488. UF, střevo nenasátého klíštěte. 2d, dva, 4d, čtyři a 6d, šest dnů po začátku sání. FF, střevo plně nasátého klíštěte. 1, měřítko 40µm. Z, detail, měřítko 20µm. 2, kontrola. Konfokální mikroskop.

4.2.3 Lokalizace katepsinu B v totálních preparátech

V průběhu naší práce jsme se setkali s argumenty, že výsledné signály lokalizace mohou být arteficiální v důsledku výskytu drobných děr v řezech. Abychom tyto námitky vyvrátili a potvrdili lokalizaci IrCB v trávicích buňkách, provedli jsme imunocytochemii na totálních preparátech. Během přípravy nebyla klíštěcí tkáň vystavena žádným účinkům látek, které by mohly porušit strukturu buněk či odmyt obsah vakuol. Výsledky imunocytochemie získané konfokálním mikroskopem vykazují distribuci IrCB v celém objemu trávicích buněk (Obr.č.11).

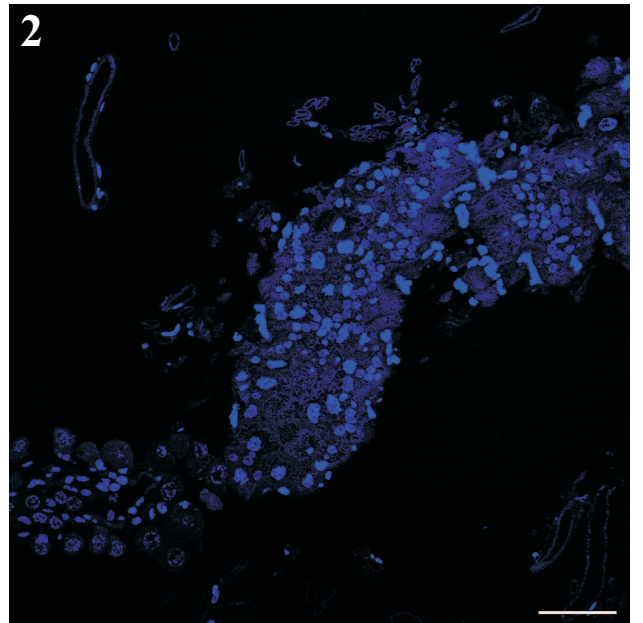
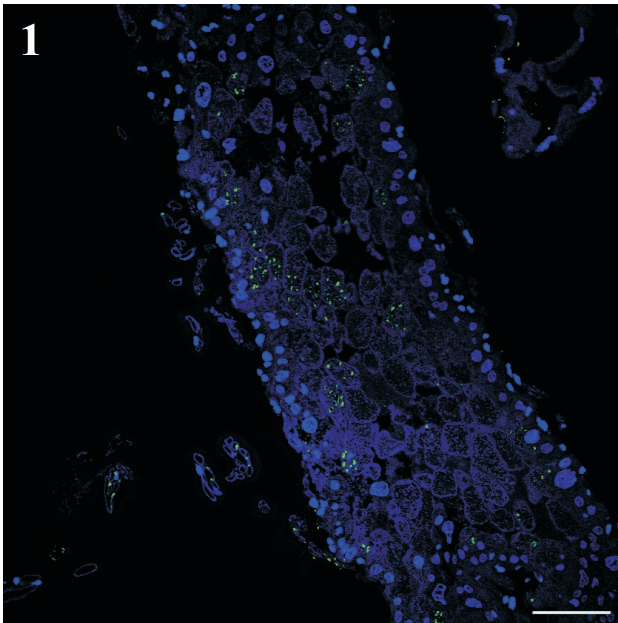


Obr.č.11: Lokalizace katepsinu B ve střevě klíštěte *I. ricinus*, šestý den po začátku sání, totální preparát. Sekundární protilátka Alexa Fluor[®] 488-zeleně, jádra buněk barvena DAPI-modře. Konfokální mikroskop.

