

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Charakterizace defensinu klíštěte *Dermacentor marginatus*

Bakalářská práce

Kateřina Leštinová

Vedoucí práce: Mgr. Tereza Chrudimská, Biologické centrum AVČR, Parazitologický ústav, Branišovská 31, České Budějovice.

Fakultní garant: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

České Budějovice

2011

Bakalářská práce:

Leštinová K., 2011: Charakterizace defensinu klíštěte *Dermacentor marginatus*
[Characterization of defensin gene of the tick *Dermacentor marginatus*. Bc. Thesis, in
Czech.] - 51 p, Faculty of Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice,
Czech Republic.

Annotation:

Antimicrobial peptides (AMPs), as a part of innate immune system of ticks and other living organisms, are able to eliminate pathogens. In ticks the most important group of AMPs is defensin family. In this work, defensin from the tick *D. marginatus* was studied. The defensin gene was isolated from *D. marginatus* fed females. Using RT-PCR the gene expression was detected in salivary glands and mitgut. Recombinant protein was expressed in the procaryotic expression system, purified and tested for its antimicrobial activity. Specific polyclonal rabbit antibodies (anti DR IgG) were prepared and tested for their specificity and sensitivity.

Bakalářská diplomová práce byla financována z výzkumného záměru PřF JU MSM 6007665801 a výzkumného centra LC06009.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 1. 2011

.....
Kateřina Leštinová

Velice ráda bych poděkovala zejména své školitelce Tereze Chrudimské a profesoru Liboru Grubhofferovi za možnost pracovat v Laboratoři molekulární biologie vektorů a parazitů, za odborné vedení, podporu a trpělivost při vypracovávání této práce. Mé díky patří také Maryně Golovchenko, Nataše Rudenko, Veronice Dorňákové, Jirkovi Havranovi a Janě Plchové za podporu a příjemnou atmosféru v laboratoři. V neposlední řadě bych velice ráda poděkovala svým rodičům za umožnění studia a velkou trpělivost.

Děkuji

Obsah:

1. Úvod.....	1
2. Cíle práce.....	2
3. Literární přehled.....	3
3.1. Klíšťata (Ixodida).....	3
3.2. Životní cyklus klíšťat.....	3
3.3. Imunitní systém klíšťat.....	4
3.3.1. Antimikrobiální proteiny a peptidy klíšťat.....	5
3.4. Defensiny.....	7
3.4.1. Struktura a funkce defensinů členovců.....	8
3.4.2. Defensiny klíšťat.....	9
3.5. Klíště druhu <i>Dermacentor marginatus</i> (Piják stepní)	12
3.5.1. <i>Dermacentro marginatus</i> jako přenašeč patogenních organismů.....	13
4. Použité chemikálie a primery.....	14
4.1. Použité chemikálie.....	14
4.2. Použité primery.....	16
5. Metody.....	17
5.1. Izolace RNA.....	17
5.2. Syntéza jednovláknové cDNA („single strand cDNA“ = ss c DNA).....	17
5.3. PCR cDNA (Polymerázová řetězová reakce).....	17
5.4. DNA elektroforéza.....	18
5.5. Purifikace PCR produktu.....	19
5.6. Ligace PCR produktu do vektoru pCR® 4-TOPO (Invitrogen).....	19
5.7. Transformace One Shot® TOP 10 E. coli Chemically Competent Cells (Invitrogen).....	19
5.8. Izolace plazmidové DNA z bakteriálních buněk.....	20
5.9. Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu.....	20
5.10. Sekvence.....	20

5.11. Příprava rekombinantního konstruktů v expresním vektoru Champion™ pET 100/D-TOPO®	20
5.12. Exprese proteinu v buňkách „BL 21“	21
5.13. Denaturační purifikace pomocí afinitní chromatografie.....	22
5.14. SDS-PAGE (kontrola po purifikaci).....	22
5.15. Refolding.....	23
5.16. Western blot.....	24
5.17. Detekce rekombinantního proteinu.....	24
5.18. Příprava králičích polyklonálních protilátek.....	25
5.19. Imunodetekce proteinu králičími protilátkami.....	26
5.20. Testování antimikrobiální aktivity rekombinantního proteinu.....	27
6. Výsledky.....	28
6.1. Izolace RNA z klíštěte <i>D. marginatus</i> a syntéza ss cDNA.....	28
6.2. Molekulární charakterizace genu pro defensin.....	29
6.3. Diferenciální exprese genu pro defensin.....	30
6.4. Příprava rekombinantního proteinu.....	31
6.5. Denaturační purifikace rekombinantního proteinu.....	32
6.6. Testování antimikrobiální aktivity rekombinantu.....	33
6.7. Imunodetekce proteinu králičími protilátkami.....	34
7. Diskuze.....	36
7.1. Charakterizace defensinu klíštěte <i>D. marginatus</i>	36
7.2. Diferenciální exprese genu pro defensin.....	37
7.3. Příprava rekombinantního proteinu.....	38
8. Závěr.....	39
9. Použitá literatura.....	40

1. Úvod

Antimikrobiální peptidy a proteiny (AMP) jsou součástí obranných mechanismů všech žijících organismů. Jejich studium je důležité pro vývoj nových antibiotik proti multiresistentním kmenům patogenních mikroorganismů.

Klíšťata patří mezi krev sající parazity přenášející patogenní mikroorganismy na své hostitele. Mezi klíšťata schopna přenášet patogeny na člověka patří klíště *Dermacentor marginatus*, které je rozšířené po celé severní polokouli. Mezi závažná onemocnění způsobené patogeny, která *D. marginatus* přenáší, patří například krymsko-konžská hemoragická horečka, středomořský tyfus, TIBOLA či klíšťová encefalitida (TBE).

Přestože má klíště *D. marginatus* podobné rozšíření a vesměs totožné hostitele jako klíště *Ixodes ricinus* (přenašeč *Borrelia burgdorferi* s. l.), tak je zajímavé, že nepůsobí jako přenašeč onemocnění nazvané Lymeská borelióza. Stejně tak tomu je i na americkém kontinentu, kde klíště *I. scapularis* přenáší původce lymeské boreliózy, zatímco *D. variabilis* nikoliv. Imunitní systém klíšťat rodu *Dermacentor* je schopný eliminovat spirochéty z těla. Přesný mechanismus eliminace není dosud znám. Studium antimikrobiálních proteinů/peptidů klíšťat rodu *Dermacentor* může přispět k identifikaci proteinu schopného zabít spirochéty *B. burgdorferi* s.l.

2. Cíle práce

Tato práce vychází z problematiky řešené v Laboratoři molekulární ekologie parazitů BC, PARÚ AVČR a je zaměřena na charakterizaci antimikrobiálního peptidu, defensinu, který je součástí přirozené imunity klíštěte *Dermacentor marginatus*.

V rámci této práce byly stanoveny následující cíle:

- Vypracování literární rešerše na dané téma
- Izolovat gen pro defensin z klíštěte *D. marginatus*
- Analyzovat diferenciální expresi genu pro defensin v jednotlivých tkáních klíštěte *D. marginatus*
- Připravit rekombinantní konstrukt defensinu klíštěte *D. marginatus* v expresním vektoru ChampionTM pET 100/D-TOPO[®]
- Optimalizovat podmínky exprese, purifikace a Western blotu pro daný protein
- Exprimovat a purifikovat rekombinantní protein
- Výsledky exprese ověřit pomocí SDS-PAGE, Western blotu a MS analýzy
- Připravit králičí polyklonální protilátky a ověřit jejich sensitivitu a specifitu pro daný protein
- Otestovat antimikrobiální aktivitu připraveného rekombinantního defensinu

3. Literární přehled

3.1. Klíšťata (Ixodida)

Klíšťata jsou taxonomicky řazena do kmene členovci (Arthropoda), do třídy pavoukovci (Arachnida) a její podtřídy roztoči (Acari). Z této podtřídy se dále vyčleňuje řád Parasitiformes, který zahrnuje podřád Ixodida (klíšťata).

Ixodida se dělí do tří čeledí: Ixodidae („tvrdá klíšťata“- klíšťata), Argasidae („měkká klíšťata“- klíšťáci) a Nuttallidae. Zástupci těchto čeledí se od sebe liší morfologií, fyziologií, ontogenezí i reprodukční strategií.

Všechny druhy klíšťat se živí krví obratlovců. Během sání krve klíšťe produkuje mnoho biologicky aktivních látek, které mají různou funkci. Ve slinách klíšťete bylo nalezeno velké množství farmakologicky aktivních látek zabraňujících koagulaci krve, agregaci krevních destiček a působících proti imunitním mechanismům hostitele. Ve střevě jsou přítomny trávicí enzymy a další molekuly důležité pro zpracování přijaté potravy. Imunitní systém klíšťat produkuje nespočet molekul hrající důležitou roli v boji proti invadujícím patogenům.

Klíšťata přenášejí nejvíce druhů patogenních organismů ze všech krevsajících členovců, avšak pouze 10% ze všech druhů klíšťat je může přenášet na člověka (Sonenshine, 1991, 1993; Taylor, 2006).

3.2. Životní cyklus klíšťat

Životní cyklus klíšťat čeledi Ixodidae se skládá ze 4 vývojových stádií: vajíčko, larva, nymfa a dospělec. Pohyblivá stadia (larva, nymfa, dospělec) sají krev na svých hostitelích a poté prodělávají přeměnu na stádium následující. V poslední fázi svého vývoje se samice po příjmu krve páří se samcem a klade vajíčka.

Klíšťata mohou mít 3 typy životních cyklů, které se liší počtem hostitelů. Typ cyklu není rodově specifický.

I - jednohostitelský cyklus můžeme najít například u klíšťete *Boophilus annulatus*. U tohoto cyklu mají všechna stadia stejného hostitele.

II - pokud má larva a nymfa nebo nymfa a dospělec stejného hostitele jedná se o tzv. dvouhostitelský cyklus. Tento cyklus je charakteristický například pro severoamarický druh *Dermacentor variabilis* a africký druh *Rhipicephalus evertsi*.

III - u tříhostitelského cyklu má každé stadium klíštěte jiného hostitele. Mezi trojhostitelská klíšťata patří například *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor andersoni* či *Rhipicephalus sanguineus*. (Sonenshine 1991; Baty, Marquart 1996; Volf, Horák a kol 2007).

3.3. Imunitní systém klíšťat

Tělo klíšťat je vystaveno mnoha různým patogenním organismům, které mohou klíště infikovat. Při každém sání riziko infekce vzrůstá. Eliminace těchto mikroorganismů z těla je hlavním úkolem obranného systému klíšťat.

Jako ostatní bezobratlí živočichové mají klíšťata pouze tzv. přirozenou (nespecifickou, paměť postrádající) imunitu. Jejich imunitní systém je schopen reagovat velice rychle a zahrnuje dvě složky: buněčnou a humorální, které se vzájemně doplňují.

Buněčná imunita je zastoupena hemocyty (buňkami hemolymfy). Morfologie a ultrastruktura hemocytů je velice složitá a u jednotlivých druhů klíšťat se počet typů a jejich struktura a funkce může lišit (Borovičková a Hypša, 2005). Nejjednodušeji se tyto buňky dělí na tři základní typy dle jejich ultrastruktury: granulocyty typu I, granulocyty typu II a plasmocyty, které mají ve své struktuře pouze malá granula (Kuhn a Haug, 1994). Hlavními funkcemi hemocytů jsou fagocytóza, enkapsulace a nodulace, stejně tak i produkce různých imunitních molekul.

Funkce hemocytů je silně spjata s funkcí humorálních látek. Složky humorální imunity jsou schopny rozpoznávat povrchové molekuly (β -1,3-glukany, lipopolysacharidy (LPS) nebo peptidoglykany (PGN)) invadujících mikroorganismů a tím je označovat (opsonizovat) pro výkonnou složku - hemocyty. Nejvíce prostudovanými opsoniny u klíšťat a dalších bezobratlých živočichů, jsou lektiny, látky schopné rozpoznávat a vázat se na cukernaté zbytky molekul v membránách a buněčných stěnách cizorodých organismů. Humorální složka imunity dále zahrnuje antimikrobiální proteiny, jako jsou například defensiny a lysozomy (Taylor, 2006).

3.3.1. Antimikrobiální proteiny a peptidy klíšťat

Významnou složkou imunitního systému klíšťat jsou antimikrobiální proteiny a peptidy (AMP), které jsou součástí jak buněčné, tak humorální imunity klíšťat. AMP jsou v přírodě široce rozšířené, vyskytují se nejen u klíšťat, ale také u jednobuněčných organizmů a všech říší mnohobuněčných organizmů.

AMP se vzájemně velice liší ve své aminokyselinové sekvenci a tím i v sekundární struktuře. Všechny AMP vykazují různě silné působení proti široké škále mikroorganismů, jakými jsou například viry, bakterie, kvasinky či jednobuněční a mnohobuněční parazité.

AMP klíšťat mohou být klasifikovány podle sekvenční podobnosti a funkční aktivity do několika skupin: (i) lektiny, (ii) lysozomy, (iii) lineární antimikrobiální peptidy, (iv) antimikrobiální proteiny bohaté na histidin a (v) defensiny (Bulet et al., 2004).

i – Lektiny se vážou na buněčné stěny mikroorganismů. Vazba se uskutečňuje pomocí interakce lektinů s cukernými složkami buněčných stěn (například na zbytky kyseliny sialové nebo N-acetyl-D-glukosaminu). Tímto způsobem jsou schopné agregovat a opsonizovat vniklé mikroorganismy. První klíštěcí lektin byl charakterizován u klíštěčka *O. moubata*. Byl nazván Dorin M a má afinitu k sialové kyselině. Bylo prokázáno, že je produkován slinnými žlázami a hemocyty (Grubhoffer & Kovář, 1998; Kovář et al., 2000; Rego et al., 2006). V roce 2007 byl u stejného druhu identifikován další lektin, galektin (OmGalec), který má afinitu k disacharidům (Huang et al., 2007).

