

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH



**Charakterizace dvou zástupců multigenní rodiny
jednodoménových Kunitz-inhibitorů z klíštěte *Ixodes ricinus***

Bakalářská práce

Barbora Singerová

Školitel: RNDr. Jindřich Chmelař Ph.D. (Technische Universität
Dresden)

České Budějovice

2011

Singerová B., 2011: Charakterizace dvou zástupců multigenní rodiny jednodoménových Kunitz-inhibitorů z klíštěte *Ixodes ricinus*. [Characterization of two members from the multigenic family of one-domain Kunitz-inhibitors from the tick *Ixodes ricinus*. Bc. Thesis, in Czech.] – 51 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Two new genes encoding proteins Monolaris 1 and Monolaris 2 were isolated from tick *Ixodes ricinus*. Both cDNA fragments code for 94 aminoacid residues long protein with molecular mass 8,1kDa (Monolaris 1) and 8,3kDa (Monolaris 2).

The function of Monolaris 1 was tested by using RNA interference in adult females of *Ixodes ricinus* that were subsequently fed on guinea-pigs. Body mass, egg mass and mortality were measured to evaluate the effect of gene silencing.

Recombinant protein Monolaris 1 was prepared in bacterial expression system and antibodies against this protein were raised by immunization of a rabbit. Antibodies reacted with approximately 190kDa big protein in salivary gland, ovary and gut whereas monomer of Monolaris 1 was not detected in tick saliva, salivary glands and other tissues.

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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, 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.....

.....

(Podpis)

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Jindřichu Chmelařovi, Ph.D. za vedení mé práce, trpělivost a poskytnutí mnoha rad během mého působení v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat Michalису Kotsyfakisovi, Ph.D. za možnost pracovat v Laboratoroři genomiky a proteomiky vektorů, RNDr. Zdeňku Frantovi a RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc. za pomoc při dokončení mé práce. Nemalé díky také patří mým rodičům za podporu při studiu.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Klíště obecné	1
1.2. Interakce mezi imunitním systémem hostitele a klíštětem	1
1.3. Serinové proteinázy a struktura koagulačních faktorů	6
1.4. Inhibitory serinových proteináz	9
1.5. Kunitz inhibitory u klíšťat a mechanismus jejich inhibice	9
2. Cíle práce.....	13
3. Materiál a metody	14
3.1. Použité roztoky, média, chemikálie, vektory, buňky a kity	14
3.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	18
3.3. Elektroforéza v agarózovém gelu	19
3.4. Restrikce	19
3.5. Ligace	20
3.6. Transformace	20
3.7. Příprava a izolace plazmidové DNA	21
3.8. Sekvenační reakce	21
3.9. Příprava maxiprepu pro RNAi a jeho purifikace	21
3.10. Restrikce přečištěného plazmidu	21
3.11. Purifikace linearizovaného plazmidu	22
3.12. Syntéza jednořetězcové RNA (ssRNA)	22
3.13. Purifikace ssRNA	23
3.14. Hybridizace- syntéza dvouvláknové RNA (dsRNA)	23
3.15. Exprese proteinu	23
3.16. Přečišťování rekombinantního proteinu	24
3.17. Získání protilátek z krevního séra králíka	25
3.18. Western blot pro ověření účinnosti protilátek	26
3.19. Izolace tkání a detekce sledovaného proteinu v tkáních a slinách pomocí protilátek.....	27
4. Výsledky	28
4.1. Bioinformatická analýza: Charakteristika transkriptů a předpokládaných proteinů Monolaris 1 a Monolaris 2	28
4.2. Výsledky experimentální práce	32
4.2.1. RNA interference	32
4.2.1.1. Syntéza dsRNA	32
4.2.1.2. Injikace dsRNA do klíštěte <i>Ixodes ricinus</i> a následné sání samic na morčatech	33
4.2.2. Syntéza rekombinantního proteinu a výroba polyklonálních protilátek	36

4.2.2.1. Syntéza rekombinantního proteinu a jeho přečištění.....	36
4.2.2.2. Výsledky ze získání polyklonálních protilátek	40
5. Diskuze	43
5.1. Monolaris 1 a Monolaris 2, zástupci jednodoménových Kunitz proteinů	43
6. Závěr	47
7. Seznam použité literatury	48

1. Úvod

1.1. Klíště obecné

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) spadá pod řád *Acarina* (roztoči), podřád *Ixodida* a čeleď *Ixodidae* (Volf a kol., 2007). *I. ricinus* je u nás nejznámějším a medicínsky nejvýznamnějším zástupcem této čeledi. Během životního cyklu prochází třemi vývojovými stádii: larva → nymfa → dospělec. Larva je nejmenší a má pouze 6 nohou, na rozdíl od nymfy a dospělce, kteří mají nohou 8. Nymfa se od dospělce liší mimo jiné absencí pohlavního otvoru. Všechna vývojová stadia parazitují na hostitelích (Votava a kol., 2003), jimiž mohou být savci (včetně člověka), ptáci a plazi (Sauer a kol., 1995). Z dospělců sají krev pouze samice, které po nasátí kladou vajíčka. Jedna snůška obsahuje až tisíc vajec a samice po vykladení umírá.

Oblast rozšíření *I. ricinus* zahrnuje kromě nejsevernější části celou Evropu a západ severní Afriky. Na východě zasahují až do severního Iránu.

Lékařský význam klíštěte obecného spočívá hlavně v přenosu původců řady závažných virových a bakteriálních onemocnění. Z arbovirů je to především virus klíšťové encefalidity, patřící do čeledi *Flaviviridae*, z bakterií zejména *Borrelia burgdorferi* sensu lato, původce Lymeské boreliózy. Klíště může rovněž přenášet některé prvoky- např. *Babesia spp.*, původce babeziózy (Votava a kol., 2003).

1.2. Interakce mezi imunitním systémem hostitele a klíštětem

Jak již bylo zmíněno, klíšťata jsou významní krev sající členovci. Jejich cca 300 milionů let trvající evoluce vedla k vyvinutí strategií, které těmto parazitům umožňují interagovat s rozmanitým množstvím hostitelů (Sauer a kol., 1995). Porozumění dějům, které pomáhají klíštěti vyhnout se imunitní odpovědi hostitele, je z lékařského hlediska zásadním předpokladem v boji s patogeny přenášenými těmito parazity.

Sliny klíštěte jsou účinnou směsí stovek různých proteinů a dalších farmakologicky aktivních molekul (Chmelař a kol., 2008), jejichž přesná funkce nebyla doposud u většiny z nich prozkoumána a popsána. Patří sem také zástupci nových, pro klíšťata unikátních, proteinových rodin (Francischetti a kol., 2009). A právě toto rozmanité spektrum bioaktivních

látek pomáhá klíštěti vyhnout se imunitní odpovědi hostitele a úspěšně dokončit sání, které u *I. ricinus* obvykle trvá 7-9 dní (Ribeiro & Francischetti, 2003; Wikel a kol., 1994).

Krev je pro klíště jediným zdrojem živin, proto není divu, že během dlouhého procesu evoluce se u klíšťat vyvinula schopnost úspěšně čelit hostitelské obraně namířené proti ztrátě krve (hemostázi) a směrem k vývoji zánětlivé reakce (Ribeiro & Francischetti, 2002). Jelikož klíště *I. ricinus* zůstává přichyceno k hostiteli několik dní, vyvinulo i způsob, jak obejít specifickou imunitní odpověď závislou na prezentaci antigenu, klonální expanzi T a B lymfocytů a tvorbě specifických protilátek.

Role hemostatického systému spočívá v ochraně před ztrátou krve po poranění tkáně.