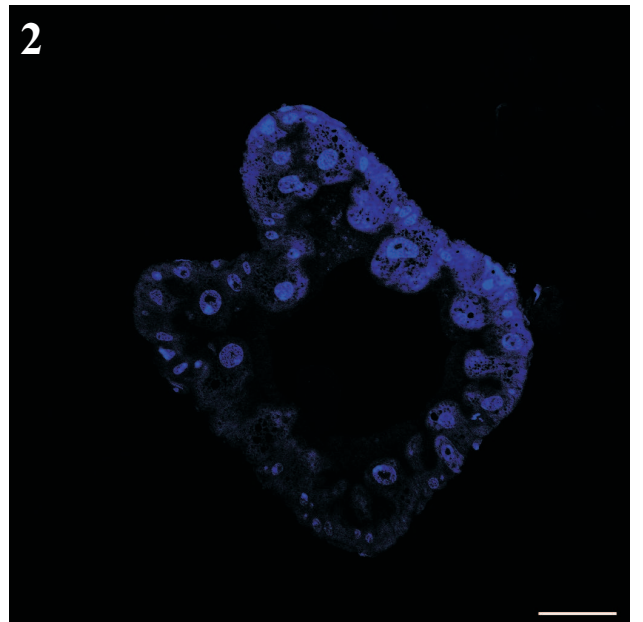
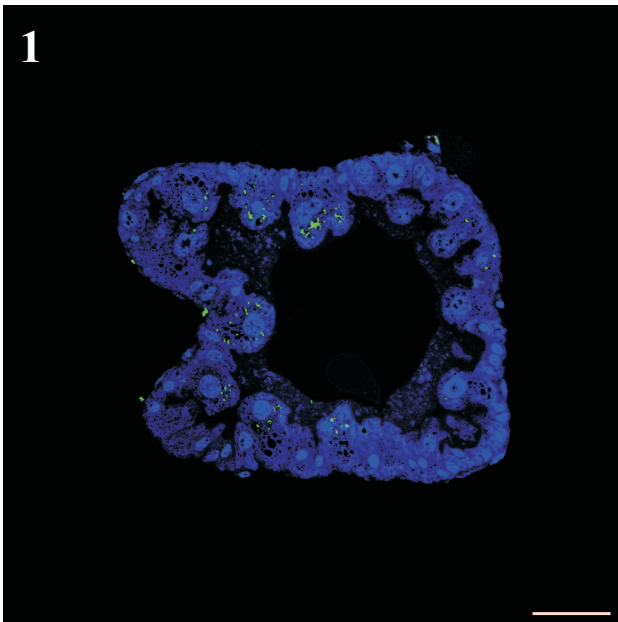
4.2.4 Imunolokalizace katepsinu L ve střevě klíštěte *I. ricinus* v průběhu sání

Dalším úkolem této práce byla lokalizace IrCL. V případě IrCL nebyla pozorována výrazná změna v lokalizaci v průběhu sání (**Obr.č.12**). Intenzita signálu IrCL byla ale výrazně nižší než intenzita signálu pozorovaného u IrCB. Množství aktivního IrCL ve střevě polonasátého klíštěte (5-6 dní po nasátí) je v porovnání s množstvím aktivního IrCB jen 10% (Horn a kol., 2009). V rozporu s těmito údaji je výsledek z Western-blotu, kdy byl IrCL dobře detegovatelný a intenzita signálu se příliš nelišila od intenzity signálu IrCB (viz **obr.č.8**). Důvodem je pravděpodobně použití většího množství střevní tkáně a tedy i trávicích buněk pro metodu Western-blot. Z většího množství trávicích buněk samozřejmě získáme více IrCL než je možno detekovat v omezeném počtu buněk přítomném v jediném polotenkém řezu.

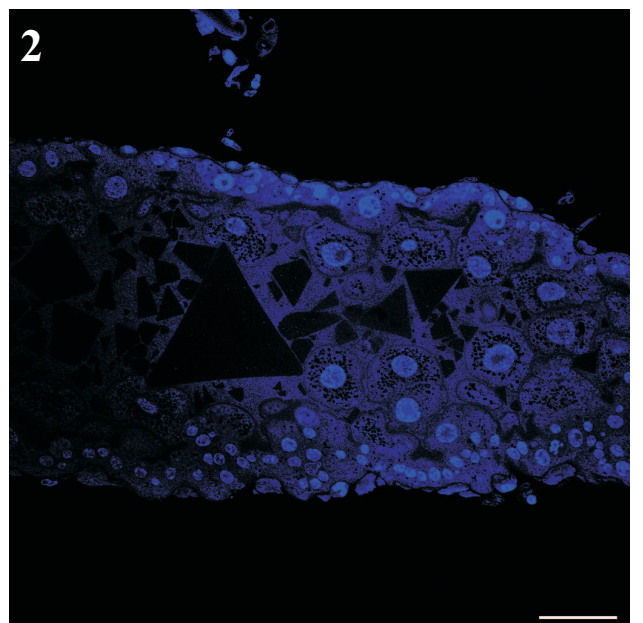
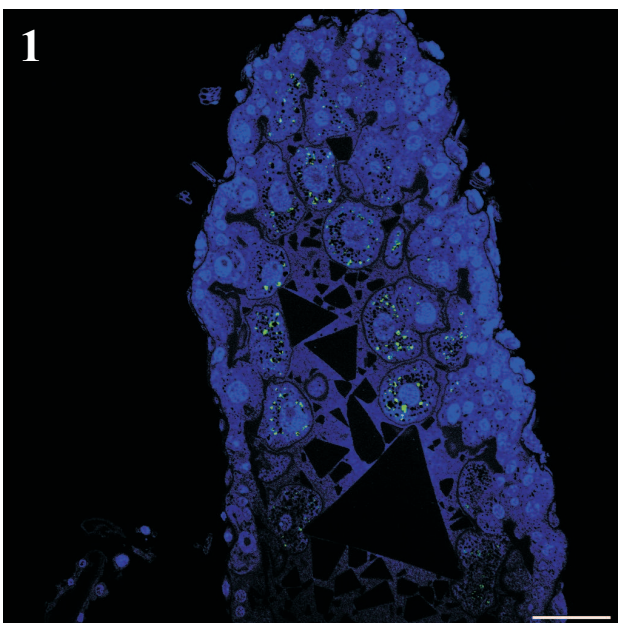
UF

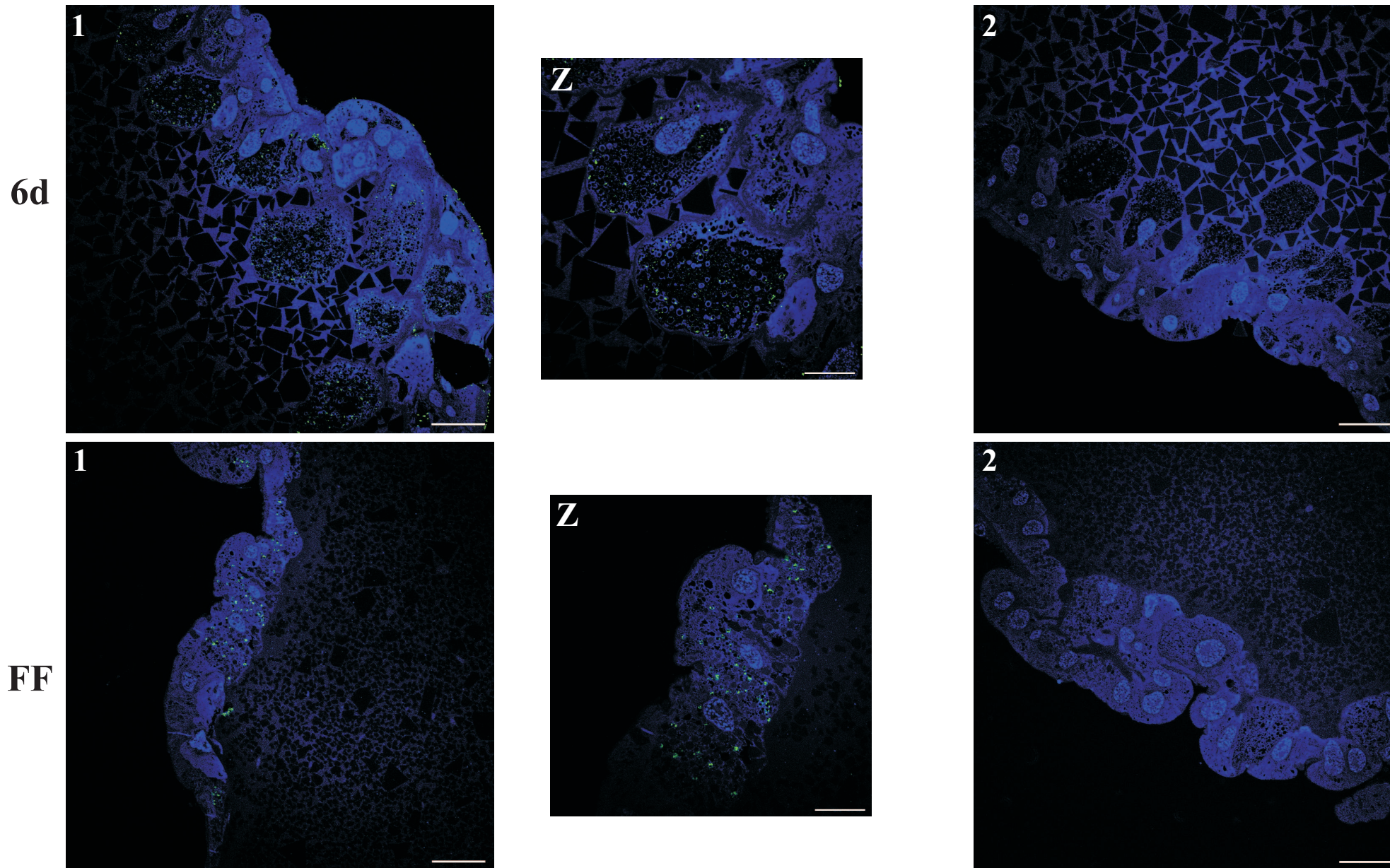


2d



4d



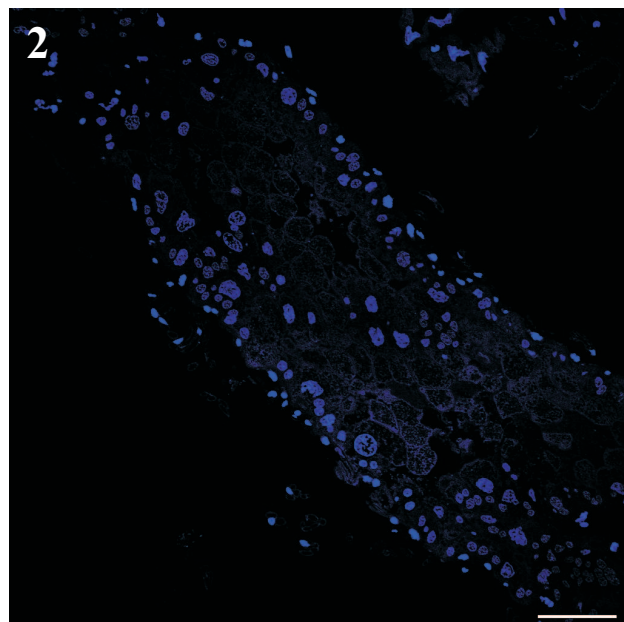
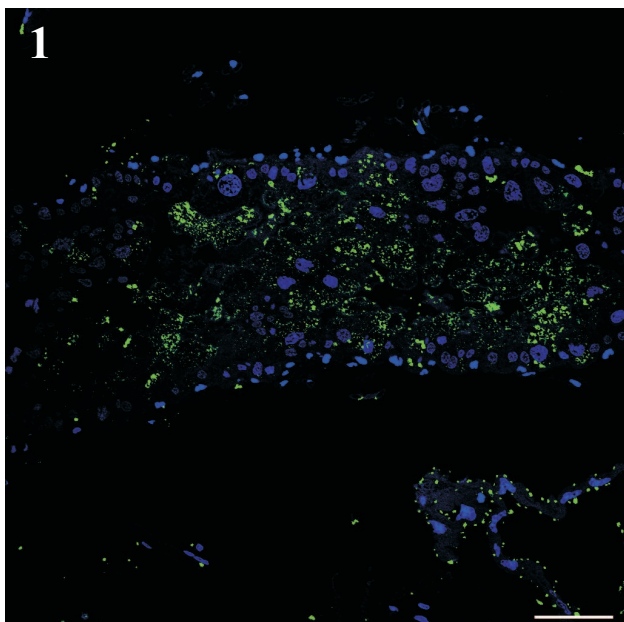


Obr.č.12: Lokalizace katepsinu L ve střevě klíštěte *I. ricinus* nepřímou imunofluorescencí v průběhu sání. Jádra buněk barvena DAPI, sekundární protilátka Alexa Fluor® 488. UF, střevo nenasátého klíštěte. 2d, dva, 4d, čtyři a 6d, šest dnů po začátku sání. FF, střevo plně nasátého klíštěte. 1, měřítko 40μm. Z, detail, měřítko 20μm. 2, kontrola. Konfokální mikroskop.

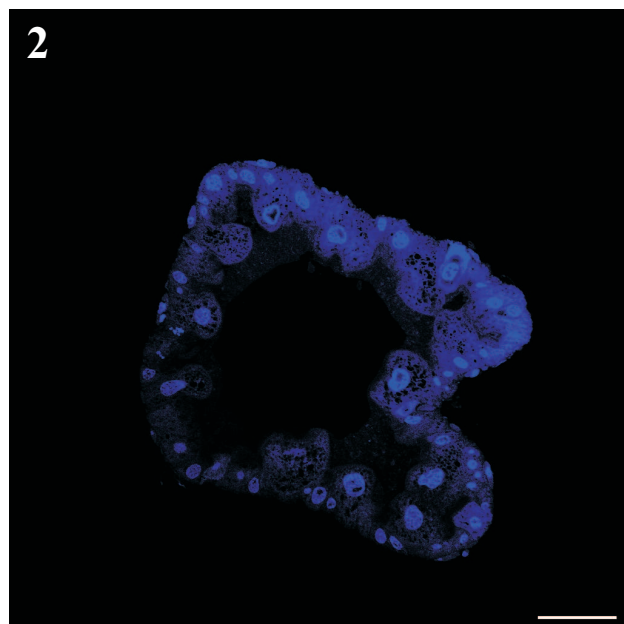
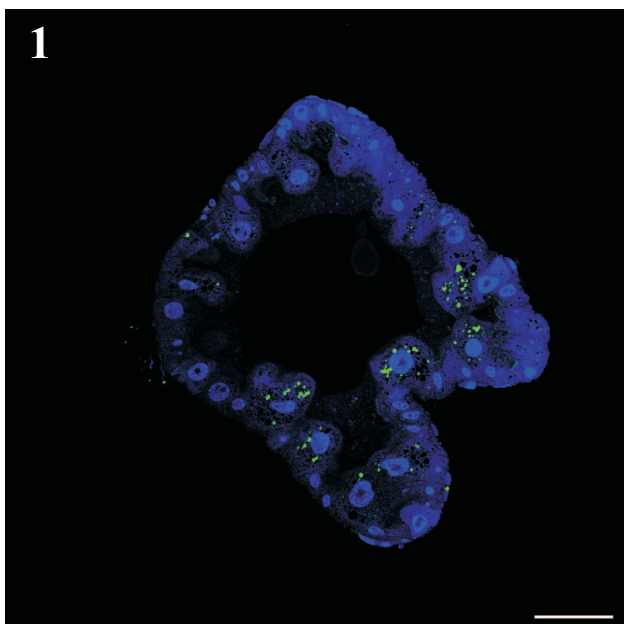
4.2.5 Imunolokalizace katepsinu D ve střevě klíštěte *I. ricinus* v průběhu sání

Katepsin D byl lokalizován ve velkém množství v průběhu sání i u nenasátého klíštěte (**Obr.č.13**). Tento výsledek neodpovídá zcela průběhu aktivity IrCD (Konvičková, 2009), kdy byl IrCD v počátku sání nedetekovatelný. Vysvětlením může být, že naše protilátka nerozeznává aktivní IrCD od neaktivního pro-IrCD přítomného na endoplazmatickém retikulu. Lokalizaci může zkreslovat i nízká specifita protilátek proti IrCD. Rozdílná specifita ve srovnání s protilátkami proti IrCB a IrCL je patrná na **obr.č.8**. V případě katepsinu D je tedy nutné připravit nové protilátky.

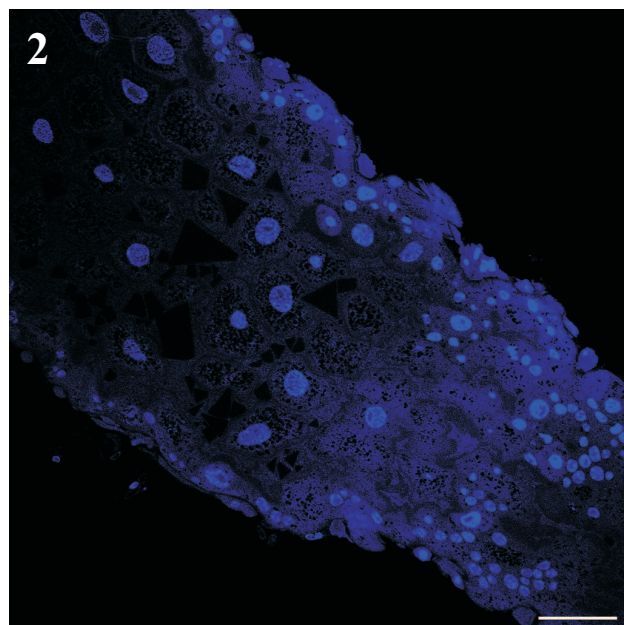
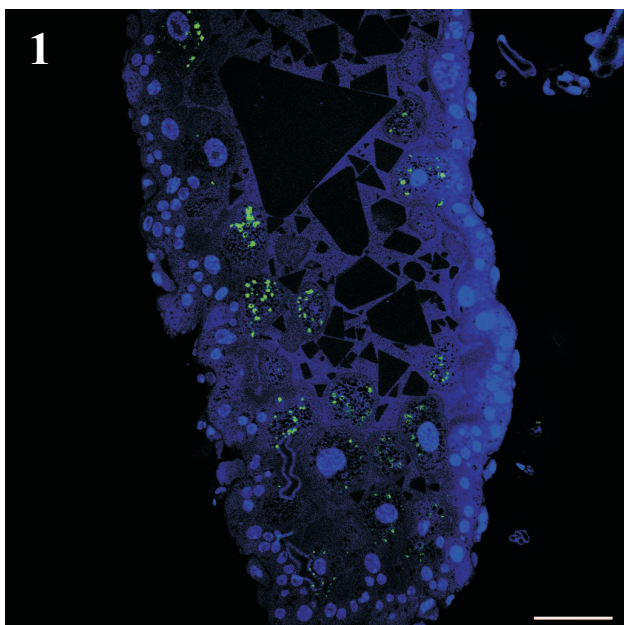
UF

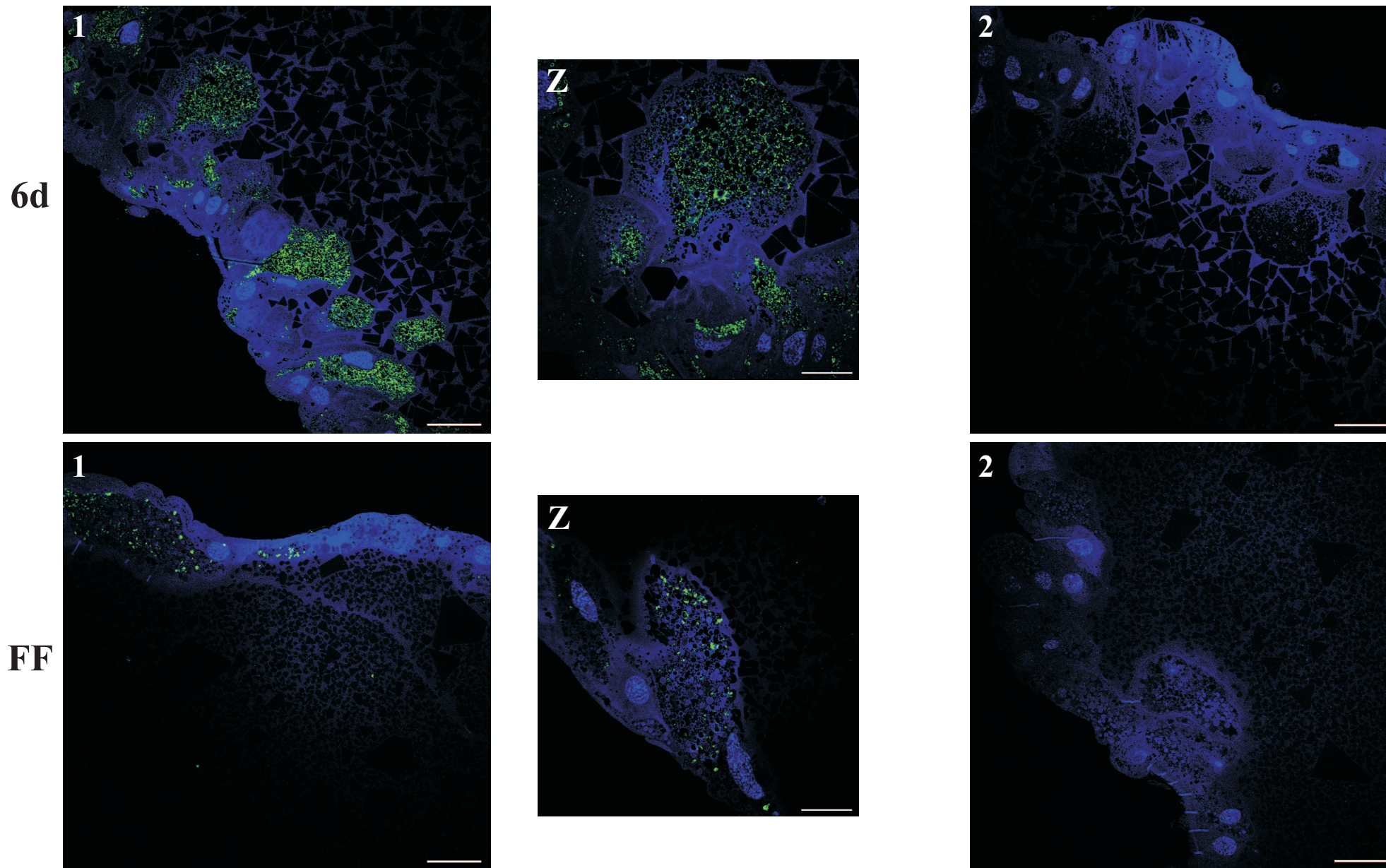


2d



4d





Obr.č.13: Lokalizace katepsinu D ve střevě klíštěte *I. ricinus* nepřímou imunofluorescencí v průběhu sání. Jádra buněk barvena DAPI, sekundární protilátka Alexa Fluor® 488. UF, střevo nenasátého klíštěte. 2d, dva, 4d, čtyři a 6d, šest dnů po začátku sání. FF, střevo plně nasátého klíštěte. 1, měřítko 40µm. Z, detail, měřítko 20µm. 2, kontrola. Konfokální mikroskop.

5. Závěr

V této diplomové práci byla pomocí světelné mikroskopie studována funkční morfologie trávicích buněk ze střeva klíštěte *Ixodes ricinus* v průběhu sání na hostiteli. Byla popsána postupná tvorba trávicích buněk ve střevě klíšťat a následná tvorba trávicích vakuol a hemozomů.

Dalším bodem této práce byla lokalizace trávicích peptidáz účastnících se degradace hostitelského hemoglobinu. Pomocí nepřímé imunofluorescence byla studována lokalizace cysteinových peptidáz katepsinu B, katepsinu L a aspartátové peptidázy katepsinu D v trávicích buňkách klíštěte *I. ricinus* v průběhu sání (klíšťata nenasáta, dva, čtyři, šest dní po nasátí a plně nasátá). Všechny výše zmíněné peptidázy byly v různém množství lokalizovány u všech pozorovaných skupin klíšťat. Lokalizace v průběhu prvních stádií sání (UF, 2d) byla v případě IrCB a IrCL minimální. IrCD byl u nenasátých klíšťat lokalizován ve větším množství, ale vzhledem k nižší kvalitě protilátek je pokus nutno opakovat. Čtvrtý den byl pozorován nárůst intenzity signálů všech zmíněných peptidáz. Maximální signál byl zachycen šestý den po začátku sání klíštěte na hostiteli. Intenzita signálu IrCL byla ale daleko nižší než u IrCB a IrCD.

Nežádoucí složky imunního séra, které komplikovaly a zkreslovaly výsledky lokalizace nepřímou imunofluorescencí byly odstraněny purifikací protilátek.

6. Seznam použité literatury

Agbede, R.I. and Kemp, D.H., 1985. Digestion in the cattle-tick *Boophilus microplus*: Light microscope study of the gut cells in nymphs and females. *Int. J. Parasitol.*, 15: 147-157.

Agbede, R.I. and Kemp, D.H., 1987. Ultrastructure of secretory cells in the gut of the cattle-tick *Boophilus microplus*. *Int. J. Parasitol.*, 17: 1089-1098.

Agyei, A.D., Runham, N.W., Blackstock, N., 1992. Histochemical changes in the midgut of two ixodid tick species *Boophilus microplus* a *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. *Exp. Appl. Acarol.*, 13: 187-212.

Agyei, A.D. and Runham, N.W., 1995. Studies on the morphological changes in the midguts of two ixodid tick species *Boophilus microplus* a *Rhipicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. *Int. J. Parasitol.*, 25: No.1: 55-62.

Alim, M.A., Tsuji, N., Miyoshi, T., Islam, M.K., Juany, X., Motobu, M., Fujisaki, K., 2007. Characterization of asparaginyl endopeptidase, legumain induced by blood feeding in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem Mol Biol.*, 37: 911-922.

Balashov, Yu.S., 1983. An atlas of Ixodid tick ultrastructure. Special Publication Entomological Society of Amerika.

Balashov, Yu.S., and Grigorieva, L.A., 2003. Cytological changes in the midgut of tick females of the genus *Ixodes* during and after feeding. *Doklady Biological Sciences*, 393: 527-530.

Barrett, A.J., 1979. Cathepsin D: the lysosomal aspartic proteinase. *Ciba Found. Symp.*, 75: 37-50.

Boldbaatar, D., Sikalizyo Sikasunge, C., Battsetseg B., Xuan, X, Fujisaki, K. 2006. Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 36: 25-36.

Caffrey, C.R., McKerrow, J.H., Salter, J.P., Sajid, M., 2004. Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol.*, 20: 241-248.

Camenisch, G., Tini, M., Chilov, D., Kvietikova, I., Srinivas, V., Caro, J., Spielmann, P., Wenger, R.H., Gassmann, M., 1999. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 α . *FASEB J.*, 13: 81-88.

Coons, L. B. and Alberti, G., 1999. The Acari-Ticks. Pp 267-514. In F. W. Harrison and R. Foelix (eds): *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Vol 8B, Chelicerate Arthropoda. New York: Wiley-Liss.

Dykstra, M.J., Reuss, L.E., 2004. *Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques, and Troubleshooting*. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York.

Fogaca, A.C., da Silva, P.I. Jr., Miranda, M.T., Bianchi, A.G., Miranda, A., Ribolla, P.E., Daffre, S., 1999. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.*, 274: 25330-25334.

Goldberg, D.E., 2005. Hemoglobin degradation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 295: 275-291.

Grandjean O., 1984. Blood digestion in *Ornithodoros moubata* Murray sensu stricto Walton (Ixodidea: Argasidae) females. I. Biochemical changes in the midgut lumen and ultrastructure of the midgut cell, related to intracellular digestion. *Acarologia*, 25: 147-165.

Horn, M., Zikmundová-Nussbaumerová, M., Šanda, M., Kovářová, Z., Srba, J., Franta, Z., Sojka, D., Bogyo, M., Caffrey, C.R., Kopáček, M., a Mareš, M., 2009. Hemoglobin proteolysis in blood-feeding ticks: mapping of multienzyme pathway by functional proteomics. *Chem. Biol.*, zasláno.

Jongejan, F. a Uilenberg, G., 2004. The global importance of tick. *Parasitology*, 129: S3-S14.

Konvičková, J., 2009. Dynamika aktivity trávicích enzymů klíštěte *Ixodes ricinus* v průběhu sání. SOČ (Biskupské gymnázium J.N.Neumanna, České Budějovice).

Lara, F.A., Lins, U., Paiva-Silva, G., Almeida, I.C., Braga, C.M., Miguens, F.C., Oliveira, P.L., Dansa-Petretski, M., 2003. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. *J. Exp. Biol.*, 206: 1707-1715.

Lara, F.A., Lins, U., Bechara, G.H., Oliveira, P.L., 2005. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J. Exp. Biol.*, 208: 3093-3101.

Mendiola, J., Alonso, M., Marquetti, M.C., Finlay, C., 1996. *Boophilus microplus*: multiple proteolytic activities in the midgut. *Exp. Parasitol.*, 82: 27-33.

Miyoshi, T., Tsuji, N., Islam, M.K., Huang, X., Motobu, M., Alim, M.A., Fujisaki, K., 2007. Molecular and reverse genetic characterization of serine proteinase-induced hemolysis in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *J. Insect Physiol.*, 53: 195–203.

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

Raikhel, A.S., 1983. The intestine. Pp. 59-97. In Balashov, Yu.S. (Ed.): An atlas of Ixodid tick ultrastructure. Special Publication of the Entomological Society of Amerika, English translation (In Russian, 1979).

Rawlings, N.D. and Barrett, A.J., 1994. Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol.*, 244: 461–486.

Renard, G., Garcia, J.F., Cardoso, F.C., Richter, M.F., Sakanari, J.A., Ozaki, L.S., Termignoni, C., Masuda, A., 2000. Cloning and functional expression of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 1017–1026.

Renard, G., Lara, F.A., de Cardoso, F.C., Miguens, F.C., Dansa-Petretski, M., Termignoni, C., Masuda, A., 2002. Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect Mol. Biol.*, 11: 325-328.

Sajid, M. and McKerrow, J.H., 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 120: 1-21.

Sojka, D., Hajdušek, O., Dvořák, J., Sajid, M., Franta, Z., Schneider, E.L., Craik, C.S., Vancová, M., Burešová, V., Bogyo, M., Sexton, K.B., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., Kopáček, P., 2007. IrAE – An asparaginyl endopeptidase (legumain) in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.*, 37: 713-724.

Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Hajdušek, O., Caffrey, C.R., Mareš, M., a Kopáček, P., 2008. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasit. Vectors.*, 1: 7.

Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of Tick*, Vol. 1, Oxford University Press, New York.

Tarnowski, B.I. and Coons, L.B., 1989. Ultrastructure of the midgut and blood meal digestion in the adult tick *Dermacentor variabilis*. *Exp. Appl. Acarol.*, 6: 263-289.

Zhu, Z., Gern, L., Aeschlimann, A., 1991. The peritrophic membrane of *Ixodes ricinus*. *Parasitol. Res.*, 77: 635-641.