U klíštěte *Ixodes ricinus* byl popsán další lektin - Ixoderin. Byly nalezeny 2 isoformy tohoto lektinového genu. Ixoderin A, jehož exprese byla detekována ve slinných žlázách, střevě a hemocytech, a ixoderin B, který je exprimován převážně ve slinných žlázách. V hemocytech byla detekována pouze slabá exprese (Rego et al., 2005). Lektiny byly dále nalezeny i u dalších druhů klíšťat jako například *O. tholozani*, *O. tartakovskyi*, *Argas polonicus* nebo *R. appendiculatus* (Grubhoffer et al., 2004; Grubhoffer et al., 2008).

ii - Lysozomy jsou enzymy, které mají schopnost štěpit β -1,4-glykosidické vazby peptidoglykanů (mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetylglukosaminem) v buněčných stěnách bakterií. Díky tomu mají tyto AMP přímou bakteriolytickou aktivitu. Lysozomy se dále dělí podle typu, na c-lysozomy (chicken), g-lysozomy (goose) a i-lysozomy (invertebrates), (Kopáček et al., 1999; Grunclová et al., 2003; Simser et al., 2004).

Lysozym nalezený u klíšťáka *O. moubata* patří do skupiny c-lysozymů, které jsou charakteristické osmi konzervovanými cysteinovými residui (Kopáček et al., 1999). Tento tzv. TGL (Tick Gut Lysozyme) má stejně jako ostatní c-lysozomy 8 konzervovaných cysteinových zbytků, ale od ostatních lysozymů typu c se liší výskytem histidinu na místě běžně se vyskytujícího tyrosinu. Podle fylogenetických analýz se TGL řadí do skupiny tzv. „H – branched lysozymes“ spolu s lysozomy nalezenými u hmyzu rodu *Drosophila melanogaster* a *Anopheles gambiae* (Grunclová et al., 2003).

U dvou klíšťat rodu *Dermacentor* byl také nalezen c-lysozym. U *D. variabilis* byla pozorována jeho exprese v hemocytech a u *D. andersoni* v zárodečné buněčné linii. Od lysozymu nalezeného u klíšťáka druhu *O. moubata* se tyto lysozomy liší ve své primární aminokyselinové struktuře (Simser et al., 2004). Lysozomy byly dále izolovány i z dalších druhů klíšťat, např.: *Alveonassus lahorensis*, *O. papillipes*, *I. persulcatus* a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Podboronov VM, 1990; Kopáček et al., 1999).

iii – Antimikrobiální peptid Ixosin byl izolován ze slinných žláz klíštěte *Ixodes sinensis*. Je prvním lineárním antimikrobiálním peptidem nalezeným u klíšťat. Je složen z 23 aminokyselin a ve své aminokyselinové sekvenci postrádá cysteiny, což ho odlišuje od lysozymů, defensinů či proteinů bohatých na histidiny. Ixosin má široké spektrum antimikrobiálních účinků. Je aktivní proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*, i proti kvasince *C. albicans* (Yu et al., 2006).

U stejného druhu klíštěte byl dále identifikován Ixosin-B. Je to také lineární peptid izolovaný ze slinných žláz tohoto klíštěte. Je složen z 32 aminokyselin a ve své sekvenci také nemá žádné cysteiny. Ixosin-B vykazuje silnější antimikrobiální aktivitu proti *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans* než Ixosin (Liu et al., 2008).

ISAMP (*Ixodes scapularis* antimicrobial peptide): 5,3 kDa velký peptid, byl izolován ze slinných žláz klíštěte *Ixodes scapularis*. Stejně jako Ixosin neobsahuje ve své aminokyselinové sekvenci cysteinové zbytky, což dává předpoklad, že se jedná o lineární peptid. Exprese tohoto peptidu byla prokázána v hemocytech, tukové tkáni a slinných žlázách. ISAMP vykazuje antimikrobiální aktivitu proti Gram-positivním bakteriím *S. aureus*, *Bacillus subtilis* a *B. cereus*, i proti Gram-negativní bakterii *E. coli* (Pichu et al., 2009).

iv – U klíšťat byly identifikovány dva proteiny bohaté na histidiny hebraein (Lai et al., 2004 A) a microplusin (Fogaca et al., 2004). Tyto dva AMP obsahují 6 cysteinů ve své primární struktuře.

Hebraein byl vyizolován z hemolymfy klíštěte *Amblyomma hebraeum*. Má 102 aminokyselin a na svém C-konci obsahuje charakteristický shluk 9 histidinů. Je zajímavý svou unikátní sekundární „multi- α -helical“ strukturou (4-6 α -helixů). Má velice široké spektrum antimikrobiálního působení. Bylo prokázáno, že je aktivní proti Gram-positivní bakterii *S. aureus*, proti Gram-negativní bakterii *E. coli* a proti kvasinkám *C. glabrato* a *C. albicans* (Lai et al., 2004 A).

Z bezbuněčné plasmy klíštěte *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* byl izolován antimikrobiální protein microplusin. Tento AMP je 10,204 kDa velký. Expres genu pro microplusin byla pozorována v ováriích, tukové tkáni a hemocytech. Ve své struktuře má 6 cysteinových residuí a 3 disulfidické můstky. Přesto, že microplusin nepůsobí na membránu bakterií, vykazuje bakteriostatickou antimikrobiální aktivitu proti Gram-positivním bakteriím a kvasinkám. Při pokusech s *Micrococcus luteus* bylo dokázáno, že je tato aktivita následkem schopnosti microplusinu vázat na sebe ionty mědi, které jsou důležité pro respiraci bakterií a další životně důležité procesy. Díky tomu, že je schopen vázat ionty Cu^{2+} , zpřístupní tyto životně důležité ionty bakteriím a tím způsobí jejich smrt (Fogaca et al., 2004; Silva et al., 2009).

3.4. Defensiny

Defensiny jsou jednou ze skupin antimikrobiálních peptidů, které se vyskytují napříč spektrem živočišné i rostlinné říše. V živočišné říši byly objeveny jak u obratlovců, tak u bezobratlých. Defensiny bezobratlých živočichů a obratlovců mají stejný mechanismus působení, ale nevykazují žádnou sekvenční podobnost. První defensin členovců byl izolován ze zárodečné linie masařky *Sarcophaga peregrina* (Matsuyama and Natori, 1988). Další hmyzí defensiny byly identifikovány například u komára *Aedes aegypti* (Lowenberger et al., 1999, 2001), u mušky *Phlebotomus duboscqui*, jejíž defensin vykazuje antiparazitickou aktivitu proti prvoku *Leishmania major* (Boulanger et al., 2004), u octomilky *Drosophila melanogaster* (Imler and Bulet, 2005), u mravenců druhu *Formica rufa* (Taguchi et al., 1998), a *Formica aquilonia* (Viljakainen and Pamilo, 2005). U včely medonosné *Apis mellifera* byly objeveny dva strukturně odlišné defensiny (Klaudiny et al., 2005). Další defensiny

bezobratlých živočichů byli identifikovány u améb (Leippe, 1999), škorpiónů (Cociancich et al., 1993; Zhu et al., 2000), pavouků (Baumann et al., 2010), mlžů (Charlet et al., 1996) a klíšů (Johns et al., 2001; Nakajima et al., 2001, 2002; Fogaca et al., 2004; Rudenko et al., 2005; Tsuji et al., 2007; Chrudimská et al., 2010).

3.4.1. Struktura a funkce defensinů členovců

Defensiny členovců se exprimují jako prepropeptidy. Aminokyselinová sekvence preprodefensinu má tři části: signální sekvenci, pro-segment a tzv. mature (zralou) funkční část defensinu (Nakajima et al., 2001).

Zralá funkční forma defensinu je asi 4kDa velký kladně nabitý peptid. Primární struktura defensinu obsahuje 6 cysteinových residuí, které jsou spojené třemi disulfidickými (S-S) vazbami (párování cysteinů: cys1-cys4; cys2-cys5; cys3-cys6). S-S vazby dávají defensinům správnou 3D strukturu. Jejich α -helix obsahuje hydrofobní i hydrofilní části a je dvěma disulfidickými můstky napojen na antiparalelní β -list (Baty, Marquart, 1996; Nakajima et al., 2003 B).

Defensiny působí na cytoplazmatickou membránu bakterií. Stejně jako ostatní kationické peptidy depolarizují záporně nabitou membránu bakterií, čímž v ní vznikají trhlinky. Ty se postupně zvětšují v kanálky, kterými dochází k úniku iontů, což vede k destrukci patogenu (Nakajima et al., 2003 B). Cytoplazmatická membrána ale nemusí být jediným místem v bakterii, kam defensiny směřují svojí aktivitu. Může být mnoho dalších anionických cílů pro tyto kationické AMP v buňce bakterie, jako je třeba DNA, RNA a enzymy (Hancock et al., 2002).

Bylo prokázáno, že defensiny efektivně působí proti Gram-pozitivním bakteriím (Matsuyama and Natori, 1988; Nakajima et al., 2003 B; Saito et al., 2009; Isogai et al., 2011) a některé izoformy defensinů vykazují antimikrobiální aktivitu i proti Gram-negativním bakteriím (Kocan et al., 2008), kvasinkám (Charlet et al., 1996; Tsuji et al., 2007) a prvokům (Boulanger et al., 2004; Tsuji et al., 2007).

3.4.2. Defensiny klíšťat

U klíšťat jsou defensiny a defensinům podobné peptidy nejvíce studované antimikrobiální peptidy. Defensiny klíšťat se nejvíce podobají defensinům vážek, šcorpionů a mlžů (Nakajima et al., 2001, 2002, 2003). Defensiny byly identifikovány u několika druhů klíšťat. Jednotlivé klíštěcí defensiny se od sebe liší svou primární aminokyselinovou strukturou, tkáněmi, ve kterých probíhá exprese, i funkcí.

Defensiny klíšťat rodu *Dermacentor*

Z hemolymfy klíštěte *Dermacentor variabilis* byl izolován první defensin v rámci čeledi Ixodidae. Tento 4,229 kDa velký kationický defensin byl nazván Varisin. Aminokyselinová sekvence vykazuje 83% podobnost s defensinem nalezeným u šcorpiona *Leiurus quinquestriatus*. Je aktivní proti Gram-positivním bakteriím (Johns et al., 2001). Exprese Varisinu byla detekována ve střevě. V hemolymfě klíštěte *D. variabilis* byla exprese detekována po stimulaci klíštěte spirochétami *B. burgdorferi*.

Po infekci bakteriemi *B. subtilis*, *E. coli* či *B. burgdorferi* byla detekována exprese dalšího defensinům podobného peptidu ve střevě (Sonenshine et al., 2002). Následně byl z hemocytů tohoto klíštěte izolován preprodefensin, identický s Varisinem (odlišnost 1 aminokyseliny). Defensin je v hemocytech skladován a po infekci bakterií je uvolňován do hemolymfy (Ceraul et al., 2003).

Velice zajímavé je, že utlumení exprese Varisinu pomocí RNAi (interference) má za následek snížení počtu Gram-negativních bakterií druhu *Anaplasma marginale* v klíštěti (předpokládaný účinek RNAi byl opačný), (Hynes et al., 2008; Kocan et al., 2008).

Exprese další izoformy defensinu, defensin-2, byla detekována ve střevě a tukové tkáni v *D. variabilis* po infekci *Rickettsia montanensis*. Dalším místem jeho exprese jsou ovária (Ceraul et al., 2007). Rozsáhlý výzkum na klíštěti *D. variabilis* byl proveden týmem Jaworski et al. Identifikovali více než 30 genů, které by mohly kódovat proteiny imunitního systému tohoto klíštěte. Mezi těmito geny byl identifikován nový gen kódující defensin pojmenovaný Varisin B (Jaworski et al., 2010).

Gen pro defensin byl nalezen také u klíšťat druhu *D. marginatus* a *D. reticulatus*. Na aminokyselinové úrovni se defensin z klíštěte *D. marginatus* podobá sekvenci Varisinu z klíštěte *D. variabilis* z 93% (Chrudimská et al., 2010).

Defensiny klíšťáků rodu *Ornithodoros*

U klíšťáka druhu *O. moubata* byly identifikovány 4 izoformy defensinu (defA, defB, defC a defD). V roce 2001 byly purifikovány první 2 izoformy (defA a def B) z hemolymfy tohoto klíšťáka (Nakajima et al., 2001). Expres těchto izoform defensinu byla pozorována ve střevě, v tukovém tělese, v reprodukčních orgánech a v hemolymfě (Nakajima et al., 2001, 2002, 2003A). Aminokyselinová sekvence tohoto defensinu je homologická ke škorpiónímu defensinu. Následně byly z tohoto klíšťáka postupně získány další izoformy defensinu. (Nakajima et al., 2002). Všechny tyto izoformy jsou kódovány jako preprodefensin a v mature části peptidu jsou si z 78% podobné. Jejich geny jsou tvořeny čtyřmi exony a třemi introny.

Expres genů těchto izoform defensinu byla prokázána u všech vývojových stádií klíšťáka (Nakajima et al., 2002). Tyto čtyři izoformy byly rozdělené do dvou skupin podle místa primární exprese: 1) ve střevě: u defA, defB a defC byla exprese pozorována nejvíce ve střevě a slabší se prokázala exprese v tukovém tělese a v reprodukční soustavě.

2) v tukovém tělese: u poslední izoformy defD byla v tukovém tělese pozorována mnohem silnější exprese než ve střevě.

Byly prováděny testy s *E. coli* a *M. luteus*. Odpovědí na vstříknutí *E. coli* a *M. luteus* do hemocoelu bylo zvýšení exprese všech 4 izoform defensinu z klíšťáka *O. moubata*. Spolu s bakteriemi byly testovány i samotné složky buněčných stěn bakterií a to LPS (specifická pro Gram-positivní bakterie), LTA (= lipoteichová kyselina, specifická pro Gram-negativní bakterie) a PGN (společná pro Gram-positivní i Gram-negativní bakterie). I v těchto testech byla pozorována odpověď organismu na infekci a to zvýšenou expresí defensinu. Pro zvýšení exprese defensinu tedy stačí pouhá přítomnost složek buněčných stěn bakterií v organismu klíšťáka (Nakajima et al., 2003A).