Hemostatický systém tvoří tři základní složky: vazokonstrikce (snižuje tok krve), agregace krevních destiček (slouží k tvorbě krevní zátky) a koagulační kaskáda (vede ke vzniku krevní sraženiny). Všechny tyto tři složky představují pro klíšťata skutečnou hrozbu (Valenzuela, 2004), neboť pro úspěšné nasátí je rozhodující nepřerušovaný přísun krve do místa kousnutí (Francischetti a kol., 2009). Klíšťata využívají k potlačení hemostáze mechanismů, které mohou být pro různé druhy unikátní, ale mohou se i shodovat.

K boji proti vazokonstrikci produkuje klíštěte specifické molekuly, tzv. vazodilátory, které rozšiřují cévy, a tak zvyšují přítok krve (Valenzuela, 2004). Jako příklad vazodilátoru, popsaného např. u *Ixodes scapularis*, je možné uvést prostacyklin (Ribeiro a kol., 1988) nebo prostaglandin E₂ (PGE₂) (Ribeiro a kol., 1985).

V obraně proti ztrátě krve při poranění tkáně dochází také ke srážení krevních destiček (Valenzuela, 2004). Ty jsou aktivovány mnoha různými agonisty, např. adenosin difosfátem (uvolňován poškozenými buňkami a aktivovanými krevními destičkami), kolagenem (hojně zastoupen v extracelulární matrix) nebo trombinem (centrální enzym v koagulační kaskádě) (Francischetti a kol., 2009). Aktivované destičky se shlukují, čímž vytvářejí krevní zátku, a uvolňují vazokonstriktory. Klíšťata mohou čelit agregaci destiček jednak produkcí specifických molekul, které znemožňují vzájemnou interakci mezi krevními destičkami, a jednak přítomností enzymů, jež ničí agonisty krevních destiček (Valenzuela, 2004).

Na neaktivovaných krevních destičkách se nachází inaktivní receptor integrin α IIb β 3, který po své aktivaci reguluje agregaci a adhezi krevních destiček (Ferguson & Zaqq, 1999). Tento receptor váže fibrinogen, a tím je umožněna interakce: krevní destička-fibrinogen-krevní

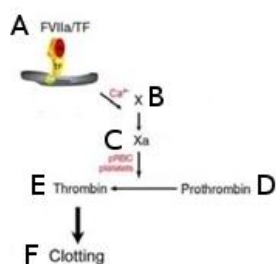
destička, anebo shlukování krevních destiček sesítním fibrinu, konečného produktu koagulační kaskády (viz níže).

Jednou ze strategií klíšťat namířenou proti agregaci destiček je vazba na výše zmíněný receptor krevních destiček, čímž dojde k utlumení interakce: krevní destička-fibrinogen-krevní destička (Valenzuela, 2004). Například u klíštěte *Dermaceter variabilis* byl popsán protein variabilin, který se na tento receptor váže, a tím jej inhibuje (Wang a kol., 1996).

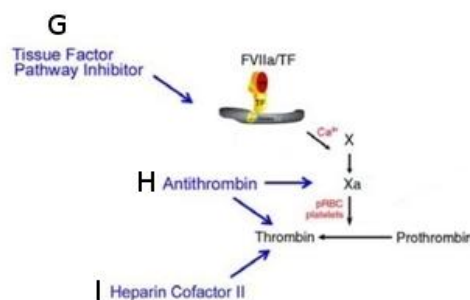
Další strategie bránící agregaci destiček je hydrolýza ADP, k níž dochází působením enzymu apyrázy (Valenzuela, 2004). Aktivita tohoto enzymu byla popsána u mnoha druhů klíšťat, včetně *I. scapularis* (Riberio a kol., 1985). Klíšťata mohou agregaci destiček zabránit také inhibicí aktivity trombinu. Trombin je důležitý enzym koagulační kaskády, štěpící fibrinogen na fibrin, který spolu s destičkami tvoří krevní zátku. Kromě toho aktivuje trombin receptory na krevních destičkách, což způsobí jejich aktivaci a následnou agregaci.

Poslední součástí hemostáze je koagulace neboli srážení krve. Jádrem koagulace je tzv. koagulační kaskáda- soubor po sobě jdoucích proteolytických aktivací proenzymů na aktivní enzymy, na jehož konci stojí aktivace trombinu, jenž štěpí fibrinogen na fibrin. Zesítnění fibrinu způsobí tvorbu sraženiny (Valenzuela, 2004). Jedním z antikoagulačních mechanismů objevených u klíštěte *Ixodes scapularis* je protein ixolaris, který funguje jako inhibitor tkáňového faktoru („tissue factor“, TF) (Francischetti a kol., 2002). TF stojí na počátku tzv. vnější cesty aktivace koagulační kaskády. Pokud dojde k poranění tkáně, naváže se TF na faktor FVIIa, čímž dojde ke vzniku katalyticky aktivního komplexu TF/FVIIa (Obr.1A), iniciujícího koagulační kaskádu (Francischetti a kol., 2009). Tento komplex přeměňuje faktor FX (Obr.1B) na faktor FXa (Obr.1C). Aktivní proteáza FXa pak postupně aktivuje protrombin (Obr.1D) na trombin (Obr.1E) a ten následně štěpí fibrinogen na fibrin. Celý tento sled aktivací vede k tvorbě krevní sraženiny (Obr.1F) (Valenzuela, 2004). Ixolaris je asi 16kDa velký protein, který je tvořen dvěma Kunitzovými doménami (Francischetti a kol., 2002) a specificky inhibuje aktivaci faktoru FX komplexem TF/FVIIa (Obr.1G) (Valenzuela, 2004). Dalšími, avšak endogenními zástupci antikoagulantů, jsou např. antitrombin (inhibuje faktor FXa a trombin- viz Obr.1H) a heparin kofaktor II (inhibuje trombin- viz Obr.1I) (Francischetti a kol., 2009).

Prokoagulační mechanismus



Antikoagulační mechanismus



Obr.1: Zjednodušené schéma koagulační kaskády a její regulace (Francischetti a kol., 2009). A- komplex FVIIa/TF; B,C- přeměna FX na FXa; D, E- aktivace protrombinu na trombin faktorem FXa; F- tvorba krevní sraženiny přeměnou fibrinogenu na fibrin, G- inhibice TF vázaného na FVIIa; H- inhibice faktoru FXa a trombinu antitrombinem; I- inhibice trombinu heparin kofaktorem II.

Součástí vrozené imunity, která se uplatňuje proti klíšťatům, je také zánět. Zánět vzniká v důsledku lokálního poranění (Valenzuela, 2004) a zánětlivé reakce se účastní buňky patřící do imunitního systému (neutrofilů, makrofágy, lymfocyty, endotelové buňky, eozinofily, žírné buňky, trombocyty), multienzymové systémy krevní plazmy (komplement, hemakoagulační, kininogenový systém), prozánětlivé a protizánětlivé cytokiny, proteiny akutní fáze, prostaglandiny a další metabolity kyseliny arachidonové a jiné zánětlivé mediátory (Ferenčík a kol., 2004). Mezi nejdůležitější buňky zánětu patří neutrofilů, jejichž hlavní funkcí je pohltnout a zabít invazní mikroorganismy proteázami a kyslíkovými radikály (Valenzuela, 2004). Klíšťata jsou schopna inhibovat většinu aktivit neutrofilů (např. produkci kyslíkových radikálů, uvolňování enzymů, fagocytózu bakterií aj.) (Ribeiro a kol., 1990). Migrace leukocytů během zánětlivé reakce je spouštěna chemokiny, pocházejících zejména z makrofágů, ale také např. z trombocytů. Chemokin interleukin-8 (IL-8) funguje jako chemoatraktant pro neutrofilů (Valenzuela, 2004). IL-8 zahájí aktivaci neutrofilů, jejich následnou adhezí a migraci přes endotelium na místo poranění. Proti tomuto chemokinu byla zaznamenána aktivita u různých druhů klíšťat (Valenzuela, 2004), včetně *I. ricinus* (Hajnicka a kol., 2001)

Histamin je velice účinný mediátor zánětu a vazoaktivní faktor. Váže se na H1 a H2 receptory. Tato vazba má za následek vazodilataci a zvýšení propustnosti kapilár, což vede ke vzniku edému (otoku) a erytému (zarudnutí kůže). Histamin je uvolňován aktivovanými

žirnými buňkami a bazofily. Kromě toho vazbou na H1 nebo H2 receptory může histamin regulovat odpověď T-lymfocytů (Jutel a kol., 2001).

Sliny klíšťat vykazují protihistaminovou aktivitu. Například ve slinách klíštěte *Rhipicephalus appendiculatus* se vyskytuje rodina proteinů (lipokaliny) vážících histamin (Paesen a kol., 1999) a jiné biogenní aminy- např. serotonin s podobnou aktivitou jako histamin. Serotonin se nachází v žirných buňkách hlodavců, jimiž je sekretován (Valenzuela, 2004). Vyvolává kontrakce hladké svaloviny, zvyšuje propustnost malých cév a indukuje vazokonstrikci velkých cév (Ferenčík a kol., 2004). Protein vážící se na serotonin byl izolován ze slinných žláz klíštěte *Dermacentor reticulatus* (Sangamnatdej a kol., 2002). Tento protein patří též mezi lipokaliny, které byly identifikovány i u klíštěte *I. scapularis* a *I. ricinus* (Valenzuela, 2004; Chmelař a kol., 2008).

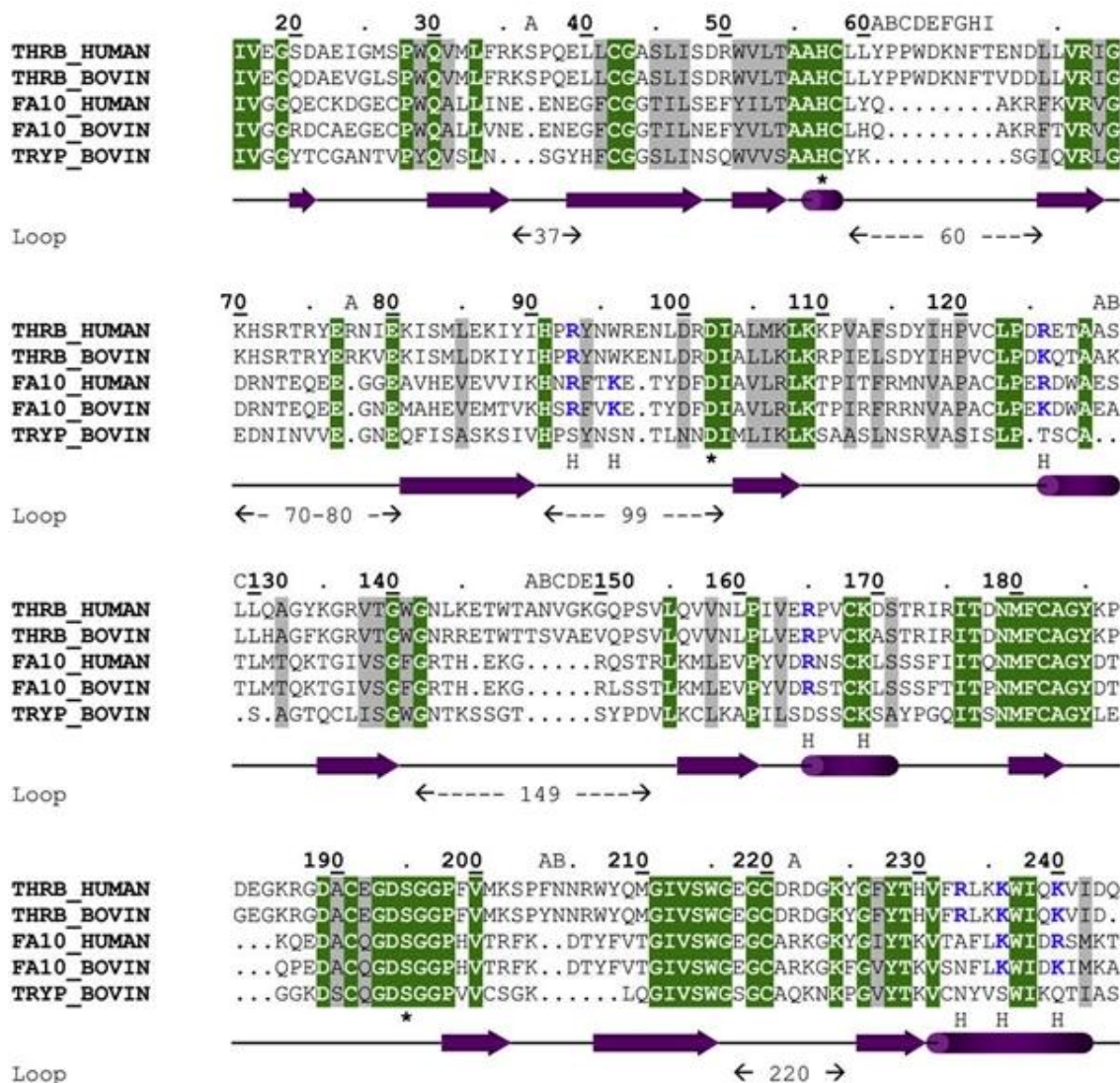
Další podstatnou roli v zánětlivé reakci hraje komplement, který je důležitý v obraně proti bakteriálním patogenům (Joiner, 1988). V kaskádě komplementu jsou produkovány zánětlivé mediátory C5a a C3a (Hugli & Muller-Eberhard, 1978). Tyto dva tzv. anafylotoxiny jsou chemotaktické pro neutrofile a mohou způsobit uvolnění histaminu z žirných buněk a bazofilů. Posledním krokem kaskády komplementu je vznik komplexu napadající bakteriální stěnu. Tento proces způsobí lýzu invazních mikroorganismů. Krev sající paraziti se mohou vyhnout zánětlivým reakcím a současně se chránit proti lýze střeva, pokud dojde k pozměnění nebo inhibici této kaskády komplementu. Klíště *I. scapularis* má ve slinách protein nazvaný Isac („*I. scapularis* salivary anticomplement“) (Valenzuela a kol., 2000), který specificky inhibuje kaskádu komplementu (Ribeiro, 1987).

Vzhledem k dlouhé době sání klíštěte má hostitel dostatek času na rozvinutí specifické imunitní odpovědi, která začíná prezentací antigenu Langerhansovými buňkami T-lymfocytům v lokálních mízních uzlinách. Vznikají pomocné T_H („helper T-cell“) a cytotoxické T_C lymfocyty. T_H lymfocyty dále diferencují na Th1 a Th2 subpopulace podle produkce odlišných cytokinů. Zatímco Th1 lymfocyty produkují IL(interleukin)-2, IL-3, IFN (interferon)γ a TNF („Tumor necrosis factor“) α, Th2 subpopulace se vyznačuje produkcí IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 a IL-13. V účinné odpovědi na klíštěcí sání se uplatňuje zejména Th1 typ imunitní odpovědi. Klíště dovede potlačit produkci cytokinů T-lymfocyty (Chmelař, 2005).

Ve své práci se zabývám především vrozenou (nespecifickou) imunitou a proteolýzou, neboť předmětem mé práce jsou dva zástupci Kunitz inhibitorů, tedy inhibitorů serinových proteináz, mezi něž patří např. hlavní koagulační faktory- viz následující kapitoly.

1.3. Serinové proteinázy a struktura koagulačních faktorů

Serinové proteinázy se dělí na dvě základní podskupiny: chymotrypsinové (u prokaryotních i eukaryotních organismů) a subtilisinové (pouze u bakterií) (Hartley 1970; James 1976). Do rozsáhlé rodiny chymotrypsinových serinových proteináz patří také katalytické domény hlavních koagulačních faktorů (FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa a trombinu). Na rozdíl však od typického zástupce, trypsinu, jsou tato katalytická místa více specifická- přeměňují jen jeden nebo několik málo substrátů a štěpí pouze omezené množství peptidických vazeb (nejčastěji jednu). Sekvence katalytických domén lidského a kravského trombinu a faktoru FXa jsou porovnány s katalytickou sekvencí kravského trypsinu na Obr. 2 (Corral-Rodríguez a kol., 2009).



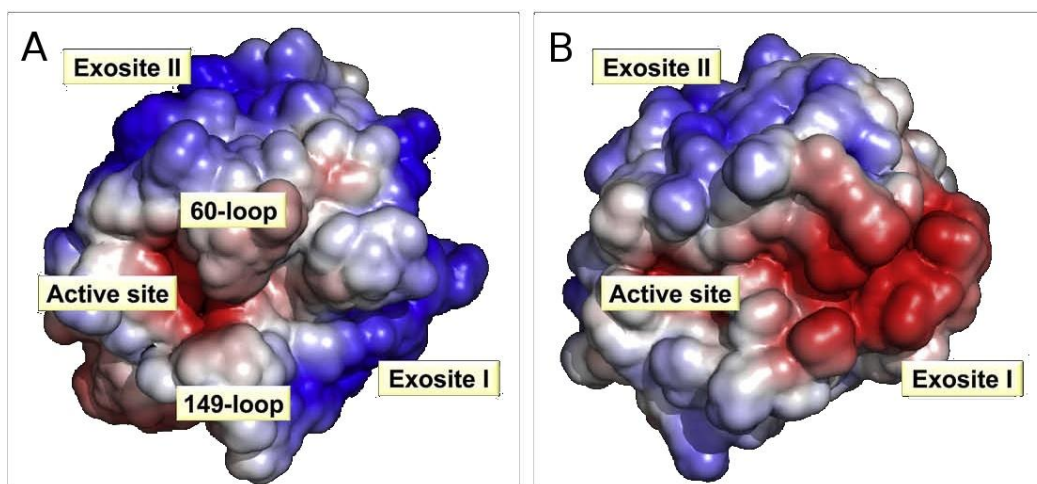
Obr. 2: Alignment sekvencí katalytických domén lidského/kravského trombinu, faktoru X a kravského trypsinu (Corral-Rodríguez a kol., 2009). Pro zjednodušení bylo opomenuto několik aminokyselinových zbytků u sekvencí lidského trombinu a obou faktorů FX na C-konci. Hvězdičkou je vyznačena katalytická trojice aminokyselinových zbytků, písmenem „H“ zbytky podílející se na vazbě heparinu. Hlavní strukturální jednotky vyznačené pod alignmentem odpovídají struktuře lidského a-trombinu.

Odhalením struktury trombinu bylo určeno umístění jeho aktivního centra, tvořeného trojicí aminokyselinových zbytků: His⁵⁷, Asp¹⁰² a Ser¹⁹⁵, na konci poměrně úzkého žlábků. Tento žlábek je obklopen dvěma velkými, pro trombin specifickými smyčkami (v pozici 60 a 149), které jsou tvořené větším počtem aminokyselinových zbytků než v případě trypsinu. Díky

svému strukturálnímu uspořádání není katalytický aparát trombinu snadno přístupný různým makromolekulám substrátů nebo inhibitorů, na rozdíl od jiných serinových proteináz. Další zvláštností trombinu je nápadně nerovnoměrné povrchové rozložení náboje- viz Obr.3A. Aktivní centrum, vykazující vysoce kyselý charakter (tedy záporný náboj), je vloženo mezi dvě rozsáhlé oblasti s kladným nábojem. Tato dvě místa se nazývají vedlejší vazebná místa I a II („exosite I, II“) a hrají důležitou roli při regulaci interakcí trombinu se substráty, kofaktory a inhibitory. Záporný náboj aktivního centra je způsoben především přítomností postranního řetězce glutamátu v pozici 192. Postranní řetězec Glu¹⁹² řídí vstup substrátu do katalytického místa a většině Kunitz inhibitorům znemožňuje obsazení trombinu (Bode a kol., 1989; Bode a kol., 2008)

Na rozdíl od trombinu, sekvence katalytické domény faktoru FXa se tolik neliší od katalytické sekvence trypsinu. Smyčka v pozici 60 má pouze o dva aminokyselinové zbytky více než trypsin. Smyčka v pozici 149 je dokonce o jeden zbytek kratší- viz obr. 2 a 3B (Brandstetter a kol., 1996; Kamata a kol., 1998; Padmanabhan a kol., 1993; Stubbs a kol., 1995). Toto uspořádání dovoluje zástupcům Kunitz proteinů (např. inhibitoru tkáňového faktoru TFPI- „tissue factor pathway inhibitor“) účinně inhibovat faktor FXa . Podobně jako trombin má i FXa nápadné povrchové rozložení náboje (Manithody a kol., 2002)- viz Obr. 3B.

Přirozené inhibitory trombinu dovedně využily těchto vlastností trombinu a faktoru FXa (unikátních složek aktivního centra a kladně nabitých vedlejších vazebných míst, vážících makromolekuly), a tím dosáhly neobyčejné účinnosti a specifity (Corral-Rodríguez a kol., 2009).



Obr. 3: Povrchové rozložení náboje, aktivní centrum, vedlejší vazebná místa (exosite I a II) (Corral-Rodríguez a kol., 2009). A- lidský trombin; B- lidský faktor FXa; červeně jsou vyznačeny záporně nabitě oblasti, modře oblasti nabitě kladně.

1.4. Inhibitory serinových proteináz

Inhibitory serinových proteináz se dělí do deseti rodin (Laskowski & Kato, 1980), z nichž tři převládají: Kunitz (PTI), Kazal (PSTI) rodina a rodina serpinů. V prvních dvou případech se jedná o relativně malé proteiny (okolo 60 aminokyselinových zbytků na doménu), vyznačující se vysokým obsahem disulfidických můstků (Richardson, 1981). Jejich poměrně malá velikost předchází vzniku rozsáhlých struktur hydrofobních jader. Disulfidické můstky zajišťují proteinům dostatečnou stabilitu (Read & James, 1986). Dalším společným znakem těchto inhibitorů je reaktivní smyčka- tzv. RSL („reactive-site loop“), která se zasouvá do aktivního centra proteinázy způsobem, který napodobuje vazbu substrátu (tzv. kanonický mechanismus) (Bode & Huber, 2000; Perona & Craik, 1997). V případě trombinu je kanonický způsob vázání spíše výjimkou. Napříč žlábkem jeho aktivního centra se místo reaktivní smyčky, stabilizované disulfidickými můstky, vkládají N-koncové zbytky, jako např. u hirudinu (Grütter a kol., 1990; Rydel a kol., 1990, 1991) a haemadinu (Richardson a kol., 2000)

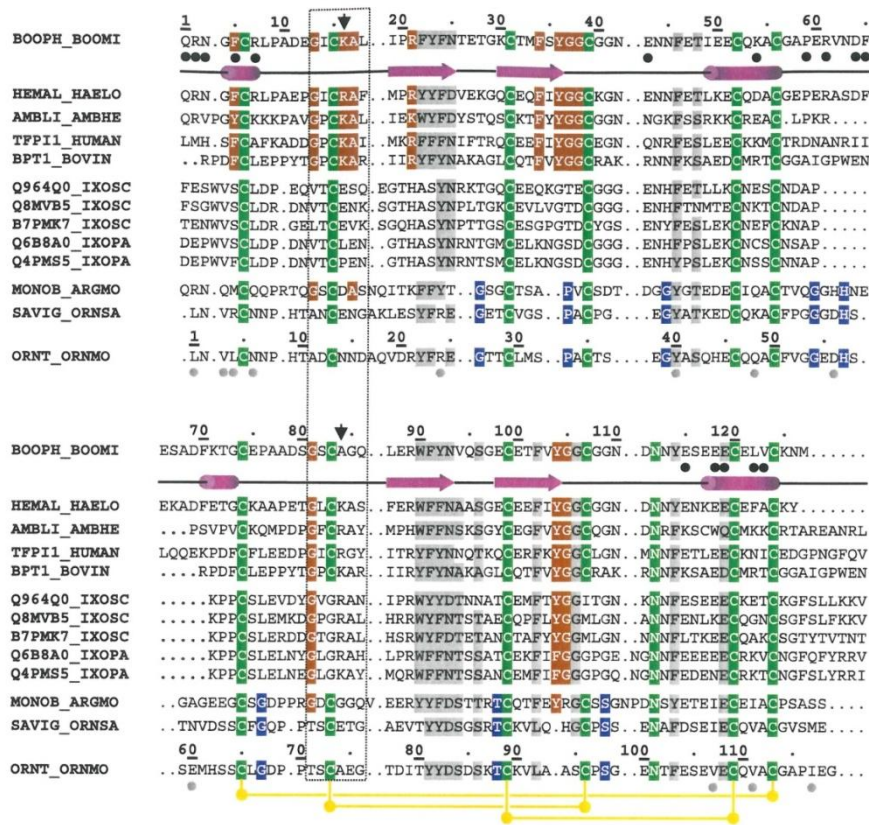
1.5. Kunitz inhibitory u klíš'at a mechanismus jejich inhibice

Na základě fylogenetické analýzy antikoagulantů obsahující Kunitz domény se dospělo k závěru, že inhibitory z *Ixodidae* a *Argasidae* si nejsou blízce příbuzné. Z toho vyplývá, že obě tyto skupiny klíš'at vyvinuly antihemostatické mechanismy nezávisle na sobě (Mans a kol., 2002).

Na Obr. 4 je znázorněn alignment sekvencí Kunitz inhibitorů koagulační kaskády z klíš'at (*Ixodidae*) a klíš'áků (*Argasidae*). Sekvence několika vybraných zástupců Kunitz inhibitorů jsou porovnány s BPTI a prvními dvěma N-koncovými doménami z lidského TFPI.

V alignmetu jsou zeleně označené přísně konzervované aminokyselinové zbytky- jedná se především o cysteiny, které mezi sebou tvoří disulfidické můstky- vyznačeny pod alignmetem žlutými spojnicemi. Aminokyselinové zbytky inhibitorů trombinu identické nebo velmi podobné (Arg/Lys, Phe/Tyr...) BPTI/TFPI jsou u *Ixodidae* vyznačeny hnědě.

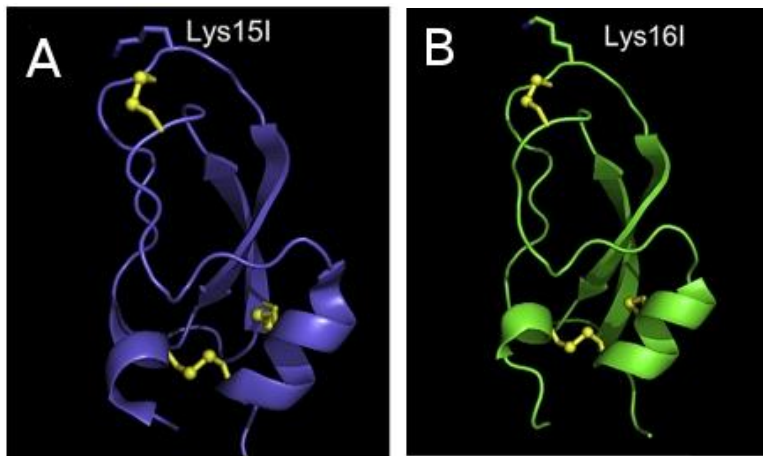
Aminokyselinové zbytky shodné s inhibitory trombinu u *Argasidae*, ale nenalezené u inhibitorů z *Ixodidae*, jsou vyznačeny modře. Aminokyselinové zbytky tvořící RSL jsou zarámovány.



Obr. 4: Alignment sekvencí Kunitz inhibitorů koagulační kaskády izolovaných z Ixodidae a Argasidae (Corral-Rodríguez a kol., 2009).

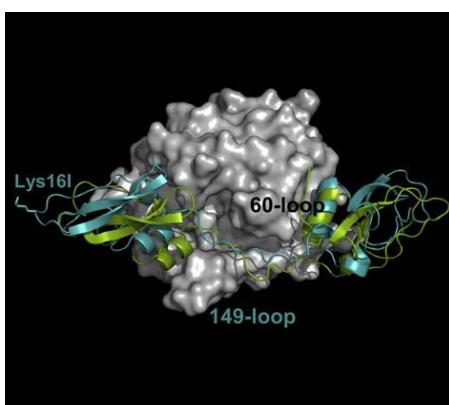
Mezi zástupce Kunitz inhibitorů patří např. aprotinin (tzv. BPTI- „bovine pancreatic trypsin inhibitor“)- viz Obr. 5A. Jedná se o účinný a hojně zastoupený inhibitor trypsinu, chymotrypsinu, plazminu a kallikreinu (Ascenzi a kol., 2003). Dalším zástupcem je TFPI („tissue factor pathway inhibitor“), třídoménový endogenní inhibitor počátečního kroku koagulační kaskády. Svoji N-koncovou doménou se váže na tkáňový faktor TF navázaný na FVIIa a svojí střední doménou na faktor FXa (Broze, 1995; Girard a kol., 1989). V protikladu s ústřední rolí Kunitz inhibitorů na začátku koagulační kaskády, je jejich účinnost v případě trombinu omezena. Trombin je špatně inhibován BPTI, TFPI i dalšími příbuznými kanonickými inhibitory (Ascenzi a kol., 1988; Broze a kol., 1990; Pintigny & Dachary-Prigent, 1992). Odolnost trombinu vůči Kunitz inhibitorům souvisí s úzkým žlábkem v jeho aktivním centru, do něhož se nemůže vložit poměrně velká reaktivní smyčka kanonických inhibitorů (Bode a kol., 1989, 2008). Další příčinou této odolnosti je přítomnost postranního řetězce Glu¹⁹²- viz kap. 1.3. Přes všechna tato zjištění byly však z klíšťat i klíšťáků izolovány účinné a specifické dvoudoménové Kunitz inhibitory trombinu- např. boophilin z klíštěte *Rhipicephalus microplus* (Macedo-Ribeiro a kol., 2008). Boophilin je složen ze dvou Kunitz

domén a kanonickou reaktivní smyčkou obsahuje v N-koncové Kunitz doméně (viz Obr. 5B). Kromě trombinu také účinně inhibuje další serinové proteinázy- např. trypsin nebo plazmin.



Obr. 5: 3D struktura Kunitz domény BPTI a boophilinu. A- Kunitz doména BPTI; B- N-koncová doména boophilinu.

Mechanismus inhibice trombinu boophilinem je znázorněn na Obr. 6 a 7B. Z Obr. 6 je patrné, že aminokyselinový zbytek lysinu Lys16I, který tvoří aktivní místo v RSL v N-koncové doméně boophilinu, je zcela přístupný a schopný interagovat s dalšími „trypsin-like“ serinovými proteinázami (např. s trypsinem nebo faktorem FXa) kanonickým způsobem (Corral-Rodríguez a kol., 2009). Proto může vznikat stabilní komplex: trombin-boophilin-trypsin, popř. FXa (Macedo-Ribeiro a kol., 2008). Boophilin tedy inhibuje zároveň FXa (vázaný na membránu nebo na faktor FVa) a meizotrombin (MzT; meziprodukt aktivace protrombinu)- viz Obr. 7B (Corral-Rodríguez a kol., 2009).

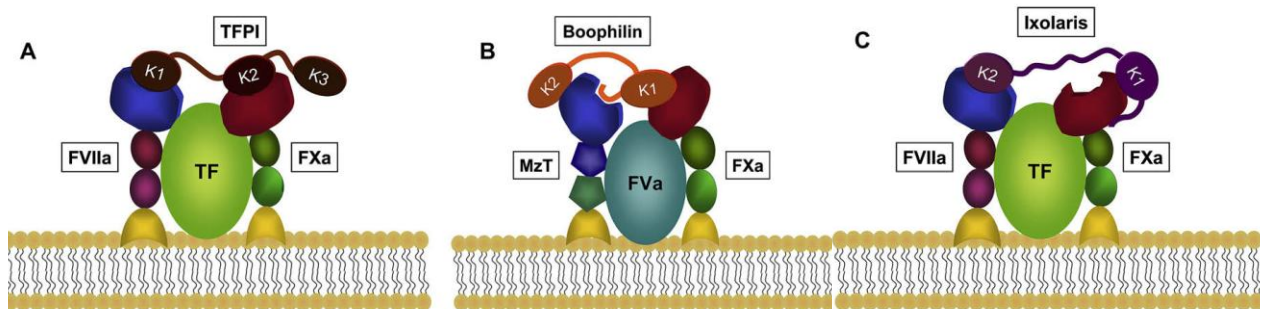


Obr. 6: Mechanismus inhibice trombinu boophilinem (Corral-Rodríguez a kol., 2009).

Šedý model znázorňuje trombin, modrozelený model boophilin.

Na obrázku Obr. 7A je schematicky znázorněn proces inhibice tří doménovým Kunitz inhibítorem TFPI. TFPI neinteraguje s volným faktorem FVIIa, ale vyžaduje předchozí tvorbu faktoru FXa komplexem TF/FVIIa (viz Obr.1A-C, kap.1.2). Až pak může interagovat zároveň s FXa a FVIIa (Girard a kol., 1989).

Proces inhibice ixolarisem je zobrazen na Obr. 7C. Ixolaris se nejdříve váže na vedlejší vazebné místo faktoru FXa (aktivní místo FXa zůstává neobsazeno) a následně interaguje s FVIIa vázaným v komplexu TF/FVIIa (Francischetti a kol., 2002; Monteiro a kol., 2005).



Obr. 7: Proces inhibice komplexů koagulační kaskády vícedoménovými Kunitz inhibitory (Corral-Rodríguez a kol., 2009). A- mechanismus inhibice komplexu TF/FVIIa endogenním TFPI, blokování faktoru FVIIa vázaným na TF N-koncovou Kunitz doménou, následná interakce střední domény s FXa; B- předpokládaný mechanismus inhibice komplexu protrombinázy (FVa-FXa) dvoudoménovým Kunitz inhibítorem- boophilinem; C- inhibice faktoru FVIIa vázaného na TF a faktoru FXa dvoudoménovým ixolarisem.

Mezi jednodoménové Kunitz inhibitory patří mnou zkoumané proteiny Monolaris 1 a Monolaris 2, které byly předmětem této práce.

2. Cíle práce

- a) Připravit dsRNA pro knock-down multigenní skupiny Kunitz-serpinů ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*.

- b) Připravit rekombinantní protein jednoho vybraného zástupce zkoumané skupiny v bakteriálním expresním systému.

- c) Použít rekombinantní protein pro přípravu polyklonálních protilátek v králíkovi.

3. Materiál a metody

3.1. Použité roztoky, média, chemikálie, vektory, buňky a kity

Tab.I.: Použité roztoky, média, chemikálie, vektory, buňky a kity.

Roztoky, média, chemikálie, vektory, buňky	
Název	Složení, upřesnění
PCR; Elektroforéza v agarózovém gelu	
2x PCR Master mix (Fermentas)	
10x High Fidelity polymeráza (Fermentas)	
10x buffer (Fermentas)	
dNTPs (Fermentas)	
Water nuklease-free (Fermentas)	
1x TAE pufr	40mM Tris-HCL, 1mM EDTA
Ethidium bromid	
Agarose for DNA electrophoresis (Serva)	
6x DNA Loading dye (Fermentas)	
Ambion loading dye (Ambion)	
DEPC H ₂ O	Diethylpyrokarbonát ve sterilní vodě (1000x ředěný), odstátý přes noc, autoklávovaný
DNA Ladder	100bp Plus DNA Ladder (Fermentas)
Restrikce; Ligace	
TANGO pufr (Fermentas)	
Restrikční endonukleázy	ApaI, XbaI, XhoI, NdeI (Fermentas)
10x pufr (Fermentas)	
Vektory	pET 17b (Merck), PLL10
T4 ligáza (Fermentas)	
Pěstování a kultivace bakterií	
Kompetentní buňky	<i>E. coli</i> Top10 (Invitrogen)
S.O.C. médium (Invitrogen)	

LB médium	1% bacto-trypton; 0,5% bacto-yeast extract; 0,5% NaCl; pH 7,0; sterilní
LB agar	1,5% bacto-agar v LB médiu
Antibiotika	1000x Ampicilin (100mg/ml)
Příprava dsRNA	
Proteináza K	1 ml proteinázy K (20 mg/ml) v 150 ml 10 mM Tris-HCl (pH 8) a 2mM CaCl ₂
10% SDS (dodecylsírán sodný)	
Fenol-chloroform	
Chloroform	
Izopropanol	
80% etanol (-20°C)	
DEPC H ₂ O	Diethylpyrokarbonát ve sterilní vodě (1000x ředěný), odstátý přes noc, autoklávovaný
Expres, purifikace a refolding rekombinantního proteinu	
Expresní buňky	<i>E. coli</i> BL21pLysS (Invitrogen)
S.O.C. médium (Invitrogen)	
LB médium	1% bacto-trypton; 0,5% bacto-yeast extract; 0,5% NaCl; pH 7,0; sterilní
LB agar	1,5% bacto-agar v LB médiu
Antibiotika	Ampicilin (100 µg/ml), chloramfenikol (35µg/ml)
IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) (Invitrogen)	
Lyzační pufr	0,4M NaCl, 0,1M KCl, 10% glycerol, 0,5% Triton X-100, 10 mM imidazol
Resuspendační pufr	20 mM Tris/HCl, pH 8,0
Izolační pufr	2M močovina, 20 mM Tris/HCl, 0,5M NaCl, 10mM imidazol, 1mM 2-merkaptioetanol, 2% Triton X-100, pH 8,0
Solubilizační pufr	6M guanidin hydrochlorid
Redukční činidlo	100x Dithiotreitol (DTT) 1M (Fermentas)
Refoldovací pufr	50mM Tris base, pH 8
Dialyzační roztok	50mM octan sodného

Pufry pro FPLC chromatografii	Pufir A: 50mM octan sodný (pH 6) Pufir B: 50mM octan sodný 1M NaCl (pH 6)
Elektroforéza v SDS polyarylovém gelu a Western blot	
Vzorkový pufr	NuPAGE [®] LDS Sample buffer (4x) (Invitrogen)
Redukční činidlo	NuPAGE [®] Sample Reducing agent (10x) (Invitrogen)
Redukční činidlo	100x Dithiotreitol (DTT) 1M (Fermentas)
Jodoacetamid (Sigma)	
Marker	See Blue [®] Plus 2 Prestained Standard (Invitrogen)
Gel pro SDS-PAGE analýzu	NuPAGE [®] Bis-Tris gel (Invitrogen)
Elektroforetický pufr	1x NuPAGE [®] Bis-Tris Running buffer (Invitrogen)
Barvicí roztok	0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250; 50% methanol; 10% kys. octová
Odbarvovací pufr	methanol:kys. octová:destilovaná H ₂ O (25:10:65)
Blotovací pufr	0,125 M Tris; 0,96 M glycin; 0,1% SDS; 20% metanol
Blotovací pufr	5% odtučněné sušené mléko, 1x PBS, 0,05% Tween
Získání protilátek z krevního séra; navázání protilátek; izolace tkání klíš'at	
Na acetátový pufr	Kyselina octová (99%), hustota 1,05; M= 6,5; 2,88ml kys.octové do 1litru destilované vody
Kyselina kaprylová	
Dialyzační roztok	5mM Na ₂ HPO ₄
2% azid (NaN ₃)	
PBS Tween	1x PBS 0,05% Tween
Sekundární protilátka	SwAR/Px (Sevapharma a.s.)
Substrátový roztok	0,6% (cca 10mg) 3,3'- diaminobenzidin tetrahydrochlorid, 100ml 0,1M Tris/HCl (pH 7,8), 100μl H ₂ O ₂
10x PBS	80g NaCl, 2g KCl, 14,4g Na ₂ HPO ₄ , 2,4g KH ₂ PO ₄ , pH 7,4, 1 l H ₂ O

Použité soupravy (Kity)	
Metoda	Název soupravy
Čištění PCR produktu z agarózového/EtBr gelu	JET Quick-Gel Extraction kitu (Genomed)
Čištění produktu z restrikční reakce	JET Quit PCR product purification spin kit/250 (Genomed)
Izolace plazmidu z buněk	Jet Quick- Plasmid Miniprep (Genomed)
Přečištění plazmidu	JET star LFU/Plasmid purification MAXI Kit/20 (Genomed)
Syntéza ssRNA	MEGAscript [®] T7 High Yield Transcription Kitu (Ambion)

3.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Primery pro všechny aplikace byly navrženy pomocí programu Oligoanalyzer na serveru <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. Jako templát jsem použila cDNA (contig 102) vyizolovanou ze slinných žláz samičky klíštěte *Ixodes ricinus* (4. den sání).

a) Primery pro přípravu konstruktů pro RNA interferenci:

RNAi_c102_Fwd_XbaI: 5'- AAT CTA GAA TGA AGG CAA CCC TCG TAG C - 3'

RNAi_c102_Rev_ApaI: 5'- TTG GGC CCT TAG AAG TTC TTG CCG G -3'

b) Primery pro přípravu konstruktů pro expresi:

c102_Fwd_NdeI: 5'- AAC ATA TGA GGC TGT CCG AGG GAC AAT G -3'

c102_Rev_XhoI: 5'- TTC TCG AGT TAG AAG TTC TTG CCG GGC TTC -3'

PCR probíhala podle programu uvedeného v tabulce Tab.II.

Tab.II.: Program PCR.

Proces	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Úvodní denaturace	93	5	
Denaturace	93	0,5	30 cyklů
Annealing	55	0,5	
Elongace	72	0,5	
Konečná elongace	72	8	

Pro RNAi byl použit 2x PCR Master mix (Fermentas), pro expresi High Fidelity polymeráza (Fermentas). Reakční směsi jsou uvedeny v tabulkách Tab.III a Tab.IV.

Tab. III: PCR reakce pro RNAi.

2x Master Mix (Fermentas)	12,5 µl
Fwd primer (10µM)	2,5 µl
Rev primer (10µM)	2,5 µl
DNA templát	2 µl (cca 4ng cDNA)
H ₂ O	5,5 µl
Celkem	25 µl

Tab.IV.: PCR reakce pro expresi.

10x pufr	2,5 μ l
Fwd primer (10 μ M)	2,5 μ l
Rev primer (10 μ M)	2,5 μ l
dNTPs (10 μ M)	2,5 μ l
High Fidelity polymeráza	0,25 μ l
DNA templát	2 μ l
H ₂ O	12,75 μ l
Celkem	25 μ l

3.3. Elektroforéza v agarózovém gelu

Do všech 25 μ l PCR směsí bylo přidáno 5 μ l 6x DNA loading dye (Fermentas).

K separaci byl použit 1% TAE agarózový gel s ethidium bromidem (minimálně 1 μ l ethidia bromidu na 100ml 1% agarózy v TAE pufru). Jako DNA marker byl použit 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Elektroforéza běžela při napětí 100V po dobu 15 – 30 min podle velikosti gelu. Pod UV světlem byl gel vyfocen. PCR produkt byl poté z gelu vyříznut a přečištěn pomocí JET Quick-Gel Extraction kitu (Genomed). Přečištění probíhalo dle návodu výrobce.

3.4. Restrikce

PCR produkt byl zaklonován do příslušného plazmidu pomocí restrikčních endonukleáz a T4 ligázy. Plazmid pro RNAi jsem pro reakci dostala již po restrikci příslušnými enzymy.

Složení jednotlivých restrikčních reakcí je uvedeno v Tab.V.

Tab.V.: Složení reakční směsi pro restrikci.

Restrikce:	PCR produkt (pro RNAi) [μ l]	PCR produkt (pro expresi) [μ l]-	Plazmid pET 17b (pro expresi) [μ l]-
DNA	30 (cca 0,11 μ g DNA)	30 (cca 0,14 μ g DNA)	0,3 (cca 0,15 μ g plazmidu)
TANGO pufr (Fermentas)	8	8	8

Enzym 1 (Fermentas)	1 (ApaI)	1 (XhoI)	1 (XhoI)
Enzym 2 (Fermentas)	1 (XbaI)	1 (NdeI)	1 (NdeI)
H ₂ O	0	0	29,7
Celkem	40	40	40

Restrikční reakce probíhaly 2 hodiny při teplotě 37°C. Poté byly přečištěny pomocí kitu JET Quit PCR product purification spin kit/250 (Genomed) a bylo postupováno podle návodu.

3.5. Ligace

Naštípaný a přečištěný PCR produkt byl zaligován do příslušného vektoru pomocí T4 ligázy (Fermentas). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce Tab.VI.

Tab.VI.: Složená reakční směsi pro ligaci.

10x pufr (Fermentas)	2 µl
Plazmid	5 µl
Naštípnutá cDNA	5 µl
Enzym ligáza (Fermentas)	2 µl
H ₂ O	6 µl
Celkem	20 µl

Směs byla ponechána přes noc při laboratorní teplotě.

3.6. Transformace

K transformaci byly použity buňky *E.coli* Top10 (Invitrogen). K 25µl buněk jsem přidala 6µl ligační směsi. Tato směs byla nejprve 30 min inkubována na ledě, posléze ponechána 1 min v termobloku při teplotě 42°C (k dosažení teplotního šoku) a nakonec dána opět na 2 min na led. Po přidání 125µl S.O.C. media (Invitrogen) se směs dala na 1,5 hod třepat při 37°C. Všechny buňky (asi 150 µl) byly vysety na LB agarové plotny obsahující 100µl/ml ampicilinu a inkubovány přes noc při 37°C.

3.7. Příprava a izolace plazmidové DNA

Jednotlivé pozitivní kolonie byly kultivovány v tekutých kulturách 4ml LB media s 4μl ampicilinu (100mg/ml) přes noc při teplotě 37°C a při třepání 225 otáček/min.

K vyizolování plazmidu byl použit kit Jet Quick- Plasmid Miniprep (Genomed) a bylo postupováno dle návodu. Pro ověření úspěšného vložení insertu do plazmidu byla provedena PCR pomocí vektorových primerů (T7 Fwd a T7 Rev).

3.8. Sekvenční reakce

Sekvence byla provedena na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) v Laboratoři genomiky, BC AV ČR.

3.9. Příprava maxiprepu pro RNAi a jeho purifikace

Kolonie bakterií nesoucí plazmid PLL10 s vloženým insertem se dala narůst do tekuté kultury 80ml LB media s ampicilinem (100μg/ml). Kultura se třepala při 37°C a 225 otáček/min přes noc. Pro přečištění byl použit kit JET star LFU/Plasmid purification MAXI Kit/20 (Genomed) a bylo postupováno dle návodu. Pomocí spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) jsem změřila koncentraci přečištěného plazmidu.

3.10. Restrikce přečištěného plazmidu

Plazmid byl štípnut restrikčními endonukleázami ApaI a XbaI (Fermentas), a to ve dvou oddělených reakcích. Směs pro restrikci je uvedena v tabulce Tab.VII. Množství plazmidu bylo spočteno tak, aby v reakci bylo 10μg DNA.

Tab.VII.: Reakční směs pro restrikci plazmidu.

Restrikce enzymem:	ApaI [μl]	XbaI [μl]
Plazmid pET 17b (c=2663,8ng/μl)	3,75	3,75
TANGO pufr (Fermentas)	5	5
Enzym (ApaI/XbaI)	6	6
H ₂ O	35,25	35,25
Celkem	50	50

Směs byla ponechána 2 hodiny ve vodní lázni při 37°C.

3.11. Purifikace linearizovaného plazmidu

K oběma 50µl reakcím jsem přidala 25µl proteinázy K a 3,75µl 10% SDS. Směs jsem nechala inkubovat 30min při 50°C a pak k ní přidala 80µl fenol-chloroformu (Sigma), řádně zvortexovala a stočila 5min při maximálních otáčkách. Vznikly dvě fáze. Horní (vodní) fázi (cca 80µl) jsem odebrala a přidala k ní 80µl chloroformu, zvortexovala a opět stočila 5min při maximálních otáčkách. K vodní fázi (cca 80µl) jsem přidala 56µl izopropanolu, směs jsem zamíchala (nevortexovala) a nechala inkubovat při -20°C po dobu 30min. Centrifugací (maximální otáčky, 30min, 4°C) získaný pelet byl promyt 80µl 80% etanolu (-20°C). Směs byla znovu stočena (maximální otáčky, 8min, 4°C). Následně vysušený pelet jsem rozpustila ve 20µl DEPC H₂O (1ml DEPC v 1000ml H₂O ponechán přes noc a poté zautoklávován). Poté jsem změřila koncentrace obou linearizovaných plazmidů, které musely dosahovat hodnoty > 120 ng/µl.

3.12. Syntéza jednořetězcové RNA (ssRNA)

Syntéza byla provedena pomocí MEGAscript[®] T7 High Yield Transcription Kitu (Ambion). Jednotlivé komponenty směsi jsou uvedeny v tabulce Tab.VIII.

Tab.VIII.: Reakční směs pro syntézu ssRNA.

Syntéza ssRNA pro plazmid štípnutý:	ApaI [µl]	XbaI [µl]
ATP	2	2
CTP	2	2
GTP	2	2
UTP	2	2
Pufr (37°C, zvortexovaný)	2	2
Čistý plazmid (1µg do reakce)	2,95 (c=340 ng/µl)	3 (c=334 ng/µl)
Enzymový mix	2	2
H ₂ O	5,05	5
Celkem	20	20

Směs jsem nechala inkubovat přes noc ve vodní lázni při 37°C. Zkumavky byly zalepeny parafilmem, aby nedošlo k vypaření vzorku.

3.13. Purifikace ssRNA

K oběma směsím jsem přidala 1µl DNázy a inkubovala 15min při 37°C ve vodní lázni. Pak jsem přidala 115µl H₂O a 15µl octanu amonného (5M, 100mM EDTA) a vše zamíchala. DNáza, H₂O a octan amonný byly použity z kitu MEGAscript[®] T7 High Yield Transcription Kit (Ambion). Pak jsem přidala 150µl fenol chloroformu (Sigma), zvortexovala a zcentrifugovala 5min při maximálních otáčkách. K vodní fázi (cca 150µl) jsem přidala 150µl chloroformu, opět zvortexovala a stočila 5min při maximálních otáčkách. K vodní fázi (cca 150µl) jsem přidala 110µl izopropanolu, směs jsem zamíchala a inkubovala půl hodiny při -20°C. Stočením vzniklý pelet (maximální otáčky, 30min, 4°C) jsem po vysušení rozpustila v 15µl DEPC H₂O. Pomocí NanoDropu jsem změřila koncentrace, které musely dosahovat hodnot vyšších než 3000ng/µl.

3.14. Hybridizace- syntéza dvouvláknové RNA (dsRNA)

Obě přečištěné ssRNA jsem naředila na stejnou koncentraci a smíchala v poměru 1:1. Směs jsem umístila do odměrného válce s vroucí vodou. Zkumavku jsem zalepila parafilmem a otvor válce zakryla hliníkovou fólií. Směs byla takto inkubována přes noc. Zhybridizovanou dsRNA jsem uschovala v -80°C před dalším použitím. Pro ověření úspěšnosti pokusu jsem provedla elektroforézu v agarózovém TAE gelu za použití Ambion loading dye.

3.15. Exprese proteinu

Sekvenací ověřené konstrukty byly transformovány do expresních buněk BL21pLysS (Invitrogen). K 25µl buněk jsem přidala do dvou oddělených reakcí 2µl plazmidové DNA (s insertem Monolaris 1 a Monolaris 2). Půl hodiny byly reakce inkubovány na ledě, 1min při 42°C a další 2min opět na ledě. Po přidání 125µl S.O.C. media (Invitrogen) se směsi 1 hodinu třepaly a pozitivní klony byly vyselektovány na LB agarových plotnách obsahujících ampicilin (100 µg/ml) a chloramfenikol (35µg/ml). Plotny byly inkubovány přes noc při 37°C. Druhý den byla do 10ml LB media s ampicilinem a chloramfenikolem přidána vybraná kolonie z narostlých bakterií a směs se dala třepat přes noc při 37°C. Následující den pak bylo přidáno 0,5ml této směsi k 20ml LB media s ampicilinem a chloramfenikolem a vše

se dalo třepat na 2 hodiny při 37°C. Pro pilotní expresi jsem odebrala 1ml vzorku a jeho pelet uchovala pro SDS-PAGE analýzu. K směsi jsem přidala 20µl IPTG (konečná koncentrace 1mM) (Invitrogen) a dala třepat při 37°C. Každou hodinu jsem odebírala 1ml vzorky, celkem 6x + vzorek po inkubaci přes noc. Z narostlé kultury jsem připravila glycerolstocky. Pelety z odebraných vzorků jsem rozsuspendovala v 0,5ml lyzačního pufru a buňky rozbila pomocí sonikátoru (30s, střední amplituda, cyklus= 1). Směs jsem poté stočila, pelet rozpustila v 0,5ml 20mM Tris-base, pH 8, a provedla SDS-PAGE analýzu. Vzorky na SDS-PAGE jsem připravila přidáním NuPAGE[®] LDS Sample buffer (4x) (Invitrogen), redukčního činidla NuPAGE[®] Sample Reducing agent (10x) (Invitrogen) a povařením (10 min při 70°C). Jako marker jsem použila See Blue[®] Plus 2 Prestained Standard (Invitrogen). Pro SDS-PAGE analýzu byl použit NuPAGE[®] Bis-Tris gel (Invitrogen). Elektroforéza běžela v 1x NuPAGE[®] Bis-Tris Running pufru (Invitrogen).

Dále už jsem pokračovala pouze s konstruktem obsahujícím Monolaris 1. K 20ml LB media s ampicilinem a chloramfenikolem jsem přidala vzorek z glycerostocku a dala směs přes noc třepat při 37°C. Narostlou kulturu jsem pak přidala do nového media (600ml LB media) v takovém množství, abych získala hodnotu optické hustoty $OD_{600} \approx 0,1$ (asi 15ml kultury). Směs jsem nechala třepat při 37°C po dobu potřebnou k dosažení $OD_{600} \approx 0,6$, tedy asi 2 hodiny. Pak jsem přidala IPTG (konečná koncentrace 1mM) (Invitrogen) a nechala 6 hodin třepat při 37°C. Centrifugací jsem získala buňky, které jsem promyla 80ml resuspendačního pufru. Směs jsem sonikovala 4x po dobu asi 40s, stočila (10 000g, 10min, 4°C). Odebrala jsem supernatant (tj. cytosolovou frakci) a pelet znovu promyla v 50ml izolačním pufru a stejně jako v předchozím kroku sonikovala a odebrala supