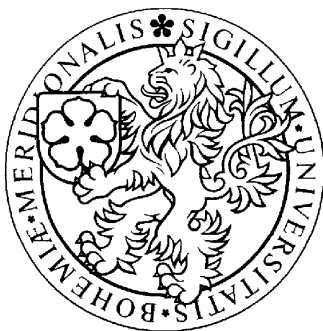


JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Přírodovědecká fakulta

Katedra medicínské biologie



Anti-chemokinové vlastnosti extraktu ze slinných žláz *Ixodes ricinus*

Diplomová práce

Bc. Eva Slepíčková

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

Školitel specialista: RNDr. Jiří Salát, PhD.

Slepičková E., 2007: Anti-chemokinové vlastnosti extraktu ze slinných žlaz *Ixodes ricinus* [Anti-chemokine properties of salivary gland extract of *Ixodes ricinus*. Mgr. Thesis, in Czech] - 48 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: Ticks are blood feeding parasites that secrete a number of immuno-modulatory factors to evade host immune response. A family of proteins – known as ‘Evasins’ – are capable of shutting off the very first steps of an immune response brought about by chemokines.

The aim of this study was to prepare a tick salivary protein with anti-chemokine activity and to observe the influence of salivary gland extract on neutrophile's chemotaxis.

Tato práce byla financována grantem GA ČR č. 590/1038

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

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

V Českých Budějovicích dne 10. 1. 2010

.....
Eva Slepičková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat školitelům doc. Janu Kopeckému, CSc. za možnost vytvořit vlastní vědeckou práci a RNDr. Jiřímu Salátovi, PhD. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, ochotu kdykoli a s čímkoli pomoci a především trpělivost, kterou mi po celou dobu vypracování této práce věnoval. Velký dík patří RNDr. Jindřichovi Chmelařovi, RNDr. Kateřině Černé, PhD. a RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc. za pomoc při přípravě a purifikaci rekombinantního proteinu. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu oddělení Imunologie parazitóz Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě děkuji rodině a kamarádům, kteří mě podporovali v mém snažení.

1. ÚVOD	6
1.1 Vztah mezi hostitelem a parazitem	6
1.2 Chemokiny	8
1.2.1 MIP-2 (CXCL2)	10
1.2.2 MIP-1 (CCL3)	10
1.3 Evasiny	11
1.4 Neutrofilý	11
2. CÍLE PRÁCE	14
3. MATERIÁL A METODY	15
3.1 Laboratorní zvířata	15
3.2 Izolace neutrofilů	15
3.3 Příprava SGE	15
3.4 Příprava slin	16
3.5 Příprava rekombinantního proteinu v bakteriálním systému	16
3.5.1. Příprava vektoru pro expresi rekombinantního proteinu anti-MIP-2	16
3.5.1.1. Restrikční reakce	18
3.5.1.2 Ligace PCR produktu do vektoru pET-19b	19
3.5.1.3 Transformace kompetentních bakterií <i>E. coli</i> kmen TOP10	19
3.5.1.4 Izolace plazmidu	20
3.5.2 Příprava rekombinantního proteinu anti-MIP-2	20
3.5.2.1 Transformace bakteriálního kmene BL21	20
3.5.2.2 Exprese rekombinantního proteinu	21
3.5.2.3 Izolace rekombinantního proteinu z bakteriální kultury	21
3.5.2.4 Purifikace rekombinantního proteinu	22
3.5.2.5 Zpětné složení rekombinantního proteinu	23
3.5.2.6 Příprava protilátek	23
3.5.2.7 Western Blotting	24
3.6 Příprava rekombinantního proteinu v eukaryotním systému	24
3.6.1 Příprava vektoru pro expresi rekombinantního proteinu anti-MIP-2	24
3.6.1.1 Restrikční reakce	26
3.6.1.2 Ligace PCR produktu do vektoru pcDNA4/TO/myc-HisA	27
3.6.1.3 Transformace kompetentních bakterií <i>E. coli</i> kmen TOP10	27
3.6.1.4 Izolace plazmidu	27
3.6.2 Příprava rekombinantního proteinu anti-MIP-2	27
3.6.2.1 Příprava buněk CHO	27

3.7 ELISA test.....	28
3.7.1 Stanovení chemokinu MIP-2.....	28
3.7.2 Stanovení chemokinu MIP-1- α	29
3.8 Chemotaktické testy a průtoková cytometrie.....	29
3.9 Použité chemikálie.....	30
3.10 Statistické zpracování.....	31
4. VÝSLEDKY.....	32
4.1 Antichemokinové vlastnosti SGE a slin.....	32
4.1.1 Inhibiční efekt SGE.....	32
4.1.2 Inhibiční efekt slin.....	33
4.2 Chemotaktické testy.....	34
4.2.1 Migrace neutrofilů v závislosti na koncentraci MIP-2.....	34
4.2.2 Migrace neutrofilů v přítomnosti SGE.....	34
4.3 Rekombinantní protein - příprava v bakteriálním expresním systému.....	35
4.3.1 Antichemokinové vlastnosti rekombinantního proteinu.....	36
4.4 Rekombinantní protein - příprava v eukaryotním expresním systému.....	37
5. DISKUZE.....	38
6. SOUHRN.....	42
7. PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK.....	43
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	45

1. ÚVOD

1.1 Vztah mezi hostitelem a parazitem

Parazité si během své evoluce vyvinuli důmyslné mechanismy, které jim umožňují ovlivňovat obranný systém hostitele. Proteiny a další molekuly syntetizované a sekretované slinnými žlázami klíšťat jsou pro tyto ektoparazity zásadní, aby mohli přijímat potravu. Proces sání trvá v případě čeledi *Ixodidae* většinou několik dní, přičemž klíště shromažďuje krev ve střevě a z něj jsou zpětně sekretovány do hostitele voda a ionty. Pro zajištění prodloužení doby sání se přirozenou součástí strategie parazita stala modulace imunitní odpovědi hostitele. Slinné žlázy produkují množství bioaktivních látek s antikoagulačními, antihemostatickými, protizánětlivými a imunosupresivními vlastnostmi, které regulují interakce mezi klíštětem a hostitelem (Ribeiro a kol. 1985). K úspěšnému sání parazita je nutné zabránit srážení krve a vzniku zánětlivé reakce. Látky obsažené v klíštěcích slinách inhibují agregaci trombocytů v místě poranění, usnadňují sání zvětšením krevního průtoku, lokálně potlačují imunitní odpověď hostitele, narušují hemostázu a také mohou usnadnit přenos nejrůznějších patogenů. Agregaci krevních destiček v místě sání zabraňují prostaglandiny (PGE_2) a apyráza (Ribeiro a kol. 1985).

Pro vývoj adaptivní imunitní odpovědi je třeba, aby byl daný patogen degradován lysozomálními proteázami na kratší peptidy a prezentován pomocí MHC molekul na povrchu antigen prezentujících buněk. V místě přichycení klíštěte vzniká zánětlivá reakce. Antigenní materiál z klíštěcích slin zachycují Langerhansovy buňky, které migrují do lymfatických uzlin, kde prezentují antigeny T-lymfocytům. T-lymfocyty rozlišujeme na T_H (pomocné) a T_C (cytotoxické) lymfocyty. T_H lymfocyty jsou podle vlastností produkovaných cytokinů rozdělovány na dvě základní subpopulace T_{H1} a T_{H2} (Mosmann a Coffman 1989). Pro T_{H1} subpopulaci je charakteristická sekrece cytokinů IL-2, IL-12, TNF- α a IFN- γ ; pro T_{H2} subpopulaci IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 a IL-13. V imunitní odpovědi hostitele na sání klíštěte se významně uplatňují T_{H1} cytokiny, které mají vliv na další lymfocyty a myeloidní buňky, chemotakticky působí na makrofágy, neutrofilů, bazofilů a eozinofilů. Tímto způsobem vzniká kožní bazofilní hypersenzitivita, což je typ oddálené přecitlivělosti (Mosmann a Coffman 1989). Dále dochází k produkci homocytotropních protilátek, které senzibilizují bazofily a žírné buňky (Christe a kol. 1998). Jako homocytotropní látky jsou označovány takové protilátky, které mají větší afinitu k Fc-receptorům buněk toho živočišného druhu, u něhož vznikly, než k Fc-

receptorům buněk jiných živočišných druhů (Rovenský 2006). Volné protilátky po kontaktu s cirkulujícími antigeny slin aktivují komplement klasickou cestou. Důležitou složkou primární imunitní reakce je také aktivace komplementu alternativní cestou, při které dochází k uvolnění anafylatoxinů. Ty jsou schopné způsobit degranulaci bazofilů, žírných buněk a tak i uvolnění v nich přítomných mediátorů, například histaminu a serotoninu. Histamin inhibuje sání a může zapříčinit až odpadnutí klíštěte (Paine a kol. 1983).

Klíšťata proto účinně modulují imunitní systém hostitele ve svůj prospěch. V jejich slinách byly objeveny proteiny vázající histamin, které blokují účinky histaminu a serotoninu uvolněných z granul bazofilů a žírných buněk (Paesen a kol. 1999). Sliny klíšťat *Ixodes dammini* (*I. scapularis*) inhibují vazbu C3b a C5b složek komplementu na povrch buněk, a tak brání aktivaci komplementu alternativní cestou (Ribeiro 1987). Navíc obsahují inhibitor hydrolýzy C3 složky komplementu a snižují tak produkci anafylatoxinu C3a, který je důležitý pro degranulaci bazofilů a žírných buněk (Ribeiro a Spielman 1986). Bylo také zjištěno, že sliny téhož druhu klíštěte potlačují funkci neutrofilů, jejich agregaci a produkci superoxidového aniontu (Ribeiro a kol. 1990). Extrakt ze slinných žláz částečně nasátých samic *Dermacentor reticulatus* snižuje aktivitu NK buněk (Kubeš a kol. 1994). NK buňky mají zásadní roli v produkci prozánětlivého cytokinu IFN- γ a vlivem jeho snížené produkce dochází k polarizaci imunitní odpovědi směrem k T_H2. Cílem strategie klíštěte je dosáhnout modulace směrem k T_H2 typu imunitní odpovědi, protože vytváří větší možnost pro jeho úspěšné sání a přežití.

Produkty slinných žláz zasahují do cytokinové kaskády, a tak ovlivňují imunitní odpověď organismu (Hajnická a kol. 2005). Extrakt ze slinných žláz klíštěte *Dermacentor andersoni* suprimuje produkci IL-1, TNF- α , IL-2 a IFN- γ (Ramachandra a kol. 1992). Dále bylo dokázáno, že extrakty ze slinných žláz různých ixodidních klíšťat (*Dermacentor reticulatus*, *Amblyomma variegatum*, *Ixodes ricinus*) snižují množství IL-8 prostřednictvím vazby molekuly obsažené ve slinách na tento cytokin (Hajnická a kol. 2001). Extrakt ze slinných žláz ovlivňuje množství detekovaného prozánětlivého cytokinu MIP-2, funkčního homologu IL-8, což bylo popsáno v mé bakalářské práci (Slepičková 2007).

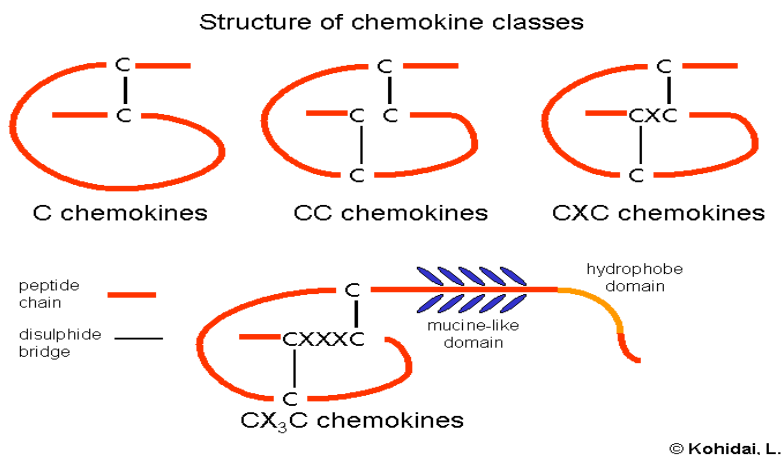
Potlačení zánětlivé reakce spolu s produkcí imunomodulačních molekul významně usnadňuje přenos patogenů, způsobujících vážná onemocnění člověka jako jsou borelióza, babesióza, theilerióza, klíšťová encefalitida, Q horečka a pod. Tento jev byl nazván slinami aktivovaný přenos - SAT (saliva activated transmission). SAT není typický jen pro klíšťata, ale i

další krev sající vektory. Imunosuprese v místě sání umožňuje patogenu snadno kolonizovat nového hostitele a zároveň klíštěti zvyšuje objem nasáté krve. Průvodním jevem slinami aktivovaného přenosu je produkce T_H2 cytokinů za současné suprese T_H1 cytokinové odpovědi.

V nedávné době byla objevena u klíštěte *Rhipicephalus sanguineus* skupina proteinů, označována jako Evasiny, která je schopna omezovat prvotní kroky nespecifické imunity zajišťované prostřednictvím chemokinů (Frauenschuah a kol. 2007, Gerritsen 2008).

1.2 Chemokiny

Chemokiny jsou malé peptidy s molekulovou hmotností 8-10 kDa, které mají schopnost aktivovat a chemicky přitahovat subpopulace leukocytů. Podle primární struktury je dělíme na α -chemokiny, které ovlivňují zejména neutrofilů, T-lymfocyty a na β -chemokiny, působící preferenčně na monocyty, eosinofily a bazofily. Chemokiny se podle polohy prvních dvou spárovaných vysoce konzervovaných cysteinů sekvence aminokyselin dělí na 4 skupiny (obr.1): CXC, CC, CX₃C, a C (Kopydlowski a kol. 1999, Murdoch a Finn 2000). Tyto cysteiny mezi sebou interagují prostřednictvím disulfidických můstků a udávají terciární strukturu chemokinu. Struktura, kterou vytváří, se označuje jako tzv. řecký klíč. První dva cysteiny jsou situovány v blízkosti N-konce proteinu, třetí cystein uvnitř molekuly a čtvrtý má polohu na C-konci proteinu. Prozánětlivé chemotaktické cytokiny působí chemoatrakci různých typů leukocytů, zajišťují migraci buněk do místa infekce, stimulují expresi leukocytárních β_2 integrinů, zvyšují tvorbu leukotrienů a také adhezi neutrofilů k endotelii. Homeostatické chemokiny se podílí na vývoji a tvorbě buněk.



Obr.1: Struktura chemokinů

Působení chemokinů je řízeno pomocí receptorů spojených s G-proteiny. Dosud analyzované receptory spřažené s G-proteiny mají podobnou strukturu tvořenou jediným polypeptidovým řetězcem o přibližně 350 aminokyselinách, který sedmkrát prostupuje buněčnou membránou tam a zpět. N-konec je krátký, nachází se v extracelulárním prostoru a obsahuje N-vazná místa glykosylace. Intracelulární C-konec obsahuje zbytky serinů a threoninů, které fungují jako místa fosforylace pro regulaci receptoru. Mezi první a druhou extracelulární smyčkou se nachází disulfidický můstek mezi vysoce konzervovanými cysteiny. Skupina α -chemokinů sdružuje peptidy s aminokyselinovou strukturou CXC (MIP-2, IL-8, PF-4, GRO, NAP-2, ENA-78 a další). Pro skupinu CXC existuje celkem 5 receptorů, označují se zkratkami CXCR1 - CXCR5. Jako β -chemokiny označujeme peptidy s aminokyselinovou strukturou CC (např. MIP-1, MIP-4, RANTES, eotaxin). Pro tuto skupinu je charakteristických 9 receptorů, které se označují zkratkami CCR1 - CCR9 (Murdoch a Finn 2000).

Pokud se ligand naváže na příslušný receptor dojde k transdukcí signálu a konformační změně G-proteinu, který je tvořen podjednotkami α , β a γ . Podjednotka α uvolní GDP a nahradí ho GTP. To způsobí rozdělení proteinu na α podjednotku s navázaným GTP a samostatný komplex $\beta\gamma$. Obě tyto části mohou přímo interagovat s cíli v plazmatické membráně, a tak předávat signál k dalším místům určení. Takto se aktivuje enzym fosfolipáza C, která štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát na inositol-1,4,5-trifosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG). Tyto dvě molekuly fungují jako tzv. sekundární posílčci (Alberts a kol. 1998, Hořejší a Bartůňková 2005, Murdoch a Finn 2000).

IP_3 difunduje cytolem k endoplazmatickému retikulu, kde po navázání otvírá Ca^{2+} kanály. Vápenaté ionty proudí do cytosolu po spádu elektrochemického potenciálu. DAG zůstává součástí membrány a působí ve spojení s vápenatými ionty na aktivaci proteinkináz. Aktivovaná kináza začne fosforylovat intracelulární substráty. Fosforylací pozměněné intracelulární proteiny mohou přímo nebo zprostředkovaně ovlivňovat transkripci genů, stavbu cytoskeletu, chemotaxi, degranulaci a sekreci superoxidových aniontů (Alberts a kol. 1998).

Po určité době je GTP vázaný na α podjednotku hydrolyzován na GDP, komplex α podjednotky s GDP se odpoutá od enzymu, spojí se opět s dimerem $\beta\gamma$ a receptorem, a tak se obnoví původní stav (Murdoch a Finn 2000).

1.2.1 MIP-2 (CXCL2)

MIP-2 je bazický protein o přibližné molekulové hmotnosti 8 kDa. Je to myší funkční homolog interleukinu-8. Podobně jako IL-8 patří do rodiny α -chemokinů a má identické účinky v aktivaci neutrofilních granulocytů. Poprvé byl izolován z myší buněčné linie RAW 264.7 stimulované lipopolysacharidem (Wolpe a kol. 1989). Jeho produkce významně stoupá za účasti cytokinů IL-1 a TNF- α (Dunlevy a Couchman 1995).

Ačkoli experimenty na buněčných kulturách odhalily mnoho typů buněk schopných produkovat MIP-2, buněčné zdroje *in vivo* nejsou jasně definovány (Matzer a kol. 2001). Autor studoval expresi mRNA tohoto cytokinu v tkáních normálních myší a infikovaných bakterií *Yersinia enterocolitica*. Výsledky prokázaly podstatnou expresi MIP-2 mRNA v kostní dřeni normálních myší, ale nikoli v dalších orgánech (slezina, plíce, játra). Bakteriální infekce způsobila pětinasobný nárůst v počtu MIP-2 pozitivních polymorfonukleárů, které se shromáždily ve slezině a byla provázena silnou produkcí slezinné MIP-2 mRNA. Zároveň trojnásobně poklesl počet buněk produkujících MIP-2 v kostní dřeni.

Jako buněčný zdroj MIP-2 jsou uváděny makrofágy, epiteliální buňky, kostní dřev, endoteliální buňky, astrocyty a žírné buňky. Rekombinantní MIP-2 působí chemotakticky na myší i lidské neutrofile, zároveň zvyšuje expresi adhezivních molekul Mac-1 na povrchu buněk (Jerva a kol. 1997).

MIP-2 se váže na lidské i myší neutrofile. Vazba na lidský receptor IL-8 RA (CXCR1) je téměř zanedbatelná. Vysokou afinitu však vykazuje při vazbě na lidský receptor IL-8 RB (CXCR2) a myší homolog tohoto receptoru (Jerva a kol. 1997).

1.2.2 MIP-1 (CCL3)

MIP-1- α je kyselý protein, který má podobnou molekulovou hmotnost jako MIP-2, celkem se skládá z 69 aminokyselin (Wolpe 1989) a společně s MIP-1- β je sekretován jako heterodimer (Guan a kol. 2001). Tento chemokin produkuje široké spektrum buněk, především makrofágy, lymfocyty, žírné buňky, bazofily, epiteliální buňky a fibroblasty (Ramos a kol. 2005). Jeho funkce spočívá především v indukci tvorby dalších prozánětlivých cytokinů, působí jako endogenní pyrogen (Wolpe 1989) a je schopný chemotaxe myších neutrofilů *in vitro* (Gao a kol. 1997), což pro představitele β -chemokinů není obvyklé. Jeho sekundární a terciární struktura je podobná CXCL8 (IL-8), se kterým sdílí částečnou sekvenční homologii (Clements a kol. 1992).

MIP-1- α je ligandem pro receptory CCR1 a CCR5 (Murdoch 2000). Receptor CCR1 se v 33% shoduje se strukturou receptoru CXCR2, který váže MIP-2 a IL-8 (Murdoch 2000).

1.3 Evasiny

Evasiny jsou rodina malých proteinů, které mají schopnost vázat chemokiny. Tímto způsobem omezují prvotní kroky imunitní odpovědi hostitele, současně mají silný protizánětlivý účinek (Déruaz a kol. 2008). Tyto chemokiny vázající proteiny byly izolovány z klíštěte *Rhipicephalus sanguineus* (Frauensuh a kol. 2007). Do současné doby jsou známy celkem čtyři zástupci.

Evasin-1 je tvořen 94 aminokyselinami, je vysoce specifický pro skupinu CC chemokinů. Frauenschuh a kol. (2007) prokázal vazbu tohoto evasinu pouze na chemokiny CCL3, CCL4 a CCL18, u dalších devíti CC, devíti CXC, stejně jako u XCL1 a CX3CL1 chemokinů vazba nebyla zaznamenána. Tento protein inhibuje migraci leukocytů v přítomnosti chemokinů *in vitro* i *in vivo* (Déruaz a kol. 2008).

Evasin-2 má obdobnou velikost jako Evasin-1, jeho ligand zůstává zatím neznámý.

Evasin-3 tvoří 66 aminokyselin a je vysoce selektivní - váže se pouze na CXCL1, CXCL8 a jejich myší protějšky KC a MIP-2. Podobně jako Evasin-1 má protizánětlivé vlastnosti, inhibuje chemotaxi neutrofilů *in vitro* (Déruaz a kol. 2008).

Evasin-4 je protein skládající se ze 110 aminokyselin, jeho ligandem jsou CC chemokiny CCL5 a CCL11.

Podobné chemokiny vázající proteiny nebyly zatím v případě klíštěte *Ixodes ricinus* popsány.

1.4 Neutrofilly

Neutrofilní granulocyty (polymorfonukleáry) tvoří 60 - 70% celkového počtu bílých krevních buněk u člověka (u myši je to přibližně 20 - 30%). Jedná se o základní buňky nespecifické imunity a hlavní buňky zánětlivé reakce. Mají segmentované jádro a v jejich cytoplazmě se vyskytuje velké množství granul obsahujících lytické a baktericidní enzymy. Neutrofilly vznikají z pluripotentní kmenové buňky v kostní dřeni. Samostatné buňky kostní dřene produkují specifické stimulační faktory jako jsou faktor stimulující proliferaci granulocytů (G-CSF), faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF) a interleukin 3 (IL-3). Tyto

faktory podporují proliferaci a diferenciaci jednotlivých vývojových stádií neutrofilů. Zralé buňky zůstávají v kostní dřeni po dobu asi 5 dní, následně cirkulují přibližně 10 hodin v krevním řečišti (Stites a Terr 1994). Narozdíl od eosinofilních granulocytů se neutrofilů prakticky nevyskytují v tkáních a pronikají do nich až po vzniku zánětu. Periferních neutrofilů je asi 7% z celkového množství, zbývajících 93% je v kostní dřeni, odkud se průběžně vyplavují, takže se v oběhu udržuje stálé množství (Hořejší a Bartůňková 2005). V periferní krvi existují dva zdroje neutrofilů. Jedná se o centrální fond cirkulující v axiálním proudu krevního řečiště a marginální proud, který se pohybuje pomalým pohybem podél endotelu (Stites a Terr 1994).

Jejich význam spočívá především ve schopnosti chemotaxe a fagocytózy - jako první migrují do místa zánětlivé reakce, účastní se likvidace patogenu a jsou součástí hnisu. Společně s eosinofilními granulocyty, monocyty a makrofágy je označujeme jako profesionální fagocyty. V místě zánětu adherují k vaskulárním endoteliím pomocí receptorů, poté dochází k řízenému přesunu neutrofilů do extravaskulárního prostoru, kde fagocytují invadující mikroorganismy (Hořejší a Bartůňková 2005).

Neutrofilů se zachycují na povrchu endoteliálních buněk, kde se pod vlivem zánětlivých cytokinů exprimují adhezivní molekuly. Jako první se projeví interakce mezi selektiny a sacharidovými strukturami na povrchu neutrofilů (zejména oligosacharidem zvaným sialyl-Lewis^x antigen). Tato prvotní reverzibilní adhezivní interakce, tzv. rolling (kutálení), pohyb neutrofilů zpomalí. Pokud je přítomen v okolí zánětlivý signál (např. cytokin nebo chemokin) dochází v další fázi k vazbě povrchových adhezních molekul neutrofilů, tzv. β_2 integrinů (LFA-1, Mac-1) na povrchový glykoprotein endoteliálních buněk ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1; CD54). Tato vazba je již ireverzibilní a způsobí průnik neutrofilů do místa zánětlivé reakce ve tkáni (Hořejší a Bartůňková 2005). Do místa zánětu fagocyty směřují různé chemotaktické faktory. Hlavní chemotaktickou látkou pro neutrofilů je cytokin (chemokin) IL-8 (Klener a spolupracovníci 1997), v případě myších neutrofilů MIP-2.

Během fagocytózy dochází k výraznému vzestupu v oxidativním metabolismu. Tato reakce se označuje jako tzv. respirační (oxidativní) vzplanutí, které je zprostředkováno aktivací NADPH oxidázy. Ta katalyzuje reakci, při níž NADPH reaguje s kyslíkem za vzniku NADP⁺ a superoxidového radikálu (O₂⁻). Z něj pak dalšími reakcemi vzniká tzv. singletový kyslík, peroxid vodíku a hydroxylový radikál. Reaktivní kyslíkové radikály (ROI) jsou oxidačními činidly, které mají negativní vliv na struktury biopolymerů mikroorganismů, narušují aktivitu jejich enzymů a

poškozují DNA (Hořejší a Bartůňková 2005). Polymorfonukleáry produkují i řadu cytokinových mediátorů a kolonie stimulujících faktorů, včetně IL-1, IL-3, IL-6, IL-12, TNF (Matzer a kol. 2001) a G-CSF.

Testy chemotaxe se zjišťuje schopnost leukocytů reagovat na chemotaktické látky cíleným pohybem ve směru gradientu chemotaktického agens. Tímto agens mohou být C5a složka komplementu, formylované peptidy, leukotrien B₄, chemokiny (např. MCP-1-5, MIP-1, MIP-3, RANTES, IL-8, PF4 aj.) a jiné cytokiny (např. IL-1, IL-6, TNF α), bakteriální substance a produkty buněčného rozpadu nebo denaturované proteiny. Schopnost leukocytů reagovat na chemotaktické podněty je zásadní pro jejich uplatnění v zánětlivé reakci, která provází poškození tkání. Nejběžnější varianty chemotaktických testů jsou chemotaxe z kapiláry, chemotaxe pod agarózou a chemotaxe přes membránu (Šestáková a John 1986).

2. CÍLE PRÁCE

- testování antichemokinových vlastností SGE *Ixodes ricinus*
- zvládnutí metodiky chemotaktických testů
- testování inhibice chemotaxe pomocí SGE *Ixodes ricinus*
- příprava rekombinantního proteinu s anti-MIP-2 aktivitou (testování jeho anti-chemokinových vlastností)

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Laboratorní zvířata

V práci byly použity inbrední myši kmene C57BL/6J (Anlab, Česká republika) a klíšťata *Ixodes ricinus* (chov Parazitologický ústav, AVČR, České Budějovice). Myši byly chovány ve standardních podmínkách při teplotě 22°C a 65 % vlhkosti vzduchu. Standardní granulovaná strava a voda byly k dispozici *ad libitum*.

3.2 Izolace neutrofilů

Neutrofilní granulocyty byly získány indukci 2 ml 3% thioglykolátového média (Difco) i.p.. Po uplynutí indukční doby (5 hodin) byla myš uspána diethyletherem, vykvrvena a následně usmrcena zlomením vazů. Buňky peritoneálního náplavu byly získány postupným výplachem peritoneální dutiny myši vychlazeným PBS o objemu 20 ml.

Buňky byly neustále chlazeny, aby neadherovaly na stěny zkumavky. Suspenze byla dvakrát promyta roztokem PBS - 20 minut, 1250 RPM, 4°C. Pelet byl následně resuspendován v 1 ml PBS, neutrofilny byly spočítány v Bürkerově komůrce a do pokusu naředěny v příslušné koncentraci. Čistota suspenze buněk byla určena pomocí průtokové cytometrie - neutrofilny tvořily 90 - 95% .

3.3 Příprava SGE

Slinné žlázy byly vypreparovány ze 3 dny sajících samic *Ixodes ricinus*. Z vypitvaných žláz uchovaných ve zkumavce s 1ml PBS byl připraven homogenát sonikací na ultrazvukovém homogenizátoru po dobu 30 sekund a amplitudě 4 μ m. Ke každému SGE byl přidán inhibitor proteáz (Protease inhibitor cocktail, Sigma) ředěný 1:500. Vzniklá suspenze byla centrifugována při 14000 RPM a 4°C po dobu 30 minut pro odstranění nerozpustné frakce. Poté byl extrakt přefiltrován a následně byla stanovena koncentrace proteinu v supernatantu (Bradford 1976). Extrakty ze slinných žláz se uchovávají zamražené při -70°C.

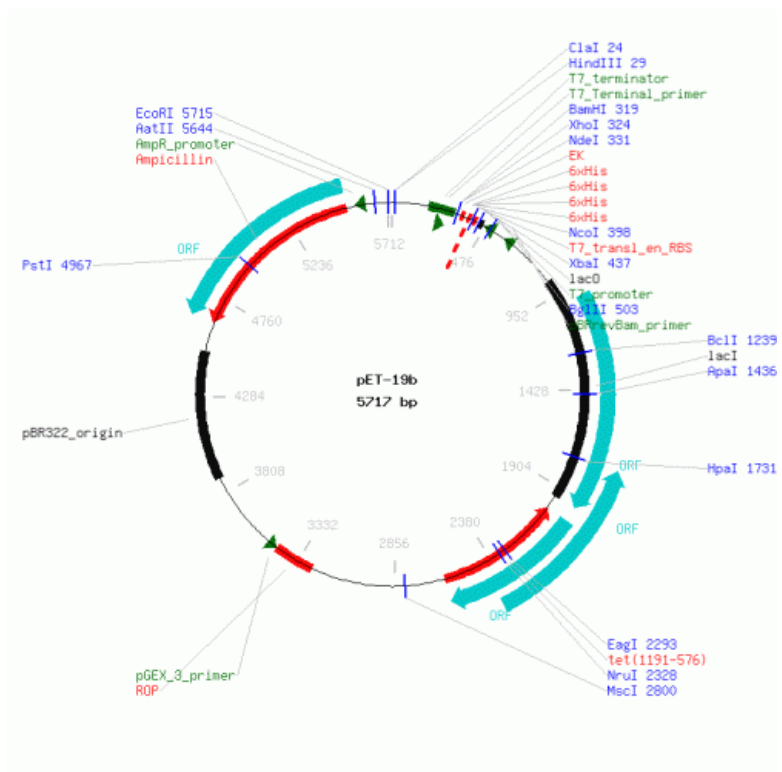
3.4 Příprava slin

Sliny byly připraveny ze samic *Ixodes ricinus*, které sály 3-5 dní. Klíšťata byla fixována na podložní sklička. Produkce slin do mikrokapilár (Sigma) nasazených na hypostom byla indukována aplikací roztoku pilocarpinu v alkoholu (50 mg/ml) na hřbetní stranu klíšťat a inkubací v termostatu při 37°C. Sliny byly získány po 3 hodinách vyprázdněním mikrokapilár. Poté byla stanovena koncentrace proteinu ve vzorku (Bradford 1976). Sliny se uchovávají zamražené při -70°C.

3.5 Příprava rekombinantního proteinu v bakteriálním systému

3.5.1. Příprava vektoru pro expresi rekombinantního proteinu anti-MIP-2

Specifické expresní primery byly navrženy manuálně podle vybrané sekvence genu získané z cDNA knihovny (Chmelař a kol. 2008) připravené ze slinných žláz 4 dny sajících samic *Ixodes ricinus* tak, aby zaklonovaný gen byl přepisován bez signální sekvence a ve správném čtecím rámci. Součástí primeru byla i palindromická sekvence, která u amplifikovaného produktu PCR reakce umožňovala štěpení specifickými restrikcími endonukleázami. Pro zaklonování byl použit vektor pET-19b (Novagen). Při translaci je syntetizována tzv. histidinová kotva (6xHis) na C-konci rekombinantního proteinu, která umožňuje následnou purifikaci proteinu na koloně obsahující nikelnaté ionty. Plazmid obsahuje T7 promotor, který umožňuje účinné řízení transkripce exprimovaných genů. Nese také rezistenci na ampicilin, díky čemuž je možné provést selekci bakterií *E. coli*, které plazmid neobsahují. Použitými restrikcími enzymy byly NdeI a XhoI (Fermentas).



Obr. 2: Plazmidový vektor pET-19b (Novagen)

Expresní primery:

anti-MIP-2 (NdeI) - fwd: **5'- ATC ATA TGC TCA ATG GGA TGG TAC -3'**

anti-MIP-2 (XhoI) - rev: **5'- ATC TCG AGT TAG TTG GAG TTC AAG ATT AGT TC -3'**

PCR reakce - složení reakční směsi:

2x PCR master mix (Fermentas)	25 µl
100 µM anti-MIP-2 pET19 (Generi Biotech).....	5 µl
100 µM anti-MIP-2 pET19 (Generi Biotech).....	5 µl
cDNA	1,5 µl
dH ₂ O (Fermentas)	13,5 µl

PCR reakce byla provedena v cycleru (Applied biosystems) následujícím programem:

1. denaturace: 93 °C, 5 minut
2. denaturace: 93 °C, 20 sekund
3. annealing: 58 °C, 30 sekund

4. extenze: 72 °C, 1 minuta

5. extenze: 72 °C, 7 minut (závěrečná extenze po proběhnutí všech cyklů)

35 cyklů

Výsledek reakce byl zkontrolován při elektroforéze v 1% agarózovém gelu (1% agaróza v TAE pufru) obsahujícím ethidium bromid 10 mg/ml (1 μ l na 100 ml gelu), kde 50 μ l PCR reakce bylo smícháno s 10 μ l 6x Loading Dye Solution (Fermentas). Pod UV světlem byla určena velikost produktu porovnáním se standardem GeneRuler™ 100bp DNA ladder (Fermentas) a poté byl produkt vyříznut z gelu a přečištěn. PCR produkt byl purifikován z gelu pomocí kitu JETquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed). Výsledkem byla přečištěná DNA, která byla eluována do 30 μ l dH₂O.

3.5.1.1. Restrikční reakce

Restrikční reakce - složení reakční směsi:

10x Tango pufr (Fermentas) 8 μ l
PCR produkt..... 20 μ l
NdeI - 10u/ μ l (Fermentas) 1 μ l
XhoI - 10u/ μ l (Fermentas) 1 μ l
dH₂O (Fermentas) 10 μ l

10x Tango pufr (Fermentas) 8 μ l
plazmid pET-19b (Novagen) 1 μ l
NdeI - 10u/ μ l (Fermentas) 1 μ l
XhoI - 10u/ μ l (Fermentas) 1 μ l
dH₂O (Fermentas) 30 μ l

Směs byla inkubována 2 hodiny při 37 °C, poté byly enzymy v reakci inaktivovány 10 minut při 70 °C na tepelném bloku. PCR produkt po restrikci byl přečištěn kitem JETquick PCR Purification Kit (Genomed). Restrikce plazmidu byla zkontrolována v 1% TAE agarózovém gelu obsahujícím ethidium bromid, kde 5 μ l plazmidu bylo smícháno s 1 μ l 6x Loading Dye Solution

(Fermentas). Plazmid byl purifikován z gelu pomocí kitu JETquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed). Výsledkem byla přečištěná DNA, která byla eluována do 40 μ l dH₂O.

3.5.1.2 Ligace PCR produktu do vektoru pET-19b

Ligační reakce - složení reakční směsi:

10x ligační pufr (Fermentas) 2 μ l
plazmid pET-19b 3,75 μ l
PCR produkt 10 μ l
T4 DNA ligáza - 5u/ μ l (Fermentas) 1 μ l
dH₂O (Fermentas) 3,25 μ l

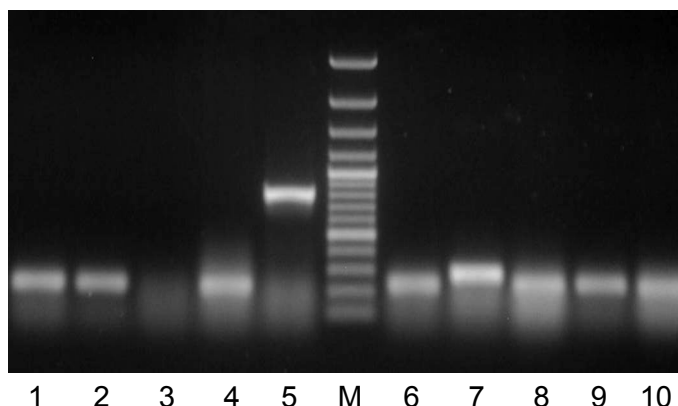
Ligační reakce probíhala přes noc při laboratorní teplotě, druhý den byla směs inaktivována 10 minut při 65°C a část byla použita při transformaci.

3.5.1.3 Transformace kompetentních bakterií *E. coli* kmen TOP10

Kompetentní bakterie *E.coli* OneShot®TOP10 (Invitrogen) byly transformovány následujícím způsobem. K 50 μ l kompetentních buněk OneShot®TOP10 (Invitrogen) bylo přidáno 5 μ l ligační směsi. Buňky byly s ligační reakcí opatrně promíchány a směs byla ponechána 30 minut na ledu. Následně byly bakterie vystaveny teplotnímu šoku při 42 °C po dobu 40 sekund a ihned zchlazeny 2 minuty na ledu. Poté bylo k bakteriální suspenzi přidáno 200 μ l SOC média (Invitrogen) a bakterie byly kultivovány 1,5 hodiny při 37 °C/230 RPM. Pro získání jednotlivých klonů byla tato bakteriální kultura vyseta na agar obsahující LB médium a ampicilin (50 μ g/ml). Kultura byla rozetřena a ponechána přes noc při 37 °C v termostatu. Z narostlých (nesoucích vektor pET-19b) kolonií bylo náhodně vybráno větší množství klonů, které byly dále přeočkovány na novou plotnu a otestovány na přítomnost insertu za použití vektorového T7 primeru. Pozitivní kolonie byly přeočkovány do 4 ml LB média s ampicilinem (50 μ g/ml) a kultivovány přes noc při 37 °C/230 RPM.

T7 fwd: 5' - TAA TAC GAC TAC CTA TAG GG -3'

T7 rev: 5' - TAG TAA TTG CTC AGC GGT GG -3'



Obr. 3: Kontrola transformace vektoru se zaklonovaným genem anti-MIP-2 (1-10 = testované kolonie, M = marker)

3.5.1.4 Izolace plazmidu

Z narostlých kultur byly izolovány plazmidy pomocí kitu JET Quick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed) podle příloženého návodu. Plazmidová DNA byla eluována do 50 μ l dH₂O a spektrofotometricky byla určena její koncentrace (Biophotometer 1.2., Eppendorf). Izolovaný plazmid se zaklonovaným genem pro anti-MIP-2 byl uchováván při -20 °C. Přítomnost zaklonovaného genu byla ověřena sekvenováním (ABI PRISM 3130xl) v sekvenační laboratoři.

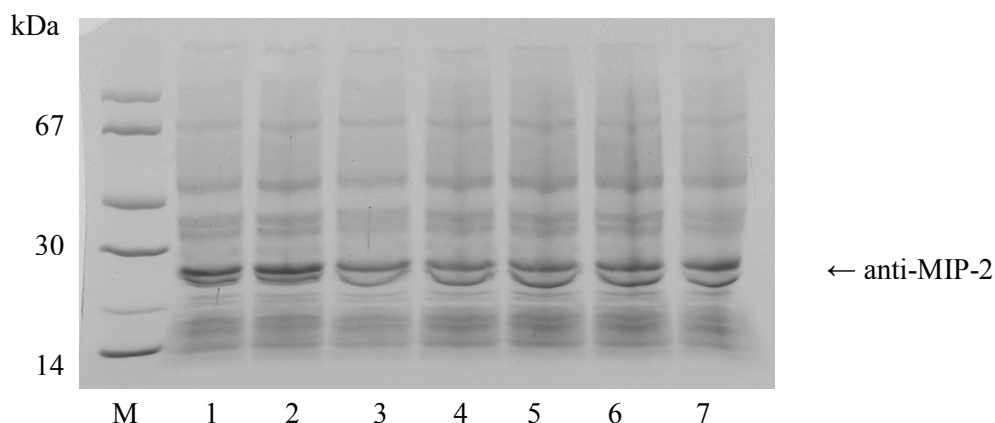
3.5.2 Příprava rekombinantního proteinu anti-MIP-2

3.5.2.1 Transformace bakteriálního kmene BL21

Přečištěný expresní plazmid byl transformován do expresních buněk *E. coli* BL21pLysS (Novagen). Alikvót buněk (200 μ l) byl rozmražen na ledu a následně k němu byl přidán 1 μ l plazmidu, směs byla opatrně promíchána a ponechána 30 minut na ledu. Následně byly bakterie vystaveny teplotnímu šoku při 42 °C po dobu 40 sekund a ihned zchlazeny 2 minuty na ledu. Poté bylo k bakteriální suspenzi přidáno 200 μ l SOC média a bakterie byly kultivovány 1,5 hodiny při 37°C/230 RPM. Část narostlé kultury (50 μ l) byla rozetřena na plotnu s agarem obsahující LB médium, ampicilin (50 μ g/ml) a chloramfenikol (50 μ g/ml); zbylá část byla převedena do 10 ml LB média s ampicilinem (50 μ g/ml) a chloramfenikolem (34 μ g/ml), která byla kultivována přes noc při 37°C/230 RPM. Z této bakteriální kultury obsahující expresní plazmid byly následně připraveny glycerol roztoky (850 μ l bakteriální kultury se 150 μ l glycerolu), které byly zamraženy v tekutém dusíku a uchovány při -80°C.

3.5.2.2 *Expresa rekombinantního proteinu*

Do 10 ml LB média s ampicilinem (50 µg/ml) a chloramfenikolem (34 µg/ml) byla převedena pipetovací špičkou trocha bakteriální kultury z glycerolového roztoku buněk připravených podle výše uvedeného postupu a kultivována za stejných podmínek přes noc. Narostlá kultura byla druhý den přenesena do 200 ml LB média s ampicilinem (50 µg/ml) a chloramfenikolem (34 µg/ml) a byla dále kultivována 2 hodiny při 37 °C/230 RPM než optická densita vzorku dosáhla hodnoty 0,6. Potom bylo přidáno IPTG (1mM) a kultura se nechala dalších 7 hodin růst při 37 °C za kontinuálního třepání. Z kultury byly odebírány vzorky po 1, 2, 3, 4, 5 a 7 hodinách, kdy docházelo k expresi rekombinantního proteinu (Obr. 4).



Obr. 4 : Pilotní exprese rekombinantního proteinu anti-MIP-2 (M = marker, 1-7 = časové intervaly odběru)

3.5.2.3 *Izolace rekombinantního proteinu z bakteriální kultury*

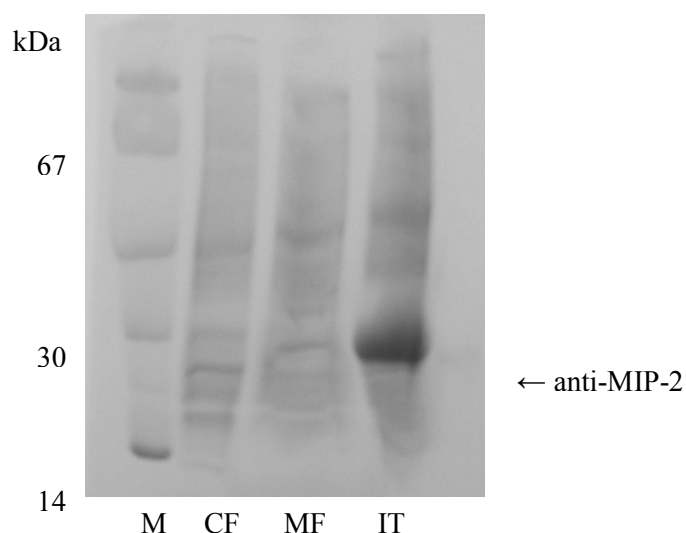
Bakterie byly získány z média centrifugací v 50ml centrifugačních zkumavkách (8500 RPM, 20 minut, 4°C). Supernatant byl odstraněn, pelet obsahující bakterie rozpuštěn v 10 ml resuspendačního pufru. Bakteriální stěna byla rozrušena sonikací ultrazvukem (3 x 20 s) v sonikátoru (Hielscher) za použití střední amplitudy. Suspenze byla poté centrifugována (10000 RPM, 15 minut, 4°C). Supernatant obsahující cytoplazmatické proteiny byl uchován pro kontrolu při -20°C. Pelet byl rozpuštěn v 20 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. Přechišťování v izolačním pufru bylo opakováno dvakrát.

Pelet byl rozpuštěn v 10 ml solubilizačního pufru s přídavkem DTT (10mM) mícháním v kádince při laboratorní teplotě 1 hodinu. V tomto kroku byla rozrušena inkluzní tělíska obsahující

exprimovaný rekombinantní protein. Suspenze byla poté opět centrifugována (10000 RPM, 15 minut, 4°C).

Analýza jednotlivých frakcí (cytosolické, membránové a inkluzních tělísek) byla provedena pomocí polyakrylamidové elektroforézy (SDS-PAGE) - viz. Obr. 5. SDS-PAGE elektroforéza byla provedena v gradientovém gelu (5-17%) při konstantním napětí 200 V. Vzorky byly před elektroforézou smíchány s vzorkovým redukujícím pufrům v poměru 4:1 a denaturovány 3 minuty při 100°C. Jako marker molekulových hmotností byl použit proteinový standard LMW Electrophoresis Calibration Kit (Amersham).

Po ukončení elektroforézy byl gel barven 40 minut v Coomassie brilliant blue R250 a odbarvován přes noc v odbarvovacím roztoku.

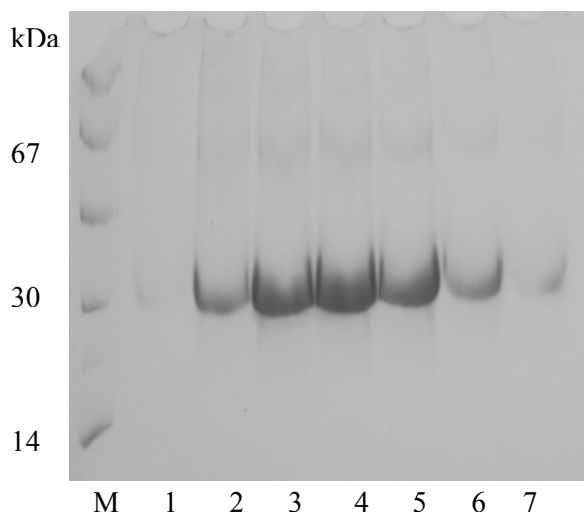


Obr. 5: Izolace rekombinantního proteinu anti-MIP-2 z bakteriální kultury (M = marker, CF = cytosolická frakce, MF = membránová frakce, IT = inkluzní tělíška)

3.5.2.4 Purifikace rekombinantního proteinu

Pro purifikaci rekombinantního anti-MIP-2 proteinu byla použita chromatografie na chelatační Ni^{2+} koloně v denaturačním prostředí 8 M močoviny. Vzorek z inkluzních tělísek byl pro purifikaci připraven centrifugací (10000 RPM, 10 min, 4°C) a filtrací přes 0,22 μm membránový filtr Millex GP (Millipore). Kolona byla ekvilibrována pufrům A (8 M urea, 10 mM Tris/HCl, pH 8), poté byl nanesen vzorek a navázané proteiny byly z kolony eluovány gradientem imidazolu (0-0,5M) v pufru B. Podle chromatogramu byly určeny frakce s nejvyšším obsahem proteinu. Tyto frakce byly opět zkontrolovány na gelu pomocí metody SDS-PAGE,

obarvením v Coomasie blue a následným odbarvením (Obr. 6). Protein obsažený ve vybraných frakcích byl zahuštěn na koloně pro separaci proteinů (Amicon Ultra-15, 10NMWL, Millipore) na výsledný objem 2 ml.



Obr. 6: Testování jednotlivých frakcí purifikovaných na chelatační koloně na přítomnost proteinu anti-MIP-2 (M = marker, 1 - 7 = testované frakce)

3.5.2.5 Zpětné složení rekombinantního proteinu

Zahuštěný anti-MIP-2 protein byl postupně rozkapán do 400 ml refoldovacího pufru (0,05M TRIS, 0,25 L-arginin, pH 8) za intenzivního míchání. Takto byl ponechán přes noc v chladové místnosti.

Následující den byl protein nejprve přefiltrován přes filtrační papír, poté přes Steritop (Millipore) a následně byl zakoncentrován v míchací cele (Millipore) na konečný objem 6 ml. Takto připravený protein byl dialyzován přes noc proti pufru (20 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 8) a dále zakoncentrován centrifugací na koloně (Amicon Ultra-15, 10NMWL, Millipore) na výsledný objem 800 μ l.

Poté byla stanovena koncentrace proteinu ve vzorku (Bradford 1976) - 1280 μ g/ml .

3.5.2.6 Příprava protilátek

Z králíka bylo nejprve odebráno preimunní sérum. Poté byl imunizován roztokem 0,5 ml anti-MIP-2 proteinu (100 μ g/ml) s 0,5 ml nekompletního Freundovo adjuvans. Imunizace byla prováděna jednou týdně po dobu celkem pěti týdnů.

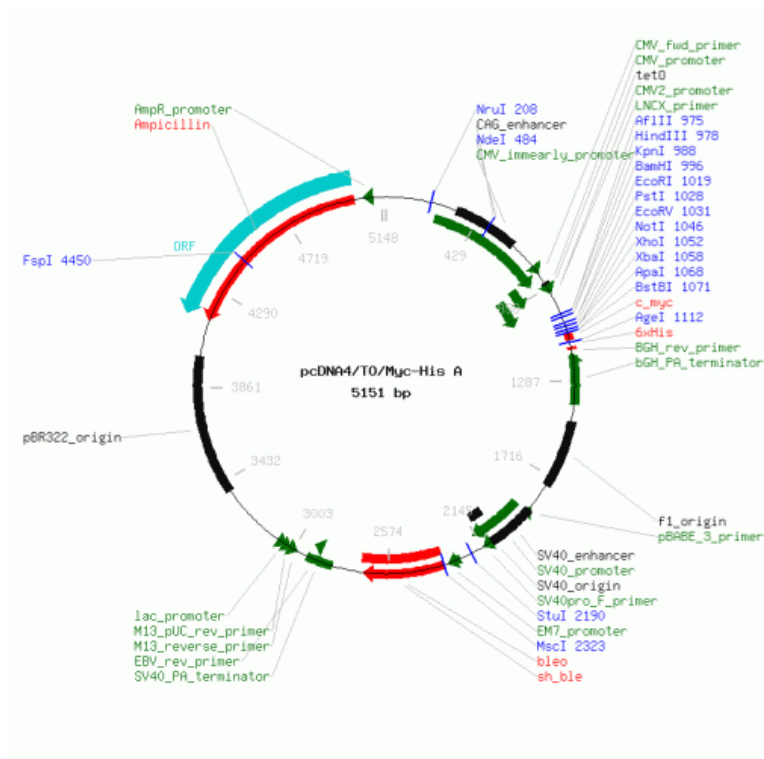
3.5.2.7 Western Blotting

Vzorky rozdělené na klasické SDS-PAGE byly přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Přenos trval 90 minut při 150 mA. Poté byl oddělen marker, obarven v 0,1% amidočerni, promyt v deionizované vodě a dále ponechán v odbarvovacím roztoku přes noc za stálého třepání. Membrána byla přes noc blokována v 5% roztoku sušeného odtučněného mléka ve vodě. Následující den byla membrána 3-krát promyta v PBS/Tween, poté inkubována 1 hodinu v primární protilátce (anti-MIP-2 imunní sérum, 1:100 v PBS/Tween, Anti-His 1:1000 v PBS/Tween) a 45 minut v sekundární protilátce SwAM/Px (Sevac, 1:1000 v PBS/Tween). Mezi všemi kroky byla membrána důkladně promyta v PBS/Tween (3-krát 5 minut). Barevná reakce byla vyvolána pomocí 3,3'-diaminobenzidinu (10 mg DAB, rozpuštěno v 30 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5), který se během reakce peroxidázy s H₂O₂ oxiduje a barví se do hněda. Reakce byla zastavena přemístěním membrány do destilované vody.

3.6 Příprava rekombinantního proteinu v eukaryotním systému

3.6.1 Příprava vektoru pro expresi rekombinantního proteinu anti-MIP-2

Specifické expresní primery byly navrženy manuálně podle vybrané sekvence genu získané z cDNA knihovny ze slinných žláz samic *Ixodes ricinus*, které sály čtyři dny. Pro zaklonování byl použit vektor pcDNA4/TO/myc-HisA (Invitrogen). Tento vektor umožňuje při translaci podobně jako pET-19b syntézu histidinové kotvy na C-konci rekombinantního proteinu a nese rezistenci na ampicilin. Použitými restrikčními enzymy byly XhoI a AgeI (Fermentas).



Obr. 7: Plazmidový vektor pcDNA4/TO/Myc-His A (Novagen)

Expresní primery:

anti-MIP-2 (XhoI) - fwd: 5'- GGA **CTCGAGATG** GCT TTG AAA ATC CAG AG -3'

anti-MIP-2 (AgeI) - rev: 5'- GAA **ACC GGT** GTT GGA GTT CAA GAT TAG TTC -3'

PCR reakce - složení reakční směsi:

2x PCR master mix (Fermentas)	20 µl
100 µM anti-MIP-2 fwd (Generi Biotech)	2 µl
100 µM anti-MIP-2 rev (Generi Biotech)	2 µl
cDNA	1 µl
dH ₂ O (Fermentas)	15 µl

PCR reakce byla provedena v cycleru (Applied biosystems) následujícím programem:

1. denaturace: 93 °C, 5 minut
2. denaturace: 93 °C, 30 sekund
3. annealing: 58 °C, 30 sekund

4. extenze: 72 °C, 1 minuta

5. extenze: 72 °C, 7 minut (závěrečná extenze po proběhnutí všech cyklů)

40 cyklů

Výsledek reakce byl zkontrolován při elektroforéze v 1,5% agarózovém gelu (1,5% agaróza v TAE pufru), kde 40 µl PCR reakce bylo smícháno s 8 µl SYBR Green (Sigma). Pod UV lampou byla určena velikost produktu porovnáním se standardem GeneRuler™ 100bp DNA ladder (Fermentas) a poté byl izolován z gelu a přečištěn. PCR produkt byl purifikován z gelu pomocí kitu JETquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed). Výsledkem byla přečištěná DNA, která byla eluována do 30 µl dH₂O.

3.6.1.1 Restrikční reakce

Restrikční reakce - složení reakční směsi:

10x Tango pufr (Fermentas)	8 µl
PCR produkt	20 µl
XhoI - 10u/µl (Fermentas)	1 µl
AgeI - 10u/µl (Fermentas)	1 µl
dH ₂ O (Fermentas)	10 µl

10x Tango pufr (Fermentas)	8 µl
plazmid (Invitrogen)	2 µl
XhoI - 10u/µl (Fermentas)	1 µl
AgeI - 10u/µl (Fermentas)	1 µl
dH ₂ O (Fermentas)	28 µl

Směs byla inkubována 2 hodiny při 37 °C, následně byly enzymy v reakci inaktivovány 20 minut při 80 °C na tepelném bloku. PCR produkt i plazmid po restrikci byly přečištěny kitem JETquick PCR Purification Kit (Genomed). Výsledkem byla přečištěná DNA, která byla eluována do 30 µl dH₂O.

3.6.1.2 Ligace PCR produktu do vektoru pcDNA4/TO/myc-HisA

Ligační reakce - složení reakční směsi:

ligační pufr..... 5 μ l
plazmid..... 2 μ l
PCR produkt 2 μ l
T4 DNA ligáza - 3u/ μ l (Promega) ... 1 μ l

Ligační reakce probíhala přes noc při 4°C a část byla použita při transformaci.

3.6.1.3 Transformace kompetentních bakterií *E. coli* kmen TOP10

Transformace kompetentních bakterií byla prováděna podle postupu uvedeného v kapitole 3.5.1.3

3.6.1.4 Izolace plazmidu

Izolace plazmidu byla prováděna podle postupu uvedeného v kapitole 3.5.1.4

3.6.2 Příprava rekombinantního proteinu anti-MIP-2

3.6.2.1 Příprava buněk CHO

CHO (Chinese Hamster Ovary cells) je savčí buněčná linie využívaná běžně k expresi rekombinantních proteinů. V kultuře buňky adherují ke stěně nádoby a vytváří monovrstvu. Buňky byly kultivovány při 37 °C, 3,5 % CO₂, pasážovány každé 2-3 dny. Před transfekcí připraveným plazmidem byly buňky pasážovány 24 hodin předem. Kultivační nádoba byla nejprve zbavena média, buňky byly dvakrát opláchnuty sterilním PBS a poté k nim byl přidán 1 ml roztoku 0,02 % chelatonu 3 (w/v) s 1,5 % trypsinem (w/v), který způsobuje uvolnění adherovaných buněk ze stěn kultivační lahve a 9 ml kompletního média. Buněčná suspenze byla rozdělena do dvou kultivačních nádob a každá byla doplněna do 20 ml odpovídajícím množstvím média.

Transfekční reakce byla provedena v základním médiu D-MEM. Transfekční směs byla připravena ve dvou centrifugačních zkumavkách smícháním 30 μ g plazmidové DNA (vektor s inzertem anti-MIP-2 a kontrolní vektor s inzertem kódujícím bílkovinu GFP) se 150 μ l PEI

(polyethylenimin) ve 4 ml média. Reakce byla ponechána 15 minut při laboratorní teplotě, mezitím byly buňky zbaveny média a 2x promyty. K plazmidové DNA s PEI bylo po 15 minutách přidáno dalších 15 ml média a transfekční směs byla poté smíchána s připravenou buněčnou suspenzí. Buňky byly takto dále kultivovány přes noc při 37 °C, 3,5 % CO₂. Následující den byla zkontrolována úspěšnost transfekce pod fluorescenčním mikroskopem.

Po dvou dnech byly buněčné kultury centrifugovány (1150 RPM, 7 minut, 4°C), supernatanty byly přefiltrovány přes 0,22 µm filtr a zahuštěny ultrafiltrací na 1 ml pomocí kolon pro separaci proteinů nad 10 kDa (Amicon Ultra-15, 10NMWL, Millipore). Část vzorku byla uchována při 4°C, zbytek při -20°C. Přítomnost proteinu byla testována metodou western-blotting.

3.7 ELISA test

3.7.1 Stanovení chemokinu MIP-2

Roztoky:

- vazebný roztok: PBS (0,8 g NaCl, 0,29 g Na₂HPO₄, 0,2 g KH₂PO₄, 0,02 g KCl ve 100 ml deionizované vody)
- promývací roztok: PBS s 0,5% Tween-20
- blokovací roztok: 10% PTS v PBS
- ředící roztok: 1% PTS v PBS s 0,05% Tween-20
- substrátový roztok: 10 ml fosfocitrátového pufru pH 5 (1,84 g Na₂HPO₃ · 12 H₂O, 0,51 g C₆H₈O₇ · H₂O ve 100 ml deionizované vody) + 4 mg OPD (Sigma) + 4 µl H₂O₂
- zastavovací roztok: 2M H₂SO₄

K určení množství cytokinu MIP-2 byl použit komerční kit pro kvantifikaci cytokinů (PeproTech). Vlastní testování probíhalo v 96-jamkových mikrotitračních deskách (Nunc F Maxisorp) podle dodaného návodu.

Nejprve se na dno každé jamky navázala záchytná protilátka o koncentraci 0,5 µg/ml, objemu 50 µl a nechala se inkubovat ve vlhké komůrce (uzavřené nádobě se dnem pokrytým navlhčeným filtračním papírem) přes noc při laboratorní teplotě. Druhý den byly jamky 4x promyty promývacím roztokem a poté do nich bylo nanášeno 300 µl blokovacího roztoku,

který slouží k vyblokování nespecifických míst. Blokování probíhalo 1 hodinu ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Poté byly jamky opět 4x promyty, byly přidány jednotlivé supernatanty testovaných vzorků a rekombinantní protein jako standard v objemu 100 μl . Standard byl dvojkovou řadou ředěn z 10 ng/ml až na nulovou koncentraci a výsledky byly později využity k sestrojení kalibrační křivky. Vzorky byly inkubovány 2 hodiny ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Následně byly jamky 4x promyty a do každé jamky byla přidána detekční (biotinylovaná) protilátka o koncentraci 0,25 $\mu\text{g/ml}$, objemu 50 μl . Detekční protilátka se opět inkubovala po dobu 2 hodin ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Po inkubaci byly jamky 4x promyty a dále inkubovány se 100 μl avidin peroxidázy ředěné 1:2000, která po třiceti minutách označila navázanou detekční protilátku. Poté byly jamky 4x promyty a do jamek byl přidán substrátový roztok o objemu 100 μl , který byl připraven těsně před použitím a vše bylo ponecháno ve tmě. Peroxid vodíku - substrát pro peroxidázu - uvolnil kyslík, který oxidoval chromogen OPD a vznikla charakteristická barevná reakce. Vývoj barvy byl zastaven přidáním 100 μl 2M H_2SO_4 do každé jamky a následně byly odečteny hodnoty absorbance na vertikálním spektrofotometru (Multiskan MCC/340, Finsko) při vlnové délce 490 nm.

3.7.2 Stanovení chemokinu MIP-1- α

K určení množství cytokinu MIP-1- α byl použit komerční kit pro kvantifikaci cytokinů (PeproTech). Vlastní testování probíhalo v 96-jamkových mikrotitračních deskách (Nunc F Maxisorp) podle dodaného návodu, stejným způsobem, který je výše uveden pro detekci MIP-2.

3.8 Chemotaktické testy a průtoková cytometrie

Testy chemotaktické aktivity neutrofilů byly prováděny ve 24-jamkové kultivační desce, do které byly vloženy inzerty o průměru 6,5 mm s polykarbonátovou membránou o velikosti pórů 3 μm (Corning Transwell). Do horní části desky byly podle návodu přidány buňky v objemu 100 μl . Neutrofilly byly nasazovány v počtu 1 milión buněk na jamku ve sterilním PBS, do spodní části bylo napipetováno médium s chemoatraktantem, v tomto případě se jednalo o MIP-2. Kultivační deska byla poté inkubována 2 hodiny při 37°C a 3,5 % CO_2 . Buňky které migrovaly přes polykarbonátovou membránu do spodního kompartmentu byly kvantitativně převedeny do

mikrozkumavek a centrifugovány (1250 RPM, 10 minut, 4°C). Médium bylo odstraněno a buňky byly 30 minut inkubovány se specifickou protilátkou na neutrofilů konjugovanou fluorescenčním barvivem FITC (Rat anti mouse neutrophils, Serotec). Následně byly buňky promyty 1 ml PBS, tím se odstranila nenavázaná protilátka a ke směsi byly přidány magnetické kuličky v počtu 50000 na zkumavku. Počet neutrofilů byl určen přímou úměrou podle počtu změřených kuliček a neutrofilů za časovou jednotku na průtokovém cytometru (Beckman Coulter).

3.9 Použité chemikálie

Elektroforéza v agarózovém gelu

1x TAE	40 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA
6x Loading Dye	0,25% bromfenolová modř, 0,25% xylencyanol, 30% glycerol, 1,2% SDS, 60 mM fosfát sodný (Fermentas)
PCR H ₂ O	filtrovaná, destilovaná, autoklávovaná voda (Millipore)
DNA standard	GeneRuler™ 100bp DNA ladder (Fermentas)
5x PCR master mix	směs dNTP (Fermentas)
SYBR green	SYBR green (Sigma)
agaróza	1% a 1,5% agaróza (Amresco) v 1x TAE pufru
EtBr	Ethidium bromid 10 mg/ml

Expres, purifikace a refolding rekombinantního proteinu v bakteriálním expresním systému

LB médium	10 g trypton, 5 g kvasinkový extrakt, 5 g NaCl, 1000 ml dH ₂ O
LB agar	5 g trypton, 5 g kvasinkový extrakt, 2,5 g NaCl, 7,5 g agar, 500 ml dH ₂ O, autoklávováno
SOC médium	2 % bacto-trypton; 0,5 % bacto-yeast extract; 0,05 % NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glukóza; pH 7,0; sterilní
IPTG	100 mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
Lytický pufr	0,4 M NaCl, 0,1 M KCl, 10% glycerol, 0,5% Triton X-100, 10 mM imidazol
Resuspendační pufr	20 mM Tris/HCl, pH 8,0
Izolační pufr	2 M močovina, 20 mM Tris/HCl, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol, 1 mM 2-merkaptoetanol, 2% Triton X-100, pH 8,0
Pufr A	8 M urea, 10 mM Tris/HCl; pH 8
Pufr B	8 M urea, 10 mM Tris/HCl; 0,5 M imidazol, pH 8

Expres rekombinantního proteinu v eukaryotním systému

Kultivační medium	D-MEM, 5%BOFES, 1% Antibiotic/Antimycotic (PAA), 1% glutamin
PEI	Polyetylenin, 1 mg/ml v H ₂ O
Zásobní trypsin	1,5% trypsin v PBS, filtrováno
D-MEM	D-MEM Hight Glucose (4,5 g/l) (PAA)

SDS-PAGE a Western blot

5x Elektroforetický pufr	0,125 M Tris, 0,96 M glycin, 0,5% SDS
5x Vzorový redukující	0,75 M Tris-HCl, pH 6,8, 5% SDS, 50% glycerol, 0,5% dithiotreitol, 0,25% bromfenolová modř
5x Gelový pufr	1,875 M Tris-HCl, pH 8,8
Proteinový standard	LMW Electrophoresis Calibration Kit (Amersham)
Barvicí roztok	0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% metanol, 10% kyselina octová
Odbarvovací roztok	25% metanol, 10% kyselina octová
PBS-Tween	1x PBS; 0,05 % Tween 20
Blokovací pufr	5% sušené mléko v PBS-Tween 20
Akrylamidový roztok	30% acrylamid a bisacrylamid
10% (w/v) SDS	Laurylsulfát sodný
TEMED	N, N, N', N' - tetramethylenediamin
10% (w/v) APS	Ammonium persulfát

Neutrofilly

Thioglykolátové médium	Fluid thioglycolate medium (Difco)
RPMI kompletní médium	RPMI, 5% BOFES, 1% Antibiotic/Antimycotic (PAA), 1% glutamin

Kity

ELISA	Murine MIP-2 Development Kit (Peprtech)
ELISA	Murine MIP-1-alpha Development KIT (Peprtech)
Izolace plazmidu	JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed)
Izolace produktu z gelu	JET quick Gel Extraction Spin Kit (Genomed)
Čištění PCR produktu	JET quick PCR Purification Spin Kit (Genomed)
Chemotaxe	HTS Transwell 24-System, Polycarbonate Membrane Transwell Inserts (Corning)

3.10 Statistické zpracování

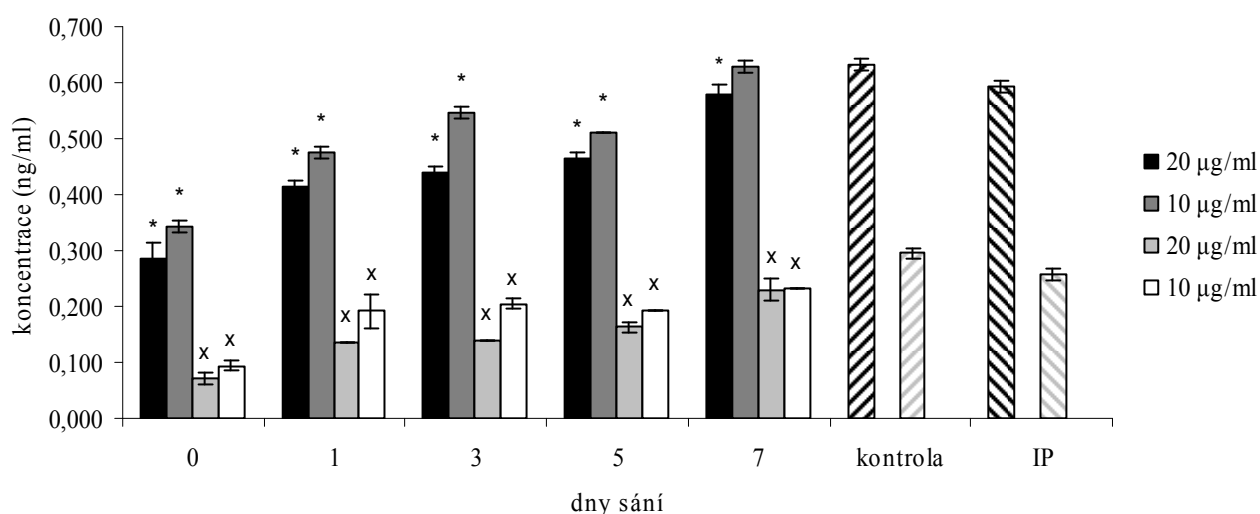
Všechny pokusy byly prováděny v triplikacích, v programu Microsoft Excel byly vypočteny průměry a směrodatné odchylky, které byly použity pro vytvoření grafů. Statistické analýzy probíhaly pomocí Studentova t-testu a analýzou variance (jednocestná ANOVA) v programu Statistica 8.0. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($P < 0,05$) byly v grafech označeny hvězdičkou.

4. VÝSLEDKY

4.1 Antichemokinové vlastnosti SGE a slin

4.1.1 Inhibiční efekt SGE

V tomto pokusu byl sledován vliv extraktů ze slinných žlaz připravených v různých časových intervalech od počátku sání na chemokin MIP-2. Extrakty byly připraveny z nenasátých klíšťat a z jedinců, kteří sáli 1, 3, 5 a 7 dnů na laboratorním morčeti. Konečná koncentrace jednotlivých SGE odpovídala 20 a 10 $\mu\text{g/ml}$, MIP-2 byl stejným způsobem naředěn na koncentraci 0,6 a 0,3 ng/ml . Tyto dvě složky byly společně 3 hodiny inkubovány, poté byly vzorky převedeny do ELISA testu a vyhodnoceny.



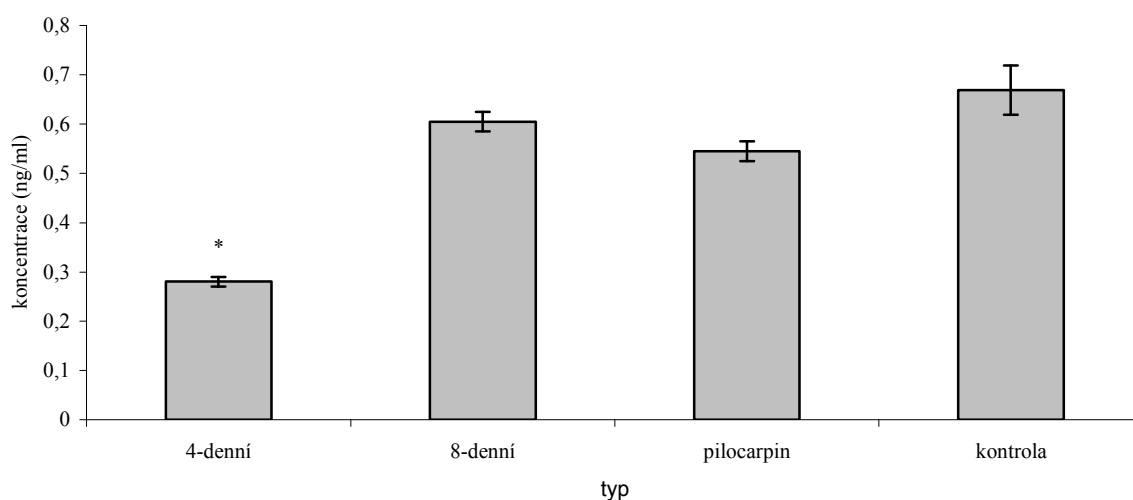
Graf 1: Inhibiční efekt extraktů ze slinných žlaz připravených z nenasátých a částečně nasátých klíšťat. Koncentrace MIP-2: 0,6 a 0,3 ng/ml , koncentrace SGE: 20 a 10 $\mu\text{g/ml}$. IP = inhibitory proteáz. * statisticky významný rozdíl oproti skupině kontrola-první sloupec, ^x statisticky významný rozdíl oproti skupině kontrola-druhý sloupec ($P < 0,05$)

Z prvního grafu vyplývá, že největší inhibice cytokinu MIP-2 byla zaznamenána u nenasátých klíšťat v přítomnosti SGE a to téměř o 50% oproti kontrole, kterým byl samotný chemokin. Poměrně dobrá inhibiční schopnost byla pozorována i v časech 1, 3 a 5 dnů od počátku sání. V intervalu 7 dní, kdy jsou klíšťata plně nasáta, je efekt ovšem již minimální. Tento trend je patrný jak u chemokinů o koncentraci 0,6 ng/ml , kterému odpovídají první dva sloupce

každé skupiny v grafu, tak i v případě koncentrace 0,3 ng/ml, jež korespondují se zbylými dvěma sloupci. Inhibitory proteáz neměly vliv na průběh reakce

4.1.2 Inhibiční efekt slin

Dalším předmětem zkoumání byla interakce slin a chemokinů MIP-2 (Graf 2). V pokusu byly použity sliny z částečně nasátých a plně nasátých klíšťat. Konečná koncentrace slin byla 10 µg/ml, MIP-2 byl obdobně jako v předchozím pokusu naředěn na koncentraci 0,6 ng/ml. Směs byla inkubována 3 hodiny při laboratorní teplotě, poté byly vzorky převedeny do ELISA testu a vyhodnoceny.



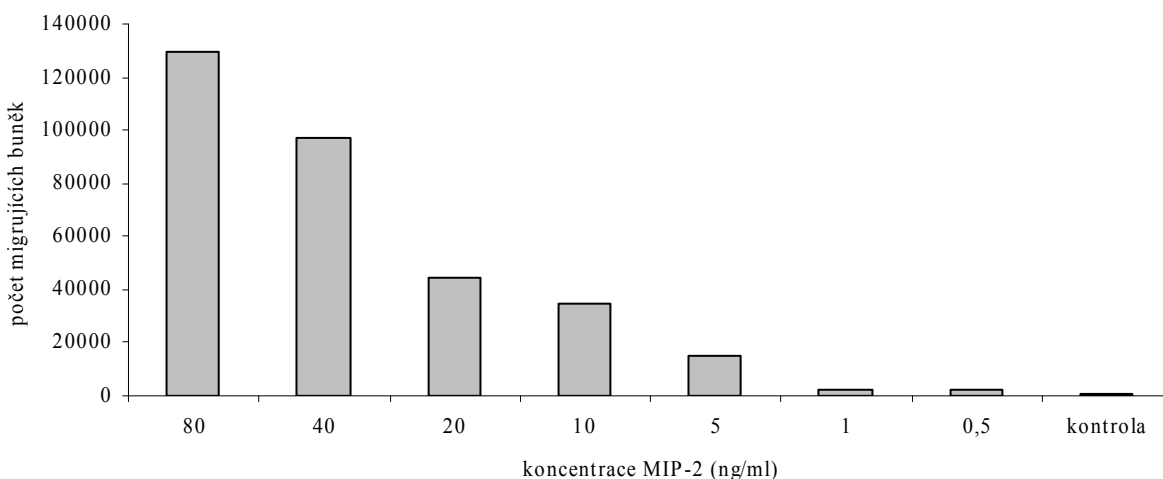
Graf 2: Inhibiční efekt slin připravených z částečně a plně nasátých klíšťat. Koncentrace MIP-2: 0,6 ng/ml, koncentrace slin: 10 µg/ml. * statisticky významný rozdíl oproti skupině kontrola ($P < 0,05$)

Z uvedeného grafu je patrné, že čtyřdenní sliny mají schopnost interagovat s příslušným cytokinem a výrazně snižovat jeho detekovatelné množství v ELISA testu. Vlivem slin tedy došlo ke snížení množství MIP-2 o 58% v případě, že sliny pocházely z částečně nasátých klíšťat. Sliny z plně nasátých jedinců tuto schopnost nemají. Pilocarpin, který se běžně užívá k indukci slinění, neměl vliv na detekci chemokinů. Kontrolou byl v tomto případě MIP-2 o koncentraci 0,6 ng/ml.

4.2 Chemotaktické testy

4.2.1 Migrace neutrofilů v závislosti na koncentraci MIP-2

Byla studována schopnost neutrofilních granulocytů získaných z peritoneálního náplavu reagovat na různé koncentrace chemoatraktantu. Buňky byly nasazeny do kultivační desky jak je uvedeno v kapitole 3.8. MIP-2 byl testován v příslušných koncentracích v rozmezí 0 - 80 ng/ml, výsledek popisuje následující graf (Graf 3). Jako kontrola bylo použité médium bez přítomnosti chemokinu.



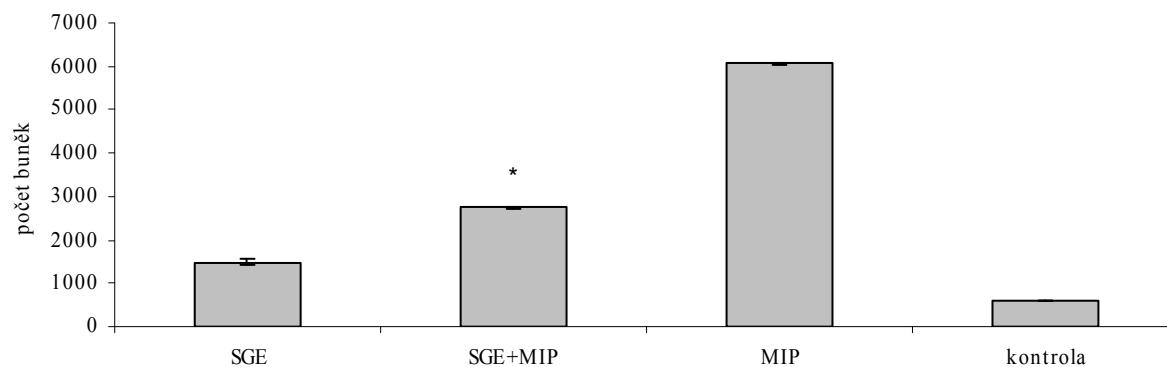
Graf 3: Vliv koncentrace MIP-2 na migraci neutrofilních granulocytů. Koncentrace MIP-2: 80, 40, 20, 10, 5, 1, 0,5, 0 ng/ml

Koncentrace chemoatraktantu je významným parametrem reakce. Se zvyšující se koncentrací podstatně stoupá i počet neutrofilů, které byly schopné migrace přes polykarbonátovou membránu. Tato závislost je exponenciální. Pro další pokus byla jako nejvhodnější určena koncentrace 5 ng/ml.

4.2.2 Migrace neutrofilů v přítomnosti SGE

V tomto pokusu bylo sledováno, jakým způsobem ovlivní extrakt ze slinných žláz schopnost chemotaxe neutrofilních granulocytů. Extrakt ze slinných žláz byl připraven z klíšťat, která sála 3 dny. ELISA testem byl před vlastním pokusem ověřen inhibiční efekt. Bylo použito SGE o koncentraci 20 μ g/ml a MIP-2 o koncentraci 5 ng/ml. Experiment probíhal podle postupu

uvedeného v kapitole 3.8. V případě skupiny SGE+MIP byla směs 3 hodiny preinkubována před převedením do chemotaktické desky. Kontrolou bylo médium.



Graf 4: Migrace neutrofilů v přítomnosti 3-denního SGE. * statisticky významný rozdíl oproti skupině MIP ($P < 0,05$)

Z Grafu 4 je patrné omezení schopnosti migrace neutrofilních granulocytů v přítomnosti chemokinu MIP-2 a extraktu ze slinných žlaz. Samotný MIP-2 byl schopný chemoatraktivovat přibližně 6000 buněk, kdežto v případě skupiny SGE+MIP bylo toto množství poloviční. Samotný extrakt ze slinných žlaz byl schopný také přitahovat neutrofilů a to přibližně dvakrát více než negativní kontrola.

4.3 Rekombinantní protein - příprava v bakteriálním expresním systému

Na základě srovnání genové sekvence Evasinu-1 s jednotlivými geny cDNA knihoven *Ixodes ricinus* (Obr. 4) byl pro přípravu proteinu s potenciální antichemokinovou aktivitou vybrán contig 694. Toto označení pochází z bioinformatické analýzy cDNA knihovny připravené z klíšťat, která šála 4 dny. Transkript tohoto genu byl označen jako anti-MIP-2 a je tvořen celkem 645 bazemi. Maturovaný protein se skládá ze 191 aminokyselin a jeho molekulová hmotnost odpovídá 23 kDa. Izoelektrický bod byl stanoven na 6,3 - jedná se tedy o kyselý protein. Protein byl připraven postupem uvedeným v kapitole 3.5.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
EVASIN 1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 1
gi|116236760|gb|EG363918.1|EG3 1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 1
gi|67083340:1-639 Ixodes scapu 1 MALKLQSLQLVLATLVAQENVPAMSAQMVPPFLRPPGLGRPRCIDSHRFGNGDQTIHLKRCQEGCSGKKPKDGDKCV 80
IR4DL-P1_D06 1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 1
IR4DL-P2_D11 IR_ALL-contig_611 1 -----MAISMTNRFNRNIFVPPSLIFALAVMEQVFATDCSIIQQKFNHDTITVNTVCCKTCNGQTSRAKEGELCIR 70
IR4DM-P4_G07 IR_ALL-contig_694 1 MALKIQRLQLVLAVLVAQENVPALLNGMVPVLPFGPPGRGGPRCIRSHIFGSGDQAIHLKPHCEGCSGKEPNDGDKCVG 80
IR7DM-P3_C06 1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 1

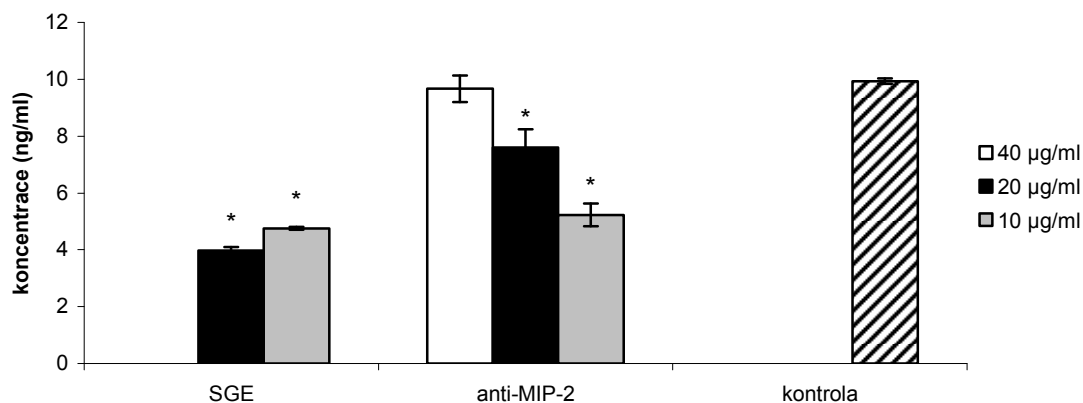
      90      100     110     120     130     140     150     160
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
EVASIN 1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 57
gi|116236760|gb|EG363918.1|EG3 1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 62
gi|67083340:1-639 Ixodes scapu 81 ETGTSGSALIFLSGVQNMTCINNESEITYKQNMNISVGSYD--KASVPLPGCFRISIDRNRYLLSMECT-TCEAOL 157
IR4DL-P1_D06 2 ESETSGSVLIFLSGVQNMTCINNESEITYKQNMNESLDNNGVYKAPIQLPGCCFTINVQDRNRYLLSMECT-SCGSOL 80
IR4DL-P2_D11 IR_ALL-contig_611 71 KHQGIDYVFTLLTGISHGECQETSEGETYKRELEPEPLLDNYPARRPWPKECFRTNIQDRNDTVFLSTEQNVICADRF 150
IR4DM-P4_G07 IR_ALL-contig_694 81 VSGTSGPVLIIILSGVQNKTKCKISNESEITYKQNMNVSLSNDVKGEQIQLPGCCFTSVQDRARNYLLSMECT-ACESOL 159
IR7DM-P3_C06 1 |-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----| 18
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
      170     180     190     200     210     220
      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
EVASIN 57 --ETAPNGTRCFSGIDGELRRMTANL PYDCPLVQCSNGDCIPKETVVC-YRRNWRDKKN 114
gi|116236760|gb|EG363918.1|EG3 62 --DTLENGTRCFSTIGDGLMRMKNLTYACPLVDCQNGTCVGNKNTSC-YRRNWSQ--- 116
gi|67083340:1-639 Ixodes scapu 158 NQTTRFDCTPCIASQED---TESGDLKLT--VTECHNGTCVPRNPTEITVDIKKELYTSSD 212
IR4DL-P1_D06 81 NQTTRFDCTPCVASQSI---TESGNVRLT--VTECRNCTCVSLNRTEITVDVKKELIINSND 135
IR4DL-P2_D11 IR_ALL-contig_611 150 -VKQRDNGTFCVFSKTQ----KDKYTATIVIVCVNCKCEGKQNEWK-LK----- 195
IR4DM-P4_G07 IR_ALL-contig_694 160 NKTTRFDCTLCIAFQNN---TVSGDVTLT--LTECHNGTCIPRNPTEITVDVKKELIINSN 214
IR7DM-P3_C06 19  NQTTRFDCTPCVASQNI---TESGNVRLT--VTECRNCTCVSLNRTEITVDVKKELVSNSD 73

```

Obr. 4: Srovnání genové sekvence Evasinu-1 se sekvencemi z cDNA knihovny *Ixodes ricinus*.

4.3.1 Antichemokinové vlastnosti rekombinantního proteinu

V tomto pokusu byl sledován vliv rekombinantního proteinu anti-MIP-2 na chemokin MIP-2. MIP-2 byl naředěn na konečnou koncentraci 10 ng/ml, rekombinantní protein byl testován v koncentraci 10, 20 a 40 µg/ml. Obě složky byly společně inkubovány 3 hodiny, následně byly jednotlivé vzorky převedeny do ELISA testu a vyhodnoceny. Kontrolou byl v tomto případě MIP-2 o koncentraci 10 ng/ml. Současně byl testován i třídní extrakt ze slinných žláz.



Graf 5: Antichemokinová aktivita rekombinantního proteinu anti-MIP-2. Koncentrace MIP-2: 10 ng/ml, koncentrace anti-MIP-2: 20, 10 µg/ml, koncentrace SGE: 20, 10 µg/ml.

Podle tohoto grafu má připravený rekombinantní protein antichemokinovou aktivitu, která se snižuje se zvyšující se koncentrací proteinu.

Obdobným způsobem byla testována i schopnost rekombinantního proteinu snižovat množství chemokinu MIP-1- α , kde inhibice nebyla pozorována.

4.4 Rekombinantní protein - příprava v eukaryotním expresním systému

Protein byl připravován podle postupu uvedeném v kapitole 3.6. Transfekce buněk CHO připraveným vektorem proběhla vždy úspěšně, ovšem protein nebyl detekován ELISA metodou ani prostřednictvím metody western-blotting.

5. DISKUZE

Výsledky této práce je možné rozdělit na tři části, a to na data získaná ze zkoumání antichemokinových vlastností extraktu ze slinných žlaz a slin klíštěte *Ixodes ricinus*, dále jsou uvedeny výsledky chemotaktických testů a posledním tématem byla příprava a testování rekombinantního proteinu s potenciální antichemokinovou schopností.

Schopnost imunoprese umožňuje klíšťatům dlouhodobě sít na imunokompetentním hostiteli. Klíštěcí sliny obsahují faktory, které potlačují mechanismy jak přirozené, tak adaptivní imunity - je suprimována klasická i alternativní dráha aktivace komplementu a produkce anafylatoxinů (Ribeiro a Spielman 1986). To má za následek inhibici produkce chemoatraktantů a dalších biologicky aktivních molekul zánětu (Toman 2009). Je známo, že produkty slinných žlaz klíšťat účinně zasahují do imunitního systému hostitele, a tudíž i do cytokinové kaskády (Hajnická a kol. 2005). Vlivem sání dochází k polarizaci T-lymfocytární odpovědi směrem k T_H2 , za současné suprese produkce T_H1 cytokinů. Mezi T_H1 cytokiny patří i chemokin MIP-2 (CXCL-2), myši analog lidského chemotaktického faktoru pro neutrofile IL-8 (CXCL-8). MIP-2 je jedním z prvních cytokinů objevujících se při zánětlivé reakci. Právě proto je pravděpodobně pro klíště velmi výhodné určitým způsobem tento cytokin blokovat a zabránit tak následné migraci polymorfonukleárních buněk a jejich degranulaci. Vančová a kol. (2007) ve své práci popisuje antichemokinové vlastnosti extraktu ze slinných žlaz připravených z nenasátých, částečně a plně nasátých klíšťat *Amblyomma variegatum* a to v případě cytokinů CXCL-8, CCL-2, CCL-3, CCL-5 a CCL11. Podobné výsledky jako ona pro CXCL-8 jsem získala pro MIP-2 v případě extraktu ze slinných žlaz klíštěte *Ixodes ricinus* (Graf 1). Největší inhibice byla pozorována u nenasátých klíšťat a poté u klíšťat sajících do čtvrtého až pátého dne, pak tento efekt mizí. Jak je již uvedeno výše, inhibiční aktivita v časných fázích sání se dá vysvětlit snahou klíštěte omezit funkci MIP-2 a infiltraci místa přichycení neutrofile. Extrakt ze slinných žlaz je poměrně dobrým modelem odpovídajícím funkci slin, ovšem SGE narozdíl od slin obsahuje i další proteiny vzniklé sonikací slinných žlaz, které ve slinách nejsou obsaženy. Tyto proteiny pak mohou určitým způsobem ovlivňovat reakční podmínky jednotlivých pokusů (Kýčková a Kopecký 2006). Proto byly obdobným způsobem jako u SGE testovány antichemokinové vlastnosti slin klíštěte *Ixodes ricinus*. Vzhledem k tomu, že ze sajících klíšťat je možné získat jen velmi omezené množství slin, byla testována pouze inhibice MIP-2 čtyřdenními slinami, kde byl

očekáván efekt suprese chemokinu na rozdíl od slin získaných z plně nasátých osmidenních jedinců. Čtyřdenní sliny měly obdobně jako extrakty ze slinných žlaz třídenních jedinců antichemokinové účinky. Tímto pokusem byla potvrzena schopnost slin interagovat s příslušným chemokinem a snižovat jeho množství v ELISA testu.

V další části jsem se zabývala ovlivněním chemotaktické schopnosti neutrofilů extraktem ze slinných žlaz, poté, co byla stanovena jeho anti-MIP-2 aktivita ELISA metodou. Vzhledem k tomu, že z periferní krve myši je možné získat 350000 ± 40000 leukocytů (z tohoto počtu 97% neutrofilů - Boxio 2004), bylo nejprve nutné zajistit dostatečný počet neutrofilů pro vlastní chemotaktický test. Byla zvolena metoda izolace neutrofilních granulocytů z peritoneální dutiny myši po indukci thioglykolátovým médiem (Shah a kol. 2007). Tímto způsobem bylo možné vytěžít průměrně 15 miliónů buněk z jedné myši, což bylo pro testy optimální množství. Nejprve jsem zkoumala závislost koncentrace chemoatraktantu MIP-2 na množství buněk schopných migrovat přes polykarbonátovou membránu. Se zvyšující se koncentrací podstatně stoupá i počet neutrofilů, které prošly polykarbonátovou membránou (Graf 3), závislost je exponenciální. Pro pokus zda SGE ovlivňuje chemotaxi byla jako nejvhodnější určena koncentrace MIP-2 5 ng/ml, která byla dostatečně citlivá jako chemotaktický stimul, zároveň přitom umožňovala pozorovat efekt SGE. Hajnická a kolektiv (2001) prokázala supresi IL-8 pravděpodobně prostřednictvím vazby jedné nebo více molekul obsažených v extraktu ze slinných žlaz na produkovaný cytokin. Pokud se tato molekula naváže na IL-8, zabráni mu ve vazbě na receptor, a tím inhibuje chemotaxi neutrofilů. Montgomery a kol. (2004) ovšem uvádí, že v případě slin *I. scapularis* nedochází k inhibici chemotaxe, ale ke snížení exprese β_2 integrinů na povrchu neutrofilů, a tím ke snížení adheze těchto buněk. V mém případě jsem zaznamenala snížení migrační aktivity neutrofilů v případě, že SGE byl inkubován s chemokinem MIP-2. Tímto pokusem bylo dokázáno, že k inhibici chemokinu MIP-2 v ELISA testu nedochází případnou nespecifickou reakcí, ale vazbou molekuly obsažené v extraktu ze slinných žlaz na cytokin, která omezuje jeho schopnost chemotakticky působit na neutrofilní granulocyty. Samotný SGE měl také schopnost přitahovat buňky, což může být způsobeno nespecifickou reakcí balastních proteinů obsažených v extraktu.

Součástí práce byla i příprava rekombinantního proteinu s potenciální anti-MIP-2 aktivitou. V nedávné době byly u klišťete *Rhipicephalus sanguineus* objeveny chemokiny vázající proteiny, které byly označeny jako evasiny (Frauensuh a kol. 2007, Déruaz a kol. 2008). Evasiny vážou

chemokiny a omezují tak prvotní kroky imunitní odpovědi hostitele, současně mají silný protizánětlivý účinek (Déruez a kol. 2008). Protože podobné molekuly nebyly u jiných klíšťat zatím zkoumány, bylo otázkou, zda se i u klíšťat *Ixodes ricinus* vyskytují proteiny s obdobnou aktivitou. Evasin-1 je striktně specifický pro skupinu CC chemokinů - vazba byla prokázána u CCL3, CCL-4 a CCL-18, ovšem k interakci došlo u skupiny CXC chemokinů. Evasin-3 se váže na receptor CXCR-1, tím brání vazbě jeho ligandům CXCL-1 a CXCL-8, a také inhibuje chemotaxi *in vitro* (Déruez a kol. 2008). Sekvence genu kódujícího Evasin-3 nebyla podobná žádnému známému proteinu, proto byl dále porovnáván Evasin-1 se sekvencemi z cDNA knihoven klíšťat *Ixodes scapularis*, *Dermacentor andersoni* a *Ixodes ricinus* (Obr. 4). Ačkoli se jednotlivé sekvence liší v počtu aminokyselin, jsou všem společné vyznačené vysoce konzervované oblasti, které by mohly být zodpovědné za potenciální antichemokinové účinky. Navíc pro správnou funkci proteinu je mnohem zásadnější terciární struktura, než jeho aminokyselinové složení. Protein anti-MIP-2 byl připravován v eukaryotním a bakteriálním systému. Exprese proteinu v savčích buňkách CHO byla neúspěšná, protein se nepodařilo detekovat, i když transfekce probíhala. To bylo zřejmě způsobeno špatnou kvalitou buněk, které byly kontaminovány kvasinkami a plísněmi, a i přes přeléčení antibiotiky došlo nejspíš k jejich významnému ovlivnění, což se projevilo neschopností produkovat rekombinantní protein. Déruez a kol. (2008) ve svém článku uvádí, že v případě přípravy rekombinantního Evasinu-3 a Evasinu-4 v eukaryotním systému HEK-293 byly výtěžky velmi slabé. Rekombinantní protein se v mém případě podařilo připravit pouze v bakteriálním systému, a to pokud nativní sekvence byla spojena s histidinovou kotvou. Ve srovnání s testovaným SGE se nejprve zdálo, že připravený rekombinantní anti-MIP-2 protein má antichemokinovou aktivitu (Graf 5), která se zvyšuje s klesající koncentrací. Tento výsledek ovšem nepotvrdil další test, kde byly sledovány i nižší koncentrace anti-MIP-2 proteinu společně s kontrolním proteinem - inhibitorem cysteinových proteáz a ovalbuminem, současně nebyla prokázána vazba chemokinu MIP-1- α . (CCL-3). Proto z tohoto výsledku usuzuji, že připravený rekombinantní protein anti-MIP-2 nemá antichemokinovou aktivitu. To může být způsobeno zcela odlišnou sekvencí zásadní pro expresi tohoto proteinu, nedokonalým zpětným sbalením proteinu do terciární struktury, přítomností histidinové kotvy, která tvoří poměrně velkou část proteinu nebo nějakým dalším faktorem.

V každém případě ovlivnění produkce časných prozánětlivých cytokinů je pro klíště důležité pro jeho úspěšné sání, protože zánět je velmi účinnou obranou vůči tomuto parazitovi. Modulace

imunitní odpovědi využívají i klíšťaty přenášené patogeny, které mohou v hostiteli snadněji přežít a množit se (Nuttall 1998). Protože neutrofilů tvoří primární obrannou bariéru proti infekci, potlačení chemotaxe neutrofilů do místa zánětu může mít významný vliv na šíření infekce a může být jednou z příčin SAT efektu. Imunizace rekombinantním proteinem vede k vytváření protilátek, které by samy o sobě mohly zabránit v ovlivnění neutrofilů klíštěcími slinami a případně zabránit sání.

6. SOUHRN

- prokázány antichemokinové vlastnosti SGE a slin *Ixodes ricinus* u nenasátých a částečně nasátých jedinců
- zavedena metoda chemotaktických testů za použití polykarbonátových inzerťů
- prokázána inhibice chemotaxe pomocí SGE *Ixodes ricinus* získaného z částečně nasátých jedinců
- připraven rekombinantní protein bez anti-MIP-2 aktivity

7. PŘEHLED POUŽITÝCH ZKRATEK

ACTH	- adrenokortikotropní hormon
BOFES	- bovinní fetální sérum
CD	- povrchový znak (cluster of differentiation)
CHO	- buňky křeččích ovárií (chinese hamster ovary cells)
CXC, CC	- typ chemokinu dle polohy spárovaných cysteinů
DARC	- receptor (Duffy antigen receptor for chemokines)
DAG	- diacylglycerol
D- MEM	- kultivační médium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DTH	- přecitlivělost oddáleného typu (delayed-type hypersensitivity)
DTT	- dithiothreitol
ELISA	- imunochemická metoda (enzyme-linked immunosorbent assay)
ENA-78	- chemokin (epithelial neutrophil- activating protein-78)
GCP	- chemotaktický peptid pro granulocyty (granulocyte chemotactic peptide)
GDP / GTP	- guanosindifosfát / guanosintrifosfát
G-CSF	- faktor stimulující proliferaci granulocytů
GM-CSF	- faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
GRO	- onkogen (growth-related oncogen)
ICAM	- molekula zprostředkující adhezi (intercellular adhesion molecule)
IFN- γ	- interferon-gamma
IL	- interleukin
IP3	- inositoltrifosfát
kDa	- kilodalton (jednotka molekulové hmotnosti)
LB	- Luria-Bertani kultivační médium
LFA-1	- adhezní molekula (lymphocyte function-associated antigen-1)
Mac-1	- adhezní molekula (macrophage antigen-1)
MCP	- chemoatrakční peptid pro monocyty (monocyte chemoattractant peptide)
MHC	- hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MIP	- makrofágový prozánětlivý protein (macrophage inflammatory protein)
NAP-2	- peptid aktivující neutrofilny (neutrophil-activating peptide-2)
OPD	- o-fenylendiamin

PAGE	- elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PBS	- fosfáty pufovaný fyziologický roztok (phosphate buffered saline)
PCR	- polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PF4	- destičkový faktor 4 (platelett factor 4)
PGE	- prostaglandin
PTS	- prekolostrální telecí sérum
RANTES	- chemokin (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted)
ROI	- reaktivní kyslíkové radikály (reactive oxygen intermediates)
RPMI	- kultivační médium (Roswell Park Memorial Institute)
SAT	- slinami aktivovaný přenos (saliva activated transmission)
SDS	- sodium dodecyl sulfát
SGE	- extract ze slinných žláz (salivary gland extract)
SOC	- kultivační médium
TGF	- transformující růstový faktor (transforming growth factor)
T _H , T _C	- pomocný (helper T-cell), cytotoxický (cytotoxic T-cell) lymfocyt
TNF	- nádory nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Bradford M. M. 1967: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

Clements J. M., Craig S., Gearing A. J., Hunter M. G., Heyworth C. M., Dexter T. M., Lord B. I. 1992: Biological and structural properties of MIP-1 alpha expressed in yeast. *Cytokine* 4: 76-82

Déruaz M., Frauenschuh A., Alessandri A. L., Dias J. M., Coelho F. M., Russo R. C., Ferreira B. R., Graham G. J., Shaw J. P., Wells T. N. C., Teixeira M. M., Power Ch. A., Proudfoot A. E. I. 2008: Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *J. Exp. Med.* 205: 2019-2031

Dickinson D. P. 2002: Cysteine peptidases of mammals: Their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 13: 238-275

Dunlevy J. R., Couchman J. R. 1995: Interleukin-8 induces motile behavior and loss of focal adhesions in primary fibroblasts. *J. Cell Science* 108: 311-321

Fuchsberger N., Imanishi J., Labuda M., Kita M., Hajnická V., Nuttall P. A. 1995: Ixodid salivary gland extracts inhibit production of lipopolysaccharide-induced mRNA of several different human cytokines. *Exp. Appl. Acarol.* 19: 671-676

Frauenschuh A., Power Ch. A., Déruaz M., Ferreira B. R., da Silva J., Teixeira M. M., Dias J. M., Martin T., Wells T. N. C., Proudfoot A. E. I. 2007: Molecular cloning and characterisation of highly selective chemokine binding protein from the tick *Rhipicephalus sanguineus*. *J. Biol. Chem.* 282: 27250-27258

Gao J.-L., Wynn T. A., Chang Y., Lee E. J., Broxmeyer H. E., Cooper S., Tiffany H. L., Westphal H., Chung J. K., Murphy P. M. 1997: Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *J. Exp. Med.* 185: 1959-1968

Gerritsen V. B. 2008: Hidden powers. *Proteinspotlight*. Issue 99

Gillespie R. D., Dolan M. C., Piesman J., Titus R. G. 2001: Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. J. Immunol. 166: 4319-4326

Guan E., Wang J., Norcross M. A 2001: Identification of human macrophage inflammatory proteins 1 α and 1 β as a native secreted heterodimer. J. Biol. Chem. 276: 12404-12409

Hajnická V., Kocáková P., Sláviková M., Slovák M., Gašperík J., Fuchsberger N., Nuttall P. A. 2001: Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. Parasite Immunol. 23: 483-489

Hajnická V., Vancová I., Kocáková P. 2005: Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. Parasitology 130: 333-342

Hořejší V., Bartůňková J. 2001: Základy imunologie. Triton, Praha. 2. vydání. 30-37

Chmelař J., Anderson J. M., Mu J., Joachim R. C., Valenzuela J. G., Kopecký J. 2008: Insight into the sialome of the castor bean tick, *Ixodes ricinus*. BMC Genomics 9: 233 - 254

Christe M., Rutti B., Brossard M. 1998: Susceptibility of BALB/c mice to nymphs and larvae of *Ixodes ricinus* after modulation of IgE production with anti-IL-4 or anti-IFN- γ monoclonal antibodies. Parasitol. Res. 84: 388-393

Jerva L. F., Sullivan G., Lolis E. 1997: Functional and receptor binding characterization of recombinant murine macrophage inflammatory protein 2: Sequence analysis and mutagenesis identify receptor binding epitopes. Protein Sci. 6: 1643-1652

Kato T., Takai T., Mitsuishi K., Okumura K., Ogawa H. 2005: Cystatin A inhibits IL-8 production by keratinocytes stimulated with Der p 1 and Der f 1: Biochemical skin barrier against mite cysteine proteases. J. Allergy Clin. Immunol. 116: 169-176

Klener P. a spolupracovníci 1997: Cytokiny ve vnitřním lékařství. Grada, Praha

Koník P., Slavíková V., Salát J., Dvorožňáková E., Kopecký J. 2006: Anti-tumour necrosis factor- α activity in *Ixodes ricinus* saliva. Parasite Immunol. 28: 649-656

Kopydlowski K. M., Salkowski C. I., Cody M. J., van Rooijen N., Major J., Hamilton T. A., Vogel S. N. 1999: Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide *in vitro* and *in vivo*. J. Immunol. 163: 1537-1544

Kubeš M., Fuchsberger N., Labuda M., Zuffová E., Nuttall P. A. 1994: Salivary gland extracts of partially fed *Dermacentor reticulatus* 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

Matzer S. P., Baumann T., Lukacs N. W., Röllinghoff M., Beuscher H. U. 2001: Constitutive expression of macrophage-inflammatory protein 2 (MIP-2) mRNA in bone marrow gives rise to peripheral neutrophils with preformed MIP-2 protein. *J. Immunol.* 167: 4635-4643

Montgomery R. R., Lusitani D., De Boisfleury Chevance A., Malawista S. E. 2004: Tick saliva reduces adherence and area of human neutrophils. *Infect. Immun.* 72: 2989-2994

Mosmann T. R., Coffman R. L. 1989: TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145-173

Murdoch C., Finn A. 2000: Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 95: 3032-3043

Nuttall P. A. 1998: Displaced tick-parasite interactions at the host interface. *Parasitology* 116: 65-72

Paine S. H., Kemp D. H., Allen J. R. 1983: In vitro feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and other mediators. *Parasitology* 86: 419-428

Procházková J., John C. 1986: Vybrané diagnostické metody lékařské imunologie. Avicenum, Praha. 1. vydání. 248-254

Ramachandra R. N., Wikel S. K. 1992: Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *J. Med. Entomol.* 29: 818-826

Racek J., Eiselt J., Friedecký B., Holeček V., Nekulová M., Pittrová H., Rušavý Z., Senft V., Šavlová M., Těšínský P., Verner M. 2006: Klinická biochemie. Galén, Praha. 2. vydání. 159-161

Ramos C. D. L., Canetti C., Souto J. T., Silva J. S., Hogaboam C. M., Ferreira S. H., Cunha F. Q. 2005: MIP-1 α [CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF- α and LTB $_4$. *J. Leukoc. Biol.* 78: 167-177

Ribeiro J. M. C., Makoul G. T., Levine J, Robinson D., 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. C., Spielman A. 1986: *Ixodes dammini*: salivary anaphylatoxin inactivating activity. Exp. Parasitol. 62: 292-297

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. 1990: Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. Exp. Parasitol. 70: 382-388

Rovenský J. 2009: Revmatologický výkladový slovník. Grada Publishing, Praha. 1. vydání. 203

Shah Y. M., Morimura K., Gonzalez F. J. 2007: Expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in macrophage suppresses experimentally induced colitis. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 292: 657 - 666

Schierack P., Lucius R., Sonnenburg B., Schilling K., Hartmann S. 2003: Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. Infect. Immun. 71: 2422-2429

Slepičková E. 2007: Vliv klíštěcích slin na produkci cytokinu MIP-2 makrofágy. Bakalářská práce

Stites D. P., Terr A. I. 1994: Základní a klinická imunologie. Victoria Publishing, Praha

Toman a kol. 2009: Veterinární imunologie. Grada Publishing, Praha. 2. vydání. 203-204

Valenzuela J. G., Francischetti I. M. B., 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

Wikel S. K., Ramachandra R. N., Bergman D. K., Burkot T. R., Piesman J. 1997: Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *Ixodes scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. Infect. Immun. 65: 335-338

Wolpe S., Sherry B., Juers D. 1989: Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 612-616