Fylogenetické analýzy sekvencí prokázaly vysokou homologii všech 4 izoform k defensinům škorpiónů, vážek a mlžů. Nakajima et al. v roce 2001 nastínil možnost existence dvou fylogenetických skupin defensinů. Do první skupiny patří defensiny prastarých členovců, jako jsou škorpióni a vážky, defensiny mlžů a defensiny klíšťáka *O. moubata*. Do druhé skupiny pak patří Neoptera (novokřídlý hmyz), (Nakajima et al., 2001, 2002).

U klíšťáků druhu *O. tartakovskyi*, *O. puertoricensis*, *O. papillipes* a *O. rostratus* byly identifikovány další izoformy genu pro defensin. Tyto izoformy byly porovnávány s defensiny nalezenými u klíšťáka *O. moubata* (defA, defB, defC a defD) a dle sekvenční homologie byly obdobně pojmenovány (*O. tartakovskyi* a *O. puertoricensis* - nalezeny izoformy A a B, *O. papillipes* - izoformy A, B a D; *O. rostratus* izoforma A). Dle vysoké sekvenční shody jednotlivých izoform defensinů těchto druhů (někde až 100% na

aminokyselinové úrovni) je možno očekávat nalezení všech 4 izoform (A, B, C a D) genu pro defensin u všech zástupců rodu *Ornithodoros* (Nakajima et al., 2001; Chrudimská et al., 2010).

Defensiny a defensinům podobné peptidy klíšťat rodu *Ixodes*

U evropského klíštěte *Ixodes ricinus* byly nalezeny dvě izoformy genu pro defensin - Def1 a Def2, jejichž exprese byla prokázána u nasáté samice ve střevě. Geny pro tyto izoformy obsahují tři exony od sebe oddělené dvěma introny (Rudenko et al., 2005; Rudenko et al., 2007).

U amerického klíštěte *Ixodes scapularis* byla objevena jedna izoforma genu pro defensin. Bylo dokázáno, že tento gen se exprimuje ve střevě, tukové tkáni a hemocytech, ale nativní peptid se nepodařil v žádné z těchto tkání následně detekovat (Hynes et al., 2005).

U asijského klíštěte *Ixodes persulcatus* byl identifikován též jeden gen pro defensin (Persulcatusin), který je primárně exprimován ve střevě tohoto klíštěte. U tohoto defensinu byla zaznamenána antimikrobiální aktivita proti několika druhům Gram-positivních bakterií (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* a *Corynebacterium renale*), (Saito et al., 2009).

Defensiny a defensinům podobné peptidy klíštěte *Haemaphysalis longicornis*

U klíštěte druhu *Haemaphysalis longicornis* byl nalezen defensin Longicin. Tento peptid je velký 5,82 kDa a kromě 6 cysteinových residuí má ve své sekundární struktuře β -skládaný list na C-konci. Longicin působí proti parazitickému prvoku *Babesia sp.* (*in vivo* i *in vitro*). Dále vykazuje silné antifungální i antibakteriální účinky (Tsuji et al., 2007; Rahman et al., 2010).

Ze slinných žláz tohoto druhu klíštěte byl vyizolován 5,37 kDa velký defensinu podobný peptid Longicornsin. Díky svým 6 cysteinům ve své sekvenci se podobá dalším defensinům podobným antimikrobiálním peptidům. Tento AMP je aktivní proti bakteriím *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* a *Helicobacter pylori*. Proti kvasince *C. albicans* vykazuje pouze slabý antifungální účinek (Lu et al., 2010).

Hlgut-defensin a Hlsal-defensin jsou další dva geny kódující defensinům podobné AMP. Expese genu pro Hlgut-defensin byla detekována ve střevě, pro Hlsal-defensin ve slinných žlázách. Oba proteiny (přeložená nukleotidová sekvence do aminokyselinové) mají stejný cysteinový motiv, jaký nacházíme u defensinů, ale skládají se ze 73 aminokyselin

(Hlgut-defensin) a 81 aminokyselin (Hlsal-defensin). Oba proteiny nesou pravděpodobně negativní náboj, který je u rodiny defensinů neobvyklý (Zhou et al., 2007).

Defensin a defensinům podobné peptidy klíšťat rodu *Amblyomma*

U klíštěte *A. hebraeum* byly identifikovány dva defensinům podobné peptidy nazvané *Amblyomma* defensin peptid 1 a *Amblyomma* defensin peptid 2, které byly izolovány z hemolymfy. Oba tyto peptidy mají též negativní náboj, což je odlišuje od ostatních, kladně nabitých, defensinů. Zvýšení exprese *Amblyomma* defensin peptidu 1 bylo prokázáno první 4 dny po sání. Druhý peptid vykazuje antimikrobiální aktivitu proti Gram-positivní bakterii *S. aureus* a proti Gram-negativní *E. coli*. Proti kvasinkám aktivní není. *Amblyomma* defensin peptid 2 je velký 4,613 kDa (Lai et al., 2004 B).

Z klíštěte *A. americanum* byl izolován defensin nazvaný Americin. Tento defensin se více podobá defensinům z klíšťat *D. variabilis* a *I. scapularis* než k výše zmíněným defensinům podobným peptidům z *A. hebraeum* (Todd et al., 2007).

3.5. Klíště druhu *Dermacentor marginatus* (Piják stepní)

Klíště *Dermacentor marginatus* patří do čeledi Ixodidae. Klíšťata tohoto druhu jsou rozšířena po celé severní polokouli a jejich běžným stanovištěm jsou stepní oblasti a v menší míře i lesy.

Piják stepní je tříhostitelské klíště. Jeho vývojový cyklus zahrnuje 4 stádia: vajíčko, larva, nymfa a dospělec (imago). Z vajíčka se líhne larva, která saje na prvním hostiteli, kterým je většinou drobný hlodavec. Hostiteli dalšího stadia, nymfy, bývají pak již větší obratlovci, například zajáci, ježci, veverky, psi nebo kočky. Po metamorfóze z nymfy na imago dochází k sání na posledním hostiteli, kterým bývá již větší zvíře, jako jelen, srnec, liška, ale také pes či kočka. Po naklazení vajíček samice hyne. Celý vývojový cyklus může v našich zeměpisných šířkách trvat 2 až 3 roky (Sonenshine, 1991; Volf, Horák et al., 2007).

Říše	Animalia
Kmen	Arthropoda
Podkmen	Chelicerata
Třída	Arachnida
Podtřída	Acari
Řád	Parasitiformes
Podřád	Ixodida
Čeleď	Ixodidae
rod	<i>Dermacentor</i>
druh	<i>D. marginatus</i>

Tab. I.: systematické zařazení pijáka stepního

3.5.1. *Dermacentor marginatus* jako přenašeč patogenních organismů

Piják stepní je cizopasník malých i větších savců, člověka napadá jen zřídka. Je přenašečem, virových, bakteriálních i protozoálních onemocnění.

K virům přenášeným klíštětem *D. marginatus* patří RNA virus z čeledi *Bunyaviridae* vyskytující se v Jižní a Východní Evropě, který způsobuje onemocnění nazvané Krymsko-konžská hemoragická horečka. (Sonenshine, 1993). Dalším virovým onemocněním, které toto klíště přenáší je klíšťová encefalitida, kterou způsobuje virus z čeledi *Flaviviridae* (Kozuch & Nosek, 1971).

Z původců bakteriálních onemocnění jsou klíštětem *D. marginatus* přenášeny především bakterie rodu *Rickettsia*. *Rickettsia conori*, původce středomořské eruptivní horečky (středomořský tyfus), přenáší i další klíšťata jako *Ixodes ricinus* a *D. reticulatus* (Sonenshine, 1993). Další rickettsiosou přenášenou klíšťaty rodu *Dermacentor* je severoasijský klíšťový tyfus, způsobený *R. sibirica*, který se rozšířil z Blízkého východu až na území České republiky. Přenašeči této bakterie jsou převážně klíšťata rodu *Dermacentor* (*D. marginatus*, *D. nuttalli*, *D. silvarum*, *D. reticulatus*), (Sonenshine, 1993; Gosteva et al., 1991). Pijákem stepním je běžně přenášena *Rickettsia slovaca* a to na Slovensku (Boldiš, Špitalská, 2009), ve Španělsku (Ortuño et al., 2006), ve Francii (Sanogo et al., 2003) či v Chorvatsku (Punda-Polic et al., 2002). *Rickettsia slovaca* je původcem onemocnění zvané TIBOLA (nemoc lymfatických uzlin).

Babesiosa psovitých šelem, způsobená prvoky *Babesia canis* a *B. gibsoni* je přenášena klíštětem *D. marginatus*, ale i dalšími druhy klíšťat jako je například *Rhipicephalus sanguineus* nebo *D. reticulatus*. Hlavními příznaky této choroby je anemie, hypoxie a horečka (Sonenshine, 1993; Pietrobelli et al., 2007).

4. Použité chemikálie a primery

4.1. Použité chemikálie

RNA elektroforéza	
1x TBE pufr	89 mM Tris base, 89 mM kyselina boritá, 2 mM Na ₂ EDTA, pH 8,0
Agaroza	RNA Agarose (bez RNás) (Invitrogen)
Vzorkový pufr pro RNA	2x RNA Loading Dye Solution (Fermentas)
Marker	RNA Ladder High Range (Fermentas)
DNA elektroforéza	
50x TAE pufr	200 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA
Agaroza	Agarose SERVA
Vzorkový pufr pro DNA	6x Orange Loading Dye Solution (Fermentas) + SYBR Green (Sigma)
Marker	GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas)
Expresní a klonovací plazmidy (vektory)	
pET 100/D-TOPO®	Invitrogen – selekce přes ampicilin
pCR® 4 TOPO®	Invitrogen – selekce přes ampicilin
Živná media a půdy pro pěstování bakterií	
S.O.C. medium (Invitrogen)	2% bacto-trypton, 0.5% bacto-yeast extract, 0.05% NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM Mg SO ₄ , 20 mM glukóza, pH 7,0; Sterilní
LB agar	1.5% bacto-agar v LB médiu
LB medium	1% bacto-trypton, 0.5% bacto-yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7,0; Sterilní
Antibiotika	Ampicilin (SIGMA), (zásobní roztok 50 mg/ml H ₂ O)

SDS page	
30 % AA	Acrylamid a bisacrylamid (37.5:1)
10 % SDS	Laurylsulfát sodný
10 % APS	Amonium persulfát
TEMED (MERC)	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamine
10x Running pufr E	250 mM Tris, 1.92 mM glycin, 1% SDS
Barvicí roztok	Page Blue™ (Invitrogen)
5x vzorkový pufr pro proteiny	250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 500 mM dithiothreitol, 10% SDS, 0.2% bromophenol blue, 50% glycerol
Western Blotting	
Acetátový blotovací pufr	100 mM amonium acetát, 10 % methanol, pH 5,0
Klasický blotovací pufr	20 % methanol, 25 mM Tris-Base, 150 mM glycin, pH 7,0 - 9,5
Purifikace	
Promývací pufr	8 M močovina, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazol, pH 8,0
Eluční pufr 1	8 M močovina, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 250 mM imidazol, pH 8,0
Eluční pufr 2	8 M močovina, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 1 M imidazol, pH 8,0
Refolding	
Pufr 1	8 M močovina, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,0
Pufr 2	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 20% Glycerol, pH 6,5
Pufr 3	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 6,0-7,0
Solubilizační roztok	8 M močovina, 20 mM tris-HCl, 0,5 M NaCl, 5 mM imidazol, 1 mM beta- merkptoethanol, pH 8,0

Imunodetekce Ni-NTA konjugáty	
1x TBS	10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,5
1x TBS-Tween	20 mM Tris-Cl, 500 mM NaCl, 0.05% Tween, pH 7,5
Blokovací pufr	3% BSA v 1x TBS
10x Tris-saline	9% NaCl v 1M Tris-Cl, pH 8,0
Barvicí roztok	18 mg 4 chloro-1-naftol, 6 ml methanolu, 24 ml 1x Tris-saline, 60 µl 30% H ₂ O ₂

4.2. Použité primery (Generi Biotech, Hradec Králové)

D.margF-mature	5' - CAC CGG CTT CGG ATG CCC ACT G -3'
D.margR-mature	5' - TTA ATT CCT GTA GCA GGT GCA GG -3'
DEF-Dermac.F	5' - ATG CGC GGA CTT TGC ATC -3'
DEF-Dermac.R	5' - TTA ATT CCT GTA GCA GGT GC -3'
ACTbetaDM-F	5' - ATG TGT GAC GAC GAG GTT GCC GC -3'
ACTbetaDM-R	5' - GTA CAG CGA CAG CAC GGC CTG G -3'
T7-Forw	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
T7-Rev	5' - GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3'
M13-Forw	5' - GTA AAA CGA CGG CCA -3'
M13-Rev	5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'

5. Materiál a metody

5.1. Izolace RNA

Pro izolaci RNA byly použity 2 samice klíštěte *D. marginatus*, které sály na zdravých morčatech po dobu 6ti dní. Klíšťata byla homogenizována ve sterilní zkumavce za použití Trizol® Reagent (Invitrogen) v poměru 1 ml roztoku na 50-100 mg tkáně. RNA byla izolována dle přiloženého návodu.

Pro izolaci RNA ze slinných žláz, střeva, hemolymfy, malpigických trubic a ovarií plně nasátých klíšťat bylo použito 8 nasátých samic *D. marginatus*. Z odebraných tkání byla provedena izolace RNA pomocí RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) dle doporučeného postupu.

Kvalita RNA byla zhodnocena pomocí elektroforézy v 1,2 % agarosovém gelu v 1x TBE pufru a spektrofotometricky. Výsledek byl kontrolován pod UV světlem a fotograficky zaznamenán fotoaparátem Olympus CAMEDIA C-5060. Alikvoty izolované RNA byly uloženy při -70°C.

5.2. Syntéza jednovláknové cDNA („single strand cDNA“ = ss cDNA)

Požadovaná cDNA byla syntetizována pomocí kitu RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Syntéza ss cDNA probíhala dle protokolu přiloženého výrobcem (byl použit random hexamer primer). Pro reakci bylo použito 5 ng RNA.

Koncentrace získané ss cDNA byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop 1000 3.7.1. Poté byly vzorky zamrazeny a uchovány při -20 °C.

5.3. PCR (Polymerázová řetězová reakce)

Amplifikace požadovaných genů byla provedena na ss cDNA naředěné na stejnou koncentraci (200 ng/μl). Byly použité specifické primery (DEF-Dermac.F a DEF-Dermac.R, Generi Biotech), které byly navrženy dle nukleotidové sekvence pro defensin klíštěte *D. marginatus* (Chrudimská et al., 2010) přístupné v databázi GenBank™ (přístupový kód sekvence: FJ222583). Jako pozitivní kontrola úspěšnosti amplifikační reakce byly použity

specifické primery pro klíčící „house-keeping“ gen β -actin: ACTbetaDM-F a ACTbetaDM-R (Generi Biotech). Primery pro tento gen byly navrženy dle dostupných sekvencí z GeneBank™ z klíčiče *Dermacentor variabilis* (přístupový kód sekvence: EF 488512) a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (přístupový kód sekvence: AY 255624). Pro PCR reakci byly použity 0,1 mM roztoky primerů. Reakce probíhala v 0,2 ml tenkostěnné zkumavce, v přístroji Mastercycler (Eppendorf)

Složení PCR reakce:

2x PCR Master Mix (Promega).....	10 μ l
Forw. primer.....	0,5 μ l
Rev. primer.....	0,5 μ l
dH ₂ O.....	7 μ l
<u>cDNA.....</u>	<u>2 μl</u>
celkem.....	20 μ l

Program pro amplifikaci defensinového genu:

95 °C.....	5 min	
95 °C.....	30 sec	} 30 cyklů
41 °C.....	45 sec	
72 °C.....	80 sec	
72 °C.....	10 min	

Pro amplifikaci β -actin genu byla nastavena nasedací teplota primeru 60 °C (30 sekund) a amplifikace probíhala 28 cyklů.

5.4. DNA elektroforéza

Výsledek PCR reakce byl analyzován pomocí DNA elektroforézy v 1,5% agarozovém gelu v 1x TAE pufru. Elektroforéza byla prováděna na aparatuře GEL XL ULTRA V-2, Pagnet

(Pagnet International, Inc.) při napětí 100 V přibližně 30-40 minut. Výsledek byl kontrolován pod UV světlem a fotograficky zaznamenán fotoaparátem Olympus CAMEDIA C-5060.

5.5. Purifikace PCR produktu

Izolace PCR produktu vyříznutého z gelu byla provedena pomocí kitu QIAquick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN), dle návodu poskytnutého výrobcem. Produkt byl eluován 30 μ l ddH₂O.

5.6. Ligace PCR produktu do vektoru pCR[®] 4-TOPO[®] (Invitrogen)

Purifikovaný PCR produkt byl ligován do vektoru pCR[®] 4-TOPO[®] (Invitrogen) dle návodu poskytnutého výrobcem. Ligační směs obsahovala 2 μ l PCR produktu, 0,5 μ l SALT Solution a 0,5 μ l vektoru pCR[®] 4-TOPO[®] (Invitrogen). Ligační směs byla inkubována při pokojové teplotě po dobu 15 minut a následně byla použita pro transformaci kompetentních buněk One Shot[®] TOP 10 *E. coli* Chemically Competent Cells (Invitrogen).

5.7. Transformace One Shot[®] TOP 10 *E. coli* Chemically Competent Cells (Invitrogen)

Kompetentní buňky One Shot[®] TOP 10 *E. coli* Chemically Competent Cells (Invitrogen) byly skladovány při -70 °C. Po rozmrazení na ledu byly k buňkám přidány 2 μ l ligační směsi z předešlého kroku. Směs byla jemně promíchána a inkubována na ledě 30 minut. Buňky byly vystaveny tepelnému šoku (42°C, 30 sekund) a následně ihned ochlazeny na ledu. K buňkám bylo přidáno 250 μ l S.O.C. media (Invitrogen). Následovala inkubace 1 hodinu při 37 °C na třepačce. Poté byla transformační směs rozetřena na Petriho misku s LB/agarem (50 μ g/ml ampicilin). Misky byly inkubovány přes noc při 37 °C.

Druhý den byly vybrané kolonie přeočkovány do LB media s ampicilinem a kultivovány přes noc na třepačce při 37 °C. Následující den buňky stočeny (5000x g, 5 minut) a bakteriální pelet byl uchován při -20°C do dalšího použití.

5.8. Izolace plazmidové DNA z bakteriálních buněk

Plazmidová DNA byla izolována z buněčného peletu pomocí kitu GeneJET™ Plazmid Miniprep Kit (Fermentas) podle protokolu doporučeného výrobcem. Plazmid byl eluován 50 µl ddH₂O.

5.9. Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu

K ověření přítomnosti inzertu v plazmidu pCR® 4-TOPO byla použita metoda PCR se specifickými primery pro defensin (DEF-Dermac.F a DEF-Dermac.R) Produkty PCR byly analyzovány na 1,5 % agarozovém gelu (1x TAE pufr).

5.10. Sekvenace

K sekvenaci byly použity plazmidy, u kterých byla prokázána přítomnost inzertu. Vzorky byly naředěny (3 µl plazmidové DNA a 4 µl H₂O) a pro reakci byly použity 3,2 pmol primery - M13-Forw a M13-Rev. Vzorky byly sekvenovány v servisní laboratoři Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity a Biologického centra Akademie věd v Českých Budějovicích na sekvenátoru ABI 3130 (Applied Biosystems) za použití sekvenčního kitu „Big Dye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Applied Biosystems).

5.11. Příprava rekombinantního konstruktů v expresním vektoru Champion™ pET 100/D-TOPO®

PCR produkt vhodný pro klonování do expresního plazmidu pET 100/D-TOPO® (Invitrogen) byl připraven pomocí specifických primerů: D.margF-mature a D.margR-mature, kde 5' konec forward primeru byl navržen tak, aby na začátku (před start kodonemATG) obsahoval sekvenci CACC, která je důležitá pro správnou orientaci PCR produktu do vektoru. Reverse primer obsahoval na svém 3' konci stop kodon. PCR produkt byl amplifikován za použití *Pfu* DNA polymerázy (Fermentas) a purifikován dle předchozího postupu (viz. 4.5.).

Ligace inzertu do expresního plazmidu proběhla dle pokynů výrobce. Do ligační reakce byly použity 2 µl PCR produktu, 0,5 µl SALT Solution a 0,5 µl vektoru Champion™

pET 100/D-TOPO[®]. Ligační směs byla po dobu 20 min inkubována při pokojové teplotě a následně byla použita pro transformaci One Shot[®] TOP 10 Chemically Competent *E.coli* buněk. Transformace proběha dle již uvedeného postupu (viz. 4.7.)

Plazmid byl vyizolován dle protokolu pomocí kitu QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) a pomocí sekvenace (viz. 4.1.) za použití T7-R a T7-F primerů byl vybrán vektor obsahující inzert ve správném čtecím rámci.

5.12. Exprese proteinu v buňkách „BL 21“

Expresní vektor Champion[™] pET 100/D-TOPO[®], obsahující inzert ve správném čtecím rámci, byl použit pro transformaci expresních kompetentních buněk BL21 Star[™] (DE3) One Shot[®] Cells (Invitrogen), (viz. 4.7.).

Pro získání většího počtu buněk v kultuře byla do LB média přidávána glukóza, která buňkám dodává energii. Po odebrání glukózy došlo u buněk k zpomalení množení a zároveň se spustil laktózový operon, který je v upravené podobě součástí expresního plazmidu Champion[™] pET 100/D-TOPO[®], což vedlo k produkci rekombinantního proteinu.

K transformovaným buňkám bylo přidáno 10 ml LB media (ampicilin 50 µg/ml, glukóza 20 mM) a směs byla inkubována přes noc na třepačce při 37 °C (= kultura $\frac{0}{n}$). Následující den bylo k $\frac{0}{n}$ kultuře přidáno 200 ml LB media (ampicilin 50 µg/ml, glukóza 20 mM). Naředěná kultura byla inkubována 5 hodin na třepačce při 37 °C. Poté byla zbavena glukózy promýváním v čistém sterilním LB mediu (centrifugace: 2500xg, 10 min; 3 opakování). Po promytí byla kultura rozsuspendována ve 400 ml LB media a opět inkubována přes noc na třepačce (37 °C). Následně byla kultura buněk stočena a lyzována v solubilizačním roztoku přes noc za stálého míchání při pokojové teplotě. Pro odstranění buněčných komponent byl lyzát stočen (10 000 x g, 4 °C, 20 minut) a supernatant přefiltrován přes bakteriální filtr (GyroDisk 0,45 µm (Orange Scientific)). Přefiltrovaný supernatant byl uschován pro purifikaci.

5.13. Denaturační purifikace pomocí afinitní chromatografie

Rekombinantní proteiny připravené v Champion[™] pET 100/D-TOPO[®] expresním vektoru obsahují na svém N-konci tzv. histidinovou kotvu složenou ze 6 histidinů, která má

vysokou afinitu k niklovým či kobaltovým iontům, čehož se využívá například při metalové afinitní chromatografii na agarózové koloně s navázanými ionty kobaltu (Co^{2+}). Interakce histidinové kotvy ionty s Ni^{2+} konjugovanými přes kyselinu nitrilotrioctovou (NTA) s křenovou peroxidázou (HRP) se využívá také pro kolorimetrickou detekci rekombinantního proteinu na membráně pomocí Ni-NTA HRP konjugátů (viz. 4.18.).

Pro denaturační purifikaci rekombinantního proteinu byla použita kolonka His Trap IMAC FF (GE Healthcare) s navázanými ionty Co^{2+} . Kolonka byla nejdříve ekvilibrována promývacím pufrem (30 ml). Po aktivaci kolonky byl na kolonku nanesen bakteriální lyzát, který byl připraven v předchozím kroku. Rekombinantní protein obsahující histidinovou kotvu se navázal na kobaltové ionty obsažené v kolonce, zatímco ostatní bakteriální proteiny protekly skrze kolonku při následném promývání kolonky promývacím pufrem (80 ml).

Po vymytí nespecificky navázaných buněčných proteinů následovaly dvě eluce rekombinantního proteinu pomocí pufřů se zvyšující se koncentrací imidazolu. První a druhá eluce rekombinantního proteinu byla provedena pomocí elučního pufřu 1 (250mM imidazol; 8 ml) a elučního pufřu 2 (1 M imidazol; 8 ml). Díky vysoké koncentraci imidazolu dochází k vyvázání histidinové kotvy z vazby na Co^{2+} ionty a tím k vymytí rekombinantního proteinu z kolonky.

V každé fázi (nanesení vzorku na kolonku, promývání, eluce) byly odebírány vzorky pro kontrolu úspěšnosti purifikace.

Výsledek purifikace byl kontrolován pomocí SDS PAGE (viz. 4.14).

5.14. SDS-PAGE

Vzorky, které byly odebírány v průběhu purifikace, byly kontrolovány pomocí SDS-PAGE.

Pufry a gely (viz. Tabulka II. a III.) pro SDS-PAGE byly připraveny podle standardních postupů pro tuto metodu (Laemmli, 1970). Ke vzorkům byl přidán 5x vzorkový pufr pro proteiny. Směs byla denaturována 3 minuty při 99 °C. Následně byly vzorky zchlazeny na ledu. Po ochlazení byly vzorky nanесeny na gel. Jako standard molekulových hmotností byl použit marker PageBlue™ Prestained Protein Ladder Plus (MBI Fermentas). Vzorky byly analyzovány v 15 % polyakrylamidovém gelu s použitím 5 % zaostřovací polyakrylamidové části gelu. Elektroforéza probíhala na aparatuře Hoefer SE 250 (Hoefer Scientific Instruments – Amersha Biosciences) při napětí 100 V v 1x Running pufřu E

přibližně 90 minut. Po skončení elektroforézy byl gel promyt v destilované vodě a přes noc barven v barvicím roztoku (Page BlueTM, Invitrogen). Po obarvení byl gel opět promyt destilovanou vodou. Výsledek byl fotograficky zaznamenán.

<i>Chemikálie</i>	<i>Množství (ml)</i>
Destilovaná deionizovaná voda	2,3
30 % acryl-bisacrylamid	5
1,5 M Tris-HCl ; pH=8,8	2,5
10 % SDS	0,1
10 % APS	0,1
TEMED	0,004

Tab. II.: složení 15% separačního gelu

<i>Chemikálie</i>	<i>Množství (ml)</i>
Destilovaná deionizovaná voda	2,7
30 % acryl-bisacrylamid	0,67
1,5 M Tris-HCl ; pH=8,8	0,5
10 % SDS	0,04
10 % APS	0,04
TEMED	0,004

Tab. III.: složení 5% zaostřovacího gelu

5.15. Refolding

Rekombinantnímu proteinu bylo třeba zpět dodat jeho 3D strukturu, protože v předchozích krocích došlo k jeho denuraci při izolaci z bakterií a následné purifikaci za použití vysoké koncentrace močoviny.

Refolding byl prováděn pomocí tří refoldovacích pufrů. Postupným snižováním koncentrace močoviny dialýzou přes dialyzační membránu došlo k postupnému sbalení proteinu (refoldingu).

Po ukončení dialýzy byl vzorek 10 minut centrifugován na maximální otáčky. Pelet (sražený protein) i supernatant, který obsahoval nesražený rekombinantní protein, byl uchován. Koncentrace proteinu v supernatantu byla měřena dle Bradford M, 1976.

5.16. Western blot

Vzorky rozdělené na SDS-PAGE byly přeneseny na PVDF membránu (Millipore, 0,2 µm) pomocí metody Western blot. Membrána byla před použitím aktivována v methanolu (30 sekund). Blotovací sendvič byl sestaven dle následujícího schématu:

záporná elektroda
2 mřížky
1 houbička
2 chromatografické papíry (3 mm, Whatman[®])
SDS-PAGE gel
membrána
2 chromatografické papíry (3 mm, Whatman[®])
2 houbičky
2 mřížky
kladná elektroda

Pro přenos rekombinantního proteinu na membránu byly použity různé blotovací pufrы (viz. Tabulka IV.), (Blotovací pufrы I. - III.: pH 7,0 – 9,5). Proces probíhal 2 hodiny při 250 mA na aparatuře od firmy Idea Scientific Company (USA).

Blotovací pufr I.	25 mM Tris Base; 150 mM glycin; 4 % metanol
Blotovací pufr II.	25 mM Tris Base; 150 mM glycin; 20 % methanol
Blotovací pufr III.	25 mM Tris Base; 150 mM glycin, 20 % metanol; 0,1 % SDS
Running elektrofor pufr	5x koncentrovaný; 20 % methanol
Acetátový blotovací pufr	100 mM amonium acetát; 10 % methanol; pH 5,0

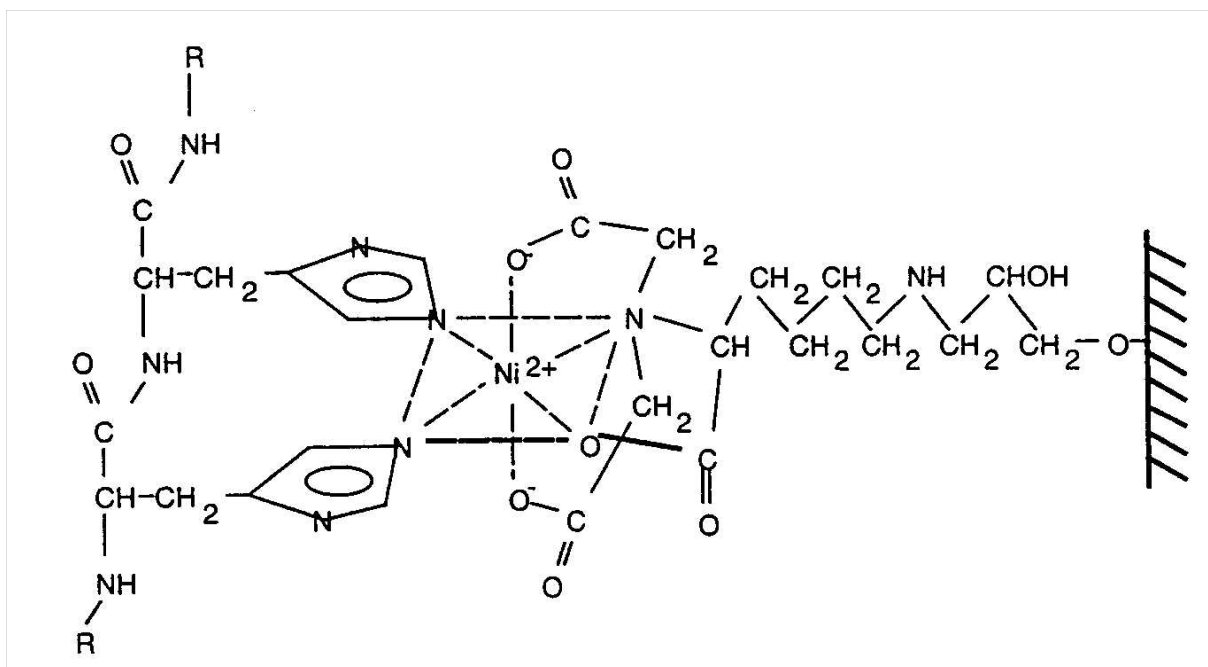
Tab. IV.: Složení použitých blotovacích pufrů.

Po přenosu proteinu na membránu byla membrána opláchnuta v destilované vodě a skladována při -20 °C do dalšího použití.

5.17. Detekce rekombinantního proteinu

Detekce byla provedena pro zjištění přítomnosti rekombinantního proteinu na membráně po Western blotu. Byly použity Ni-NTA HRP konjugáty (QIAGEN)

s následnou chromogenní reakcí pro vyvolání. Ni-NTA HPR konjugáty se váží na histidinovou kotvu, která je součástí fúzní části rekombinačního proteinu (viz. Obrázek 1).



Obr. 1.: Interakce mezi aminokyselinovými zbytky histidinové kotvy proteinu a Ni-NTA matrix.

Membrána s navázanými proteiny byla promyta v TBS pufru (2 x 10 minut), blokována v 3 % BSA (bovin serum albumin, Sigma) v TBS, promyta v TBST (3 x 10 minut), inkubována s Ni-NTA HRP konjugáty (ředění konjugátů: 1 : 1000 v TBST) a promyta v TBST (3 x 10 minut). Následně byla membrána vyvolána chromogenní reakcí pomocí barvicího roztoku.

5.18. Příprava králičích polyklonálních protilátek

Pro přípravu králičích polyklonálních protilátek byl použit refoldovaný protein o koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$. Protein byl dialýzou převeden do 1x PBS pufru a následně k němu bylo přidáno nekompletní Freundovo Adjuvans (SERVA) v poměru 1:1. Takto vytvořená vakcína byla podkožně aplikována dospělému králíkovi ve 4 dávkách po 14-ti denních intervalech.

Týden po poslední imunizaci byla odebrána krev. Po koagulaci byla krev centrifugována (2000 rpm, 10 minut, 4 °C). Oddělené krevní sérum bylo odsáto, rozděleno do sterilních zkumavek a uschováno při -70°C.

Polovina imunního králičího krevního séra byla přečištěna pro získání gama-globulinové frakce specifických polyklonálních protilátek. Za stálého míchání byly k séru přidány 2 objemy 50 mM Na-acetátového pufru (NaAc, pH 4,0). Srážení krevního séra probíhalo pomocí kyseliny kaprylové, která byla postupně do roztoku přidávána (25 µl kyseliny kaprylové na 1ml celkového objemu po 1 minutě). Roztok byl následně ponechán 90 minut při pokojové teplotě bez míchání, aby došlo k vysrážení makroglobulinové frakce. Poté byla sraženina oddělena centrifugací (5000 rpm, 10 minut) a supernatant byl přefiltrován přes skládaný papírový filtr. Supernatant obohacený gama-globulinovou frakcí specifických polyklonálních protilátek byl dále přes noc dialyzován proti 5mM Na₂HPO₄. Následující den byla získaná gama-globulinová frakce specifických polyklonálních protilátek po dialýze rozpipetována a rozplněna po 1 ml a uskladněna při -70 °C.

5.19. Imunodetekce proteinu králičími protilátkami

Imunodetekce rekombinantního proteinu na membráně byla provedena pro zjištění specifity a senzitivity polyklonálních protilátek v králičím séru. Testováno bylo, jak kompletní králičí sérum, tak i gama-globulinová frakce specifických polyklonálních protilátek. Pro detekci cílového proteinu – rekombinantního defensinu byla použita široká škála ředění specifických protilátek. Sérum i gama-globulinová frakce specifických polyklonálních protilátek byly ředěny od 1 : 50 až po 1 : 1000 v PBST.

PVDF membrána s navázanými proteiny (viz 4.16) byla promyta v 1x PBS pufru (2 x 10 minut), blokována v odtučněném 3 % mléce (60 minut) a promyta v PBST pufru (3 x 10 minut). Následovala tříhodinová inkubace se získanými polyklonálními protilátkami (primární králičí protilátky). Membrána byla po inkubaci sérem promyta v PBST (3 x 5 minut) a následně byla 1 hodinu inkubována se značenou sekundární protilátkou (SwAR/Px, Sevac), které byly ředěny 1 : 1000 v PBST. Po inkubaci se sekundární protilátkou byla membrána znovu promyta v PBST (3 x 5 minut). Chromogenní reakce byla vyvolána pomocí barvicího roztoku s 4-chloro-1-naftolem. Promytím membrány destilovanou vodou byla barvicí reakce zastavena.

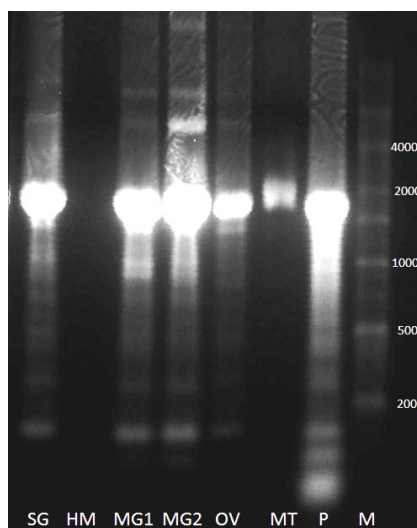
5.20. Testování antimikrobiální aktivity rekombinantního proteinu

Kvalitativní odhad antimikrobiální aktivity rekombinantního proteinu - defensinu klíštěte *D. marginatus* byl proveden pomocí techniky nazvané metoda dvouvrstvého agarů („double-layer technique“), (Čeřovský et al, 2008). Antimikrobiální aktivita rekombinantu byla testována proti Gram pozitivní bakterii (*B. subtilis*) i proti Gram negativní bakterii (*E. coli*). Do 2 ml tzv. měkkého agarů (0,5% LB agar) o teplotě 42 °C bylo přidáno 100 µl čerstvé bakteriální kultury (10^8 CFU / ml) připravené v LB médiu. Vzniklá suspenze bakterií byla rovnoměrně rozetřena na Petriho misku s pevným 2 % LB agarem (20 ml). Nasledně byl 1 µl rekombinantního proteinu (koncentrace 100 µg/ml) aplikován na povrch ztuhlé vrchní vrstvy agarů obsahující bakteriální kulturu. Jako pozitivní kontrola inhibice růstu bylo aplikováno 0,5 µl ampicilinu (50 mg/ml). Jako negativní kontrola byl použit 1 x PBS pufr (1 µl). Petriho misky byly inkubovány přes noc při 37 °C a ráno byly odečteny inhibiční zóny u jednotlivých bakterií.

6. Výsledky

6.1. Izolace RNA z klíštěte *D. marginatus* a syntéza ss cDNA

Celková RNA byla izolována z nasáté samice klíštěte *D. marginatus* i z jednotlivých tkání tohoto klíštěte (slinné žlázy, střevo, hemolymfa, malpigické trubice a ovaria). Její kvalita byla zhodnocena elektroforeticky a spektrofotometricky (Obr. 2., Tab. V.). S RNA izolovanou z hemocytů se dále neprocovalo, protože nebyla prokázána dostatečná kvalita a koncentrace RNA ve vzorku vhodná pro další použití. Pro syntézu jednořetězcové komplementární DNA (ss cDNA) bylo použito 5 ng RNA a random hexamer primer.



Obr. 2.: výsledek RNA elektroforézy:

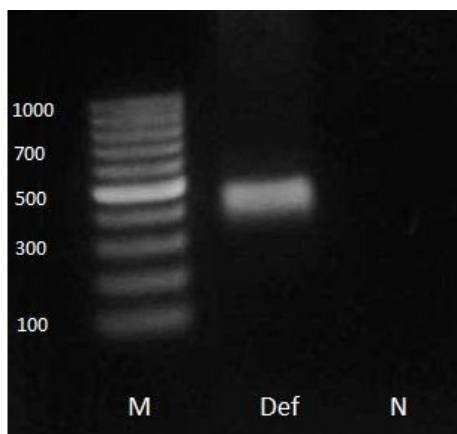
SG - slinné žlázy, HM - hemolymfa, MG1 a MG2 - střevo, OV - ovaria, MT - malpigické trubice, P – celé klíště, M - marker

vzorek	Koncentrace RNA [$ng/\mu l$]	RNA ^{260/280}	Koncentrace ss cDNA [$ng/\mu l$]	ss cDNA ^{260/280}
SG	1865	1,74	1268,7	1,72
HM	2	-	-	-
MG1	2490	1,84	1420,8	1,84
MG2	4398	1,87	-	-
OV	478	1,76	2933,6	1,66
MT	60	1,74	1142,8	1,70
P	3250	1,7	1715,0	1,59

Tab. V.: koncentrace RNA a ss cDNA. RNA z HM a MG2 nebyla dále použita pro syntézu ss cDNA.

6.2. Molekulární charakterizace genu pro defensin

Pomocí PCR metody se specifickými primery (DEF-Dermac.F a DEF-Dermac.R) byl z cDNA klíštěte *Dermacentor marginatus* získán celý gen pro defensin (Obr. 3.). Velikost amplifikovaného genu byla 225 bp. Získaný gen byl puřifikován z gelu a zaklonován do pCR® 4-TOPO vektoru. Kompetentní buňky (One Shot® TOP 10 *E. coli* Chemically Competent cells) byly transformovány vektorem se zaklonovaným PCR produktem. Z vybraných jednotlivých kolonií byla izolována plazmidová DNA. Přítomnost inzeru v plazmidu byla kontrolována pomocí metody PCR se specifickými primery (DEF-Dermac.F a DEF-Dermac.R). Plazmidy se zaklonovaným inzertem byly osekvenovány. Získaná sekvence byla ověřena metodou „nukleotide BLAST“. Byla prokázána 100% homologie s genem pro defensin klíštěte *Dermacentor marginatus* (v GeneBank™ – přístupový kód sekvence: FJ222583) a tudíž bylo dokázáno, že byl získán správný gen.



Obr. 3.: produkt PCR se specifickými primery (DEF-Dermac.F a DEF-Dermac.R). Def - gen pro defensin získaný z cDNA klíštěte *D. marginatus*, M- marker, N- negativní kontrola.

Na obrázku 4. je zobrazena nukleotidová sekvence genu pro defensin klíštěte *D. marginatus* i s přeloženou aminokyselinovou sekvencí. Nukleotidová sekvence preprodefensinu je dlouhá 225 bp. Protein je tvořen 74 aminokyselinami (AMK), z toho je 10 AMK silně zásaditého charakteru (K, R), 2 AMK silně kyselého charakteru (D, E), 25 AMK hydrofóbního charakteru (A, I, L, F, W, V) a 23 polárních aminokyselin (N, C, Q, S, T, Y). Molekulová hmotnost je 8,0676 kDa, izoelektrický bod (pI) je 9,003 a náboj při pH 7,0 je 8,135.

Pomocí programu SignalP 3.0 bylo určeno místo odštěpení signální sekvence a to na mezi AMK na pozici 22. a 23 s 60% pravděpodobností. Tudíž prvních 22 AMK proteinu tvoří

hydrofobní signální sekvenci. Prosegment je tvořen následujícími 14 AMK a funkční část proteinu, tzv. mature peptid, je složen z 38 AMK a jeho molekulová hmotnost je 4,2719 kDa.

1	ATG	CGC	GGA	CTT	TGC	ATC	TGC	CTT	GTC	TTT
1	M	R	G	L	C	I	C	L	V	F
31	ATC	CTT	GTC	TGT	GGT	CTT	CTA	ACC	GCC	ACG
11	I	L	V	C	G	L	L	T	A	T
61	GCG	GCC	GTC	CCG	GCT	GAA	AGC	GAG	GCG	GCT
21	A	A	V	P	A	E	S	E	A	A
91	CAC	CTC	CGT	GTT	CGT	CGA	GGC	TTC	GGA	TGC
31	H	L	R	V	R	R	G	F	G	C
121	CCA	CTG	AAC	CAA	GGC	GCC	TGT	CAC	AAT	CAC
41	P	L	N	Q	G	A	C	H	N	H
151	TGC	CGC	AGC	ATT	CGG	CGT	CGA	GGC	GGC	TAC
51	C	R	S	I	R	R	R	G	G	Y
181	TGC	TCT	GGC	ATA	ATC	AAG	CAG	ACC	TGC	ACC
61	C	S	G	I	I	K	Q	T	C	T
211	TGC	TAC	AGG	AAT	TAA					
71	C	Y	R	N	*					

Obr. 4. Nukleotidová sekvence genu pro defensin a její překlad do aminokyselinové sekvence.

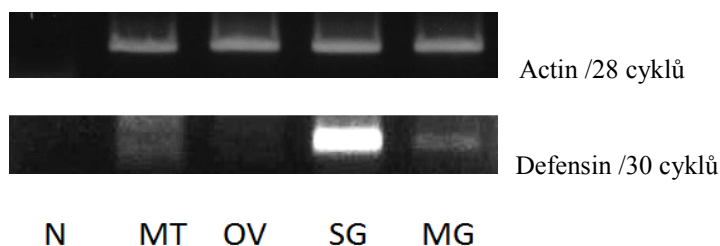
Signální sekvence je vyznačena červeně, prosegment modře a mature peptid zeleně.

(ATG - start kodon, * - stop kodon)

6.3. Diferenciální exprese genu pro defensin

Pro zjištění diferenciální exprese genu pro defensin v různých tkáních klišťete byla použita metoda PCR – gen pro defensin byl amplifikován ze získaných ss cDNA naředěných na stejnou koncentraci (200 ng/μl; viz. Kap. 5.1.). Výsledky (Obr. 5.) ukázaly, že nejsilnější exprese genu pro defensin je ve slinných žlázách. Ve střevě dochází také k expresi daného genu, ale v daleko menší míře. U ostatních testovaných tkání nebyl použitou metodou detekován transkript genu pro defensin.

Jako pozitivní kontrola amplifikační reakce byly použity specifické primery pro klišťecí „house-keeping“ gen β -actin: ACT β DM-F a ACT β DM-R.



Obr. 5.: Diferenciální exprese genu pro defensin. N - negativní kontrola, MT - malphigické trubice, OV - ovaria, SG - slinné žlázy, MG - střevo

6.4. Příprava rekombinantního proteinu

PCR produkt odpovídající tzv. „mature“ části defensinu (bez signální sekvence a prosegmentu) byl připraven amplifikační reakcí za použití specifických primerů (D.margR-mature a D.margF-mature) a následně byl zaklonován do expresního vektoru (Chamipon™ pET 100/D-TOPO®). Pomocí sekvenace (T7-R a T7-F primery) byl vybrán vektor, který obsahoval inzert ve správném čtecím rámci. Tento vektor byl použit pro transformaci expresních buněk BL21 Star™ (DE3) One Shot® Cells. Exprese rekombinantního proteinu probíhala po dobu 12 hodin po aktivaci laktóзовého operonu vymytím glukózy z LB media.

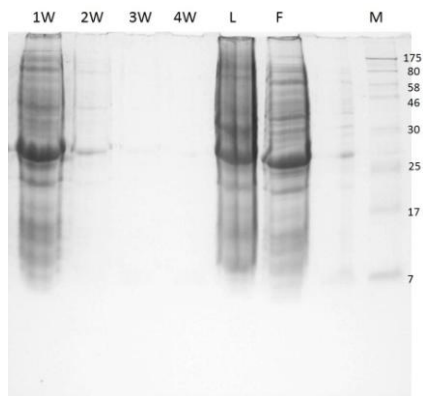
Na obrázku 6. je zobrazena nukleotidová a přeložená aminokyselinová sekvence rekombinantního proteinu. Nukleotidová sekvence rekombinantu je dlouhá 225 bp. Protein je tvořen 74 aminokyselinami (AMK), z toho je 9 AMK silně zásaditého charakteru (K, R), 6 AMK silně kyselého charakteru (D,E), 9 AMK hydrofóbního charakteru (A, I, L, F, W, V) a 24 polárních aminokyselin (N, C, Q, S, T, Y). Molekulová hmotnost je 8,356 kDa, izoelektrický bod (pI) je 8,304 a náboj při pH 7,0 je 4,222.

1	<u>ATG</u>	CGG	GGT	TCT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT
1	M	R	G	S	H	H	H	H	H	H
31	GGT	ATG	GCT	AGC	ATG	ACT	GGT	GGA	CAG	CAA
11	G	M	A	S	M	T	G	G	Q	Q
61	ATG	GGT	CGG	GAT	CTG	TAC	GAC	GAT	GAC	GAT
21	M	G	R	D	L	Y	D	D	D	D
91	AAG	GAT	CAT	CCC	TTC	ACC	GGC	TTC	GGA	TGC
31	K	D	H	P	F	T	G	F	G	C
121	CCA	CTG	AAC	CAA	GGC	GCC	TGT	CAC	AAT	CAC
41	P	L	N	Q	G	A	C	H	N	H
151	TGC	CGC	AGC	ATT	CGG	CGT	CGA	GGC	GGC	TAC
51	C	R	S	I	R	R	R	G	G	Y
181	TGC	TCT	GGC	ATA	ATC	AAG	CAG	ACC	TGC	ACC
61	C	S	G	I	I	K	Q	T	C	T
211	TGC	TAC	AGG	AAT	TAA					
71	C	Y	R	N	*					

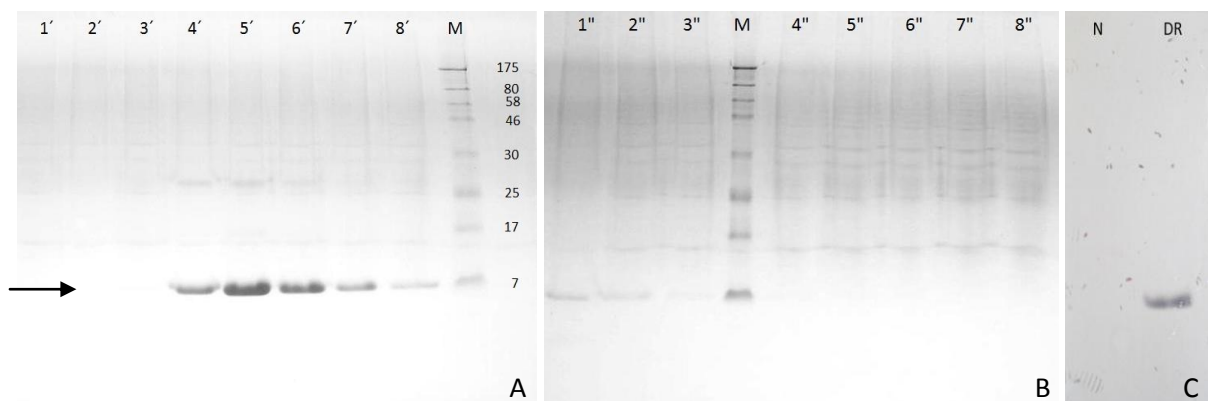
Obr. 6.: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence rekombinantního proteinu. Mature část defensinu je označena zeleně, na N-konci defensinu je připojena fúzní část rekombinantního proteinu s histidinovou kotvou (označena oranžově). (ATG – start kodon, * - stop kodon).

6.5. Denaturační purifikace rekombinantního proteinu

Pro denaturační purifikaci rekombinantního proteinu (rekombinant DR) byla použita kolonka His-trap s navázanými ionty kobaltu. Při promytí kolonky promývacím roztokem došlo k uvolnění nespecificky vázaných buněčných proteinů (viz. Obr. 7. – 1W-4W). Eluce cílového rekombinantu DR byla provedena 2 elučními pufry s 250 mM a 1M imidazolem. Protein se z kolonky začal vymývat ve čtvrté frakci (4') první eluce. V páté (5') a šesté (6') frakci došlo k nejsilnějšímu uvolnění cílového proteinu z kolonky, protein se vymýval plynule až do druhé frakce (2'') druhé eluce. Výsledek denaturační purifikace rekombinantního proteinu byl analyzován metodou SDS-PAGE a je zobrazen na obrázcích 7. a 8. A, B. Purifikovaný protein byl po přebílení detekován na PVDF membráně pomocí Ni-NTA konjugátů (viz. Obr. 8. C).



Obr. 7.: kontrola purifikace pomocí SDS-PAGE. 1W-4W proteiny vymyté promývacím pufrem, L- lyzát před filtrací, F- „flow-through“ proteiny, které se nenavázaly na kolonku, M- marker. Jamka mezi F a M byla záměrně vynechána, aby se vzorek nesmínil s markerem.

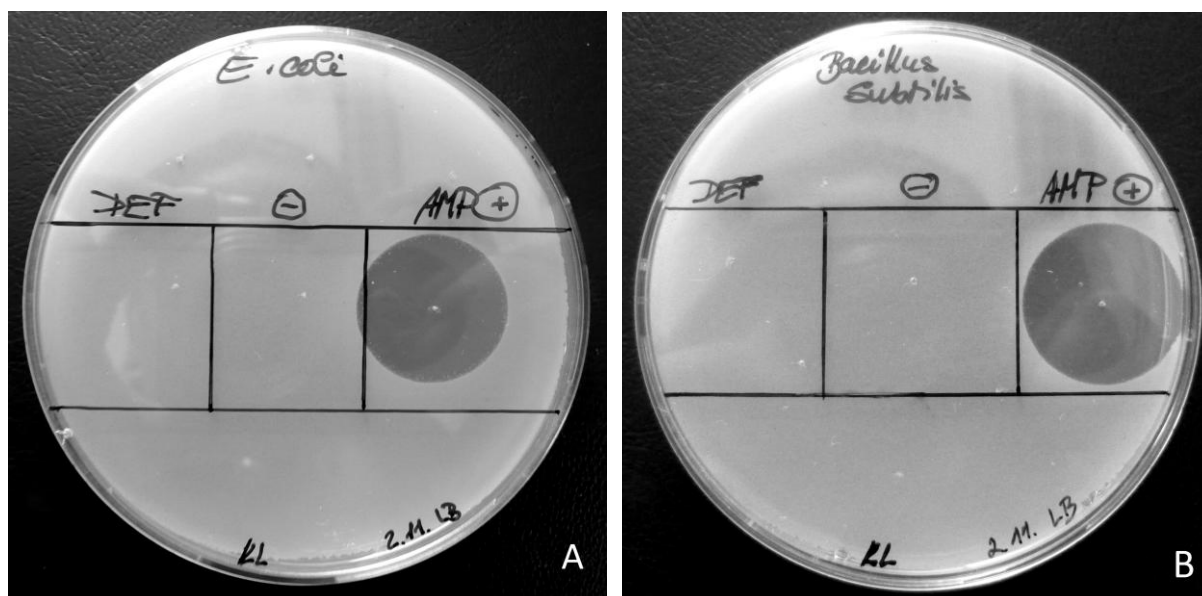


Obr. 8.: kontrola purifikace pomocí SDS-PAGE (frakce první a druhé eluce A, B) a detekce rekombinantního proteinu Ni-NTA HRP konjugáty na PVDF membráně (C). A: 1'-8'-frakce první eluce; B: 1'' – 8'' frakce druhé eluce, M- marker, C: PVDF membrána: N- negativní kontrola; DR- detekovaný rekombinantní protein na PVDF membráně.

MS analýza prokázala, že aminokyselinová sekvence purifikovaného proteinu odpovídá sekvenci předpovídané z nukleotidové sekvence. Sekvence vykázala 93% pokrytí. MS analýza byla provedena dr. Miroslavem Šulcem (Mikrobiologický ústav, AV ČR, Praha).

6.6. Testování antimikrobiální aktivity rekombinantu

Pro zjištění antimikrobiální aktivity rekombinantu DR byla použita metoda dvouvrstvého agaru (Čeřovský et al, 2008). Rekombinantní defensin při dané koncentraci (100 µg/ml) nevykazoval žádnou antimikrobiální aktivitu proti bakteriím *E. coli* a *B. subtilis*. Výsledek testu je zobrazen na obrázcích 9A a 9B. Jako pozitivní kontrola antimikrobiálního testu byl použit ampicilin (50 mg/ml), který vytvořil výraznou inhibiční zónu růstu bakterií.

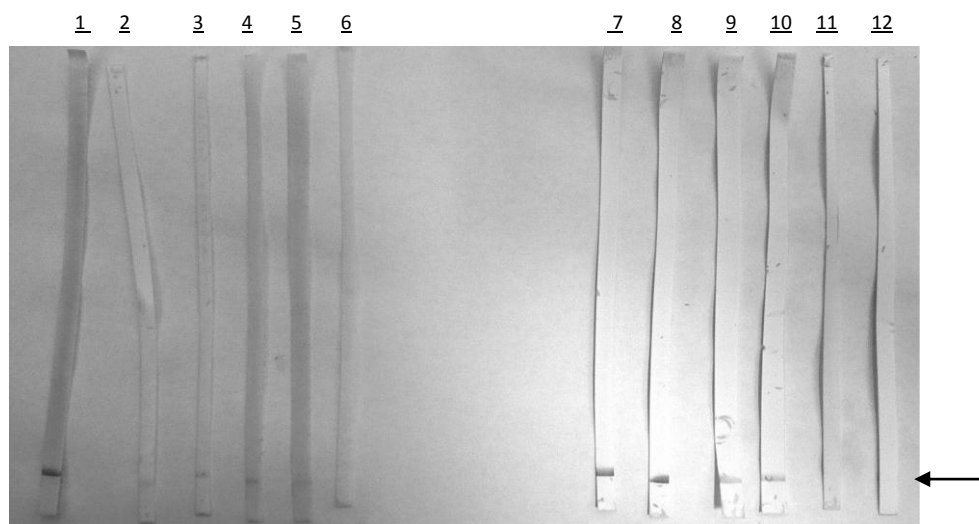


Obr. 9.: Test antimikrobiální aktivity rekombinantního defensinu. (A) bakteriální kultura *E. coli*, (B) bakteriální kultura *B. subtilis*. DEF- rekombinantní defensin, - - negativní kontrola (PBS pufr), AMP (ampicilin) - pozitivní kontrola.

6.7. Imunodetekce proteinu králičími protilátkami

Pro zjištění senzitivity polyklonálních protilátek (antiDR) v králičím séru byla provedena imunodetekce rekombinantního proteinu na PVDF membráně. Na obrázku 9. jsou zobrazeny výsledky testování senzitivity antiDR protilátek v kompletním králičím séru (vzorky 1-6), a purifikované gama-globulinové (IgG) frakce protilátek (vzorky 7-12). Byla testována široká škála ředění, od 1:50 až po 1:1000.

Přečištěné polyklonální protilátky antiDR-IgG (vzorky 1-6) byly funkční až do koncentrace 1:750 (vzorek č. 5). U kompletního krevního séra bylo zjištěno, že největší možné ředění pro detekci rekombinantního proteinu je 1:500 (vzorek č. 4).



Obr. 10.: Imunodetekce rekombinantního proteinu králičími protilátkami. 1-6 – IgG frakce polyklonálních antiDR protilátek, ředění: 1- 1:50, 2- 1:100, 3- 1:250, 4- 1:500, 5- 1:750, 6- 1:1000; vzorky 7-12 - kompletní krevní sérum, ředění: 7- 1:50, 8- 1:100, 9- 1:250, 10- 1:500, 11- 1:750, 12- 1:100.

Na obrázku 10. je zobrazen výsledek testu specifity antiDR-IgG protilátek. Rekombinantní protein byl blotován ve dvou různých pufrách: v acetátovém blotovacím pufru (100 mM amonium acetát, 10 % methanol, pH 5,0) a v klasickém blotovacím pufru (20 % methanol, 25 mM Tris-Base, 150 mM glycin). Z obrázku je možné vidět, že rekombinantní protein blotovaný v klasickém blotovacím pufru na PVDF membráně nebyl detekován ani

protilátkami a ani Ni-NTA konjugáty. Z tohoto důvodu byl použit acetátový blotovací pufr, který byl zvolen po optimalizaci Western-blotování rekombinantu DR. Po přeblovení rekombinantního proteinu v acetátovém blotovacím pufru byl rekombinant na PVDF membráně detekován jak antiDR-IgG protilátkami, tak Ni-NTA konjugáty. Další proteiny, přítomné ve stejných elucích jako rekombinant DR (viz obr. 8.) a přenesené na PVDF membránu, nebyly antiDR-IgG protilátkami detekovány. Bylo tak prokázáno, že antiDR- IgG protilátka specificky detekují jen rekombinantní protein DR.



Obr. 11.: test specifity protilátek. 1- acetátový blotovací pufr, ředění antiDR IgG protilátek 1:25; 2- acetátový blotovací pufr, ředění 1:50; 3- acetátový blotovací pufr, ředění 1:100; 4 - klasický blotovací pufr, ředění 1:25; 5 - klasický blotovací pufr, ředění 1:50; 6 - klasický blotovací pufr, ředění 1:100; 7- detekce rekombinantu Ni-NTA konjugáty – blotování v acetátovém blotovacím pufru, 8- detekce rekombinantu Ni-NTA konjugáty – blotování v klasickém blotovacím pufru.

7. Diskuze

Klíšťata, stejně jako ostatní žijící organismy, se potřebují chránit před patogeny. Jakožto krev sající jedinci mají zvýšené riziko infekce již během příjmu potravy. Součástí jejich imunitního systému jsou antimikrobiální proteiny a peptidy (AMP). AMP jsou široce rozšířené, vyskytují se jak u nejjednodušších organismů, jako jsou bakterie, tak i u nejvyspělejší forem života, obratlovců (Taylor, 2006). Jednotlivé skupiny AMP se velice liší a působí proti široké škále patogenních mikroorganismů. Proto jsou již mnoho let důkladně studovány. Studium těchto AMP je důležité jak z hlediska jejich využití jako nových antibiotik ve farmakologii, tak i, s ohledem na významnost klíšťat, pro vývoj vakcíny proti klíšťatům přenášeným chorobám či přímo proti klíšťatům.

Významnou skupinou AMP jsou právě defensiny. Byly nalezené u mnoha druhů klíšťat. Nám se podařilo blíže charakterizovat defensin u klíštěte *Dermacentor marginatus*.

7.1. Charakterizace defensinu klíštěte *D. marginatus*

Gen pro defensin klíštěte *D. marginatus* je velký 225 bp a kóduje peptid, jehož mature část má molekulovou hmotnost 4,27 kDa. Podobně velké peptidy byly nalezeny u dalších druhů klíšťat (*D. variabilis*, *A. americanum*, *O. moubata* a další), jen defensiny klíštěte *H. longicornis* se svou velikostí liší (5,82 - 5,37 kDa), (Johns et al., 2001; Nakajima et al., 2001; Tsuji et al., 2007; Todd et al., 2007; Lu et al, 2010).

Aminokyslinová sekvence tzv. „mature“ části defensinu klíštěte *D. marginatus* je z 97 % homologická s aminokyselinovou sekvencí defensinu klíštěte *D. variabilis* (Varisin A). Vysoká podobnost byla prokázána s defensinem štíra nejejdovatějšího (*Leirus quinquestriatus*) - 89 % i štíra tlustorepého (*Androctonus australis*) - 86%. Mezi defensinem klíštětem *D. marginatus* a defensiny slávky jedlé a šídla modrého je již homologie nižší (66 % - 56 %). Nejnižší podobnost, cca 30%, se ukázala v porovnání s defensiny komára tropického, mravence boreálního a včely medonosné (viz. Obr. 12.).

Vzájemná sekvencí podobnost defensinů členovců poukazuje na prastarý původ této molekuly a vzájemné evoluční vztahy.

```

D.marg GFGCPL-----NQGACHNHCRSIR-RRGGYCSGIIKQTCCTCYRN-----
D.var  GFGCPL-----NQGACHNHCRSIR-RRGGYCSGIIKQTCCTCYRN-----
LEIQU  GFGCPL-----NQGACHRHCRSIR-RRGGYCAGFFKQTCCTCYRN-----
ANDAU  GFGCPF-----NQGACHRHCRSIR-RRGGYCAGLFKQTCCTCYR-----
MYTED  GFGCP-----NDYPCHRHCKSIPGRXGGYCGGXHRLRCTCYR-----
AESCY  GFGCPL-----DQMQCHRHCQTITGRSGGYCSGPLKLTCTCYR-----
AEDAE  -ATCDLLSGFG-VGDSACAAHCIARG-NRGGYCN-SKKV-CVCRN-----
FORAQ  -FTCDLLSGAG-VDHSACAAHCILRG-KTGGRCN-SDRV-CVCRA-----
APIMEL -VTCDLLSFKGQVNSACAANCLSLG-KAGGHC---EKVGCICRKT'SFKDLWDKRF

```

Obr. 12.: Srovnání sekvencí defensinů (mature části). D.marg – klíště *D. marginatus*; D.var – klíště *D. variabilis* (přístupový kód sekvence v GeneBank™ (= PKS): AY181027), (Varisin A); LEIQU – *Leirus quinquestriatus* (štír nejjedovatější), (PKS: P41965); ANDAU – *Androctonus australis* (štír tlustorepý), (PKS: P56686); MYTED – *Mytilus edulis* (slávka jedlá), (PKS: P81610); AESCY – *Aeshna cyanea* (šídlo modré), (PKS: P80154); AEDAE – *Aedes aegypti* (komár tropický), (PKS: AY625500); FORAQ – *Formica aquilonia* (mravence boreální), (PKS: AY875720); APIMEL – *Apis mellifera* (včela medonosná), (PKS: C55392).

7.2. Diferenciální exprese genu pro defensin

Lokalizace exprese genu pro defensin a jeho izoform se u různých druhů klíšťat liší. Slinné žlázy a střevo klíšťat jsou orgány, které mohou významně ovlivnit přenos patogenních mikroorganismů do těla klíštěte. Střevo se dostává do přímého styku s nasátou krví, sekrety slinných žláz zase ovlivňují mikroprostředí nasávané krve již v hostiteli. Dá se tedy předpokládat, že právě v těchto tkáních by mohli být AMP exprimovány v nejvyšší míře. V práci byla tato domněnka potvrzena. Exprese genu pro defensin klíštěte *D. marginatus* byla detekována ve slinných žlázách a ve střevě u nasáté samice (Obr. 5). I u dalších klíšťat byla detekována exprese genu pro defensin přednostně ve střevě jako např. u klíštěte *D. variabilis*, *I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. persulacatus*, *H. longicornis* či u klíšťáka *O. moubata* (John set al., 2001; Nakajima et al., 2003 A; Hynes et al., 2005; Rudenko et al., 2007; Zhou et al., 2007; Saito et al., 2009). Naproti tomu isoforma defensinu (Hlsal-defensin) z klíštěte *Haemaphysalis longicornis* je uvedena jako vůbec první isoforma defensinu s dominantní expresí ve slinných žlázách (Zhou et al., 2007).

Ovaria a hemocyty jsou dalšími orgány, ve kterých byly defensiny detekovány (ať už na úrovni mRNA či proteinu). V případě klíštěte *D. marginatus* nebyl gen pro defensin v těchto orgánech exprimován. Dá se předpokládat, že exprese AMP v ováriích je důležitá pro ochranu potomstva před možnou infekcí. V tomto orgánu byl defensin detekován u klíšťáka

O. moubata nebo u klíšťat *R. microplus* a *D. variabilis* (Nakajima et al., 2001,2002, 2003 A; Fogaca et al., 2004; Ceraul et al., 2007). Hemocyty, představující buněčnou složku klíšťecí imunity, jsou v přímém kontaktu s patogeny, které se dostanou přes střešní bariéru či přímo přes kutikulu do hemocoelu klíšťete. Ačkoliv primární funkcí těchto buněk je fagocytóza cizorodých mikroorganismů, jsou zároveň i místem syntézy AMP. Defensin byl v hemocytech detekován u klíšťete *I. scapularis* a *D. variabilis* (Ceraul et al., 2003; Hynes et al., 2005).

7.3. Testování rekombinantního proteinu

Rekombinantní defensin (DR), připraven v bakteriálním expresním systému, byl tvořen 74 aminokyselinami a jeho izoelektrický bod (pI) byl 8,3. Právě hodnota pI byla příčinou značných potíží při pokusech přenést daný rekombinat na PVDF membránu pomocí Western blotu. Optimalizování pH klasického blotovacího pufru či změna poměru jednotlivých složek tohoto pufru (Tris-base, glycin a methanol, viz kap. 5.16) nepřinesla žádné zlepšení. Nakonec byl použit acetátový blotovací pufr, který měl velmi nízké pH (pH 5,0) a rekombinant DR byl během blotovacího procesu úspěšně přenesen na membránu.

Připravený rekombinantní protein nevykazoval antimikrobiální aktivitu proti *B. subtilis* ani proti *E. coli*. Práce Tsuji a kol. (2007), zabývající se defensinem klíšťete *H. longicornis* (longicin), popisuje funkčnost rekombinantního longicinu. Longicin byl exprimován v bakteriálním expresním systému za použití vektoru pTrcHisB, (Invitrogen). Vzniklý rekombinant obsahoval též na svém N konci fúzní protein, který byl následně odštěpen pomocí enterokinázy. Takto upravený rekombinant vykazoval široké antimikrobiální účinky (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Pichia pastoris*). (Tsuji et al., 2007). Pro další práci s naším rekombinantním defensinem by tudíž bylo vhodné fúzní protein odštěpit pomocí enterokinázy. Další možností vylepšení stávající metodiky pro přípravu rekombinantu DR je použití např. vektoru pET101/D-TOPO[®] (Invitrogen), který umožňuje exprimovat proteiny bez fúzního proteinu. Takto připravený protein by bylo možné purifikovat pomocí již připravených anti-DR protilátek.

8. Závěr

Pomocí specifických primerů byl z cDNA klíštěte *Dermacentor marginatus* získán celý gen pro defensin. Sekvence obašovala čtecí rámec kódující 8,07 kDa velký peptid - preprodefensin.

Expresce defensinu byla detekována ve slinných žlázách a ve střevě plně nasáté samice metodou RT-PCR. V malphigických tubicích a v ovariích se nepodařilo transkript genu pro defensin detekovat.

Byl získán rekombinant DR, který ve své struktuře obsahoval sekvenci opovídající mature části preprodefensinu. Antimikrobiální aktivita proteinu nebyla při koncentraci 100 µg/ml prokázána. Pro protein DR byla optimalizována metoda Western blotu. Dále byly proti tomuto rekombinantu připraveny specifické polyklonální protilátky (antiDR-IgG), které byly schopny tento protein detekovat až do ředění 1:750.

9. Použitá literatura

1. BAUMANN T, KUHN-NENTWIG L, LARGIADÈR CR, NENTWIG W. 2010: Expression of defensins in non-infected araneomorph spiders. *Cell Mol Life Sci.* 67(15):2643-51
2. BEATY BJ, MARQUARDT WC. 1996: *The Biology of Disease Vectors*
3. BOLDIŠ V., ŠPITALSKÁ E. 2009: *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* tick versus L929 and Vero cell lines in *Rickettsia slovaca* life cycle evaluated by quantitative real time PCR. *Exp Appl Acarol.* 50(4):353-9.
4. BOROVIČKOVÁ B, HYBŠA V. 2005: Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*. *Exp Appl Acarol.* 35(4):317-33
5. BOULANGER N, LOWENBERGER C, VOLF P, URSIC R, SIGUTOVA L, SABATIER L, SVOBODOVA M, BEVERLEY SM, SPÄTH G, BRUN R, PESSON B, BULET P. 2004: Characterization of a defensin from the sand fly *Phlebotomus duboscqi* induced by challenge with bacteria or the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect Immun.* 72(12):7140-6
6. BRADFORD MM. 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
7. BULET P, STÖCKLIN R, MENIN L. 2004: Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev.* 198:169-84.
8. CERAUL SM, DREHER-LESNICK SM, GILLESPIE JJ, RAHMAN MS, AZAD AF. 2007: New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge. *Infect Immun.* 75 (4): 1973-1983.
9. CERAUL SM, SONENSHINE DE, RATZLAFF RE, HYNES WL. 2003: An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem Mol Biol.* 33(11):1099-103.
10. COCIANCICH S, GOYFFON M, BONTEMS F, BULET P, BOUET F, MENEZ A, HOFFMANN J. 1993: Purification and characterization of a scorpion defensin, a 4kDa antibacterial peptide presenting structural similarities with insect defensins and scorpion toxins. *Biochem Biophys Res Commun.* 194(1):17-22

11. FOGACA AC, LORENZINI DM, KAKU LM, ESTEVES E, BULET P, DAFFRE S. 2004: Cystein-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Dev Comp Immunol.* 28(3):191-200.
12. GOSTEVA VV, REHACEK J, KOCIJANOVÁ E, KLITSUNOVA NV, SMIRNOVA NS, POPOV VL, MAKAROVA VA, TARASEVICH IV. 1991: The ultrastructure of the interaction of *Rickettsia sibirica* and *R. slovaca* with the cells of ixodid tick. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* (2) 68-72.
13. GRUBHOFFER L, KOVÁŘ V, RUDENKO N. 2004: Tick lectins: structural and functional properties. *Parasitology* 129, S113-S25.
14. GRUBHOFFER L, KOVÁŘ V. 1998: Arthropod lectins: affinity approaches in analysis and reparation of carbohydrate binding proteins. In: Wiesner A, Dunphy G B, Marmars VJ, Morishima I, Sugamaram M, Yamakava M, editors. *Techniques in Insect Immunology FITC-5*. New Haven USA, SOS Publications, 47-57, 2008.
15. GRUBHOFFER L, REGO ROM, HAJDUŠEK O, HYPŠA V, KOVÁŘ V, RUDENKO N, OLIVER JH. 2008: Tick lectins and fibrinogen-related proteins. In: Nuttal PA, Bownam AS, editors. *Ticks: Biology, disease and control*. Cambridge University Press, 406-58, 2008.
16. GRUNCLOVÁ L, FOUQUIER H, HYBŠA V, KOPÁČEK P. 2003: Lysosyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. *Dev Comp Immunol* 27(8):651-60.
17. HANCOCK REW, ROZEK A. 2002: Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett.* 206 143– 149.
18. HUANG X, TSUJI N, MIYOSHI T, NAKAMURA-TSURUTA S, HIRABAYASHI J, FUJISAKI K. 2007: Molecular characterization and oligosaccharide-binding properties of a galectin from the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Glycobiology.* 17(3):313-23.
19. HYNES WL, CERAUL SM, TODD SM, SEGUIN KC, SONENSHINE DE. 2005: A defenzin-like gene expressed in the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. *Met Vet Entomol.* 19: 339-344.
20. HYNES WL, STOKES MM, HENSLEY SM, TODD SM, SONENSHINE DE. 2008: Using RNA interference to determine the role of varisin in the innate immune system of the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol.* 46(1-4):7-15

21. CHARLET M, CHERNYSH S, PHILIPPE H, HETRU C, HOFFMANN JA, BULET P. 1996: Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. J Biol Chem. 1996 Sep 6;271(36):21808-13.
22. CHRUDIMSKÁ T, CHRUDIMSKÝ T, GOLOVCHENKO M, RUDENKO N, GRUBHOFFER L. 2010: New defensins from hard and soft ticks: Similarities, differences, and phylogenetic analyses. Vet Parasitol. 167 298–303.
23. IMLER JL, BULET P. 2005: Antimicrobial peptides in Drosophila: structures, activities and gene regulation. Chem Immunol Allergy. 86:1-21
24. ISOGAI E, ISOGAI H, OKUMURA K, HORI H, TSURUTA H, KUREBAYASHI Y. 2011: Tertiary structure-related activity of tick defensin (persulcatusin) in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. Exp Appl Acarol. 53(1):71-7. (Epub 2010).
25. JAWORSKI DC, ZOU Z, BOWEN CJ, WASALA NB, MADDEN R, WANG Y, KOCAN KM, JIANG H, DILLWITH JW. 2010: Pyrosequencing and characterization of immune response genes from the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (L). Insect Molecul Biol 1-14.
26. JOHNS R, SONENSHINE DE, HYNES WL. 2001: Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. Insect Biochem Mol Biol. 31: 857-867.
27. KLAUDINY J, ALBERT S, BACHANOVÁ K, KOPERNICKÝ J, SIMÚTH J. 2005: Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. Insect Biochem Mol Biol. 35(1):11-22
28. KOCAN KM, DE LA FUENTE J, MANZANO-ROMAN R, NARANJO V, HYNES WL, SONENSHINE DE. 2008: Silencing expression of the defensin, varisin, in male *Dermacentor variabilis* by RNA interference results in reduced *Anaplasma marginale* infections. Exp Appl Acarol. 46(1-4):17-28.
29. KOPÁČEK P, VOGT R, JINDRÁK L, WEISE CH, ŠAFAŘÍK I. 1999: Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. Insect Biochem Mol Biol. 29: 989-997.
30. KOVÁŘ, V., KOPÁČEK, P., GRUBHOFFER, L. 2000: Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. Insect Biochem Mol Biol.30, 195-205.

31. KOZUCH O, NOSEK J. 1971: Transmission of tick-borne encephalitis (TBE) virus by *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks. *Acta Virol.* 15(4):334.
32. KUHN KH, HAUG T. 1994: Ultrastructural, cytochemical and immunocytochemical characterisation of haemocytes of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata). *Cell Tissue Res.* 277, 493-504.
33. LAI R, LOMAS LO, JONCZY J, TURNER PC, REES HH. 2004 B: Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Biochem J.* 379(Pt 3):681-5.
34. LAI R, TAKEUCHI H, LOMAS LO, JONCZY J, RIGDEN DJ, REES HH, TURNER PC. 2004 A: A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. *FASEB J.* 18(12):1447-9.
35. LEIPPE M. 1999: Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa--effector molecules of primitive phagocytes. *Dev Comp Immunol.* 23(4-5):267-79
36. LIU Z, LIU H, LIU X, WU X. 2008: purification and cloning of a novel antimicrobial peptide from salivary gland of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Compar Biochem Physiol Part B* 149: 557-561.
37. LOWENBERGER C. 2001: Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 31(3):219-29.
38. LOWENBERGER CA, SMARTT CT, BULET P, FERDIG MT, SEVERSON DW, HOFFMANN JA, CHRISTENSEN BM. 1999: Insect immunity: molecular cloning, expression, and characterization of cDNAs and genomic DNA encoding three isoforms of insect defensin in *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* 8(1):107-18.
39. LU X, CHE Q, LV Y, WANG M, LU Z, FENG F, LIU J, YU H. 2010: A novel defensin-like peptide from salivary glands of the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Protein Scie.* 19:392-397.
40. MATSUYAMA K, NATORI S. 1988: Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*. *J Biol Chem.* 263(32):17112-6.
41. NAKAJIMA Y, ISHIBASHI J, YUKUHIRO F, ASAOKA A, TAYLOR DM, YAMAKAWA M. 2003 B: Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Insect Mol Biol.* 11(6):611-8.
42. NAKAJIMA Y, SAIDO-SAKANAKA H, TAYLOR DM, YAMAKAWA M. 2003 A: Up-regulated humoral immune response in the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Parasitol Res.* 91(6):476-81.

43. NAKAJIMA Y, VAN DER GOES VAN NATERS-YASUI A, TAYLOR D, YAMAKAWA M. 2001: Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochem Mol Biol.* 31: 747-751.
44. NAKAJIMA Y, VAN DER GOES VAN NATERS-YASUI A, TAYLOR D, YAMAKAWA M. 2002: Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. *Insect Mol Biol.* 11(6):611-8.
45. ORTUÑO A, QUESADA M, LÓPEZ S, MIRET J, CARDEÑOSA N, CASTELLÀ J, ANTON E, SEGURA F. 2006: Prevalence of *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor marginatus* ticks removed from wild boar (*Sus scrofa*) in northeastern Spain. *Ann N Y Acad Sci.* 1078 : 324-327.
46. PIETROBELLI M, CANCRINI G, MORETTI A, TAMPIERI MP. 2007: Animal babesiosis: an emerging zoonosis also in Italy? *Parassitologia.* 49 Suppl 1:33-8.
47. PICHU S, RIBERIO JMC, MATHER TN. 2009: Purification and characterization of novel salivary antimicrobial peptide from the tick, *Ixodes scapularis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 390 (3): 511-515.
48. PODBORONOV VM. 1990: Comparative characteristics of lysozymes of different origin. *Antibiot Khimioter.* 35(8):22-5.
49. PUNDA-POLIC V, PETROVEC M, TRILAR T, DUH D, BRADARIC N, KLISMANIC Z, AVSIC-ZUPANC T. 2002: Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in ticks collected in southern Croatia. *Exp Appl Acarol.* 28(1-4):169-176.
50. RAHMAN M, TSUJI N, BOLDBAATAR D, BATTUR B, LIAO M, UMEMIYA-SHIRAFUJI R, YOU M, TANAKA T, FUJISAKI K. 2010: Structural characterization and cytolytic activity of a potent antimicrobial motif in Longicin, a defensin-like peptide in the tick *Haemaphysalis longicornis*. *J Vet Med Sci* 72(2): 149–156.
51. REGO ROM, HAJDUŠEK O, KOVÁŘ V, KOPÁČEK P, GRUBHOFFER L, HYBŠA V. 2005: Molecular cloning and comparative analyses of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros moubata* and hard tick *Ixodes ricinus*. *Insect. Biochem Mol Biol.* 35: 991-1004.
52. REGO ROM, KOVÁŘ V, KOPÁČEK P, WEISE CH, MAN P, ŠAUMAN I, GRUBHOFFER L. 2006: The tick plasma lectin, Dorin M, is a fibronogen related molecule. *Insect Biochem Molecul Biol* 36: 291-299.

53. RUDENKO N, GOLOVCHENKO M, EDWARDS MJ, GRUBHOFFER L. 2005: Differential expression of *Ixodes ricinus* tick genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection. J Med Entomol. 42(1) : 36-41.
54. RUDENKO N, GOLOVCHENKO M, GRUBHOFFER L. 2007: Gene organisation of a novel defensin of *Ixodes ricinus*: First annotation of an intron/exon structure in a hard tick defensin gene and first evidence of the occurrence of two isoforms of one member of the arthropod defensin family. Insect Mol Biol. 16(4): 501-507.
55. SAITO Y, KONNAI S, YAMADA S, IMAMURA S, NISHIKADO H, ITO T, ONUMA M, OHASHI K. 2009: Identification and characterization of antimicrobial peptide, defensin, in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. Insect Mol Biol. 18 (4), 531-539.
56. SANOGO YO, DAVOUST B, PAROLA P, CAMICAS JL, BROUQUI P, RAOULT D. 2003: Prevalence of *Rickettsia* spp. in *Dermacentor marginatus* ticks removed from game pigs (*Sus scrofa*) in southern France. Ann N Y Acad Sci. 990:191-5
57. SILVA FD, REZENDE CA, ROSSI DC, ESTEVES E, DYSZY FH, SCHREIER S, GUEIROS-FILHO F, CAMPOS CB, PIRES JR, DAFFRE S. 2009: Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. J Biol Chem. 284(50):34735-34746.
58. SIMSER JA, MACALUSO KR, MULENGA A, AZAD AF. 2004: Immune-responsive lysosymes from hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* and an embryonic cell line of the Rocky Mountain wood tick, *D. andersoni*. Insect Biochem Molecul Biol. 34: 1235-1246.
59. SONENSHINE DE, CERAUL SM, HYNES VE, MACALUSO KR, AZAD AF. 2002: Expression of defensin-like peptides in tick hemolymph and midgut in response to challenge with *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Exp App Acarol. 28(1-4): 127-134.
60. SONENSHINE DE. 1991: Biology of ticks, Volume 1
61. SONENSHINE DE. 1993: Biology of ticks, Volume 2
62. TAGUCHI S, BULET P, HOFFMANN JA. 1998: A novel insect defensin from the ant *Formica rufa*. Biochimie. 80(4):343-6.
63. TAYLOR DM. 2006. Innate Immunity in Ticks: A review. J Acarol Soc Jpn. 15 (2): 109-127

64. TODD SM, SONENSHINE DE, HYNES WL. 2007: Tissue and live-stage distribution of a defensin gene in the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. *Med Vet Entomol.* 21: 141-147.
65. TSUJI N, BATTSETSEG B, BOLDBAATAR D, MIYOSHI T, XUAN X, OLIVER HJ, FUJISAKI K. 2007: Babesial vector tick defensin against *Babesia sp.* parasites. *Infect Immun* 3633-3640.
66. VILJAKAINEN L, PAMILO P. 2005: Identification and molecular characterization of defensin gene from the ant *Formica aquilonia*. *Insect Mol Biol.* 14(4):335-8.
67. VOLF P, HORÁK P A KOL. 2007: Paraziti a jejich biologie. Triton 2007, Praha.
68. YU D, SHENG Z, XU X, LI J, YANG H, LIU Z, REES HH, LAI R. 2006: Novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Peptides.* 27: 31-35.
69. ZHOU J, LIAO M, UEDA M, GONG H, XUAN X, FUJISAKI K. 2007: Sequence characterization and expression patterns of two defensin-like antimicrobial peptides from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Peptides* 28: 1304-1310.
70. ZHU S, LI W, JIANG D, ZENG X. 2000: Evidence for the existence of insect defensin-like peptide in scorpion venom. *IUBMB Life.* 50(1):57-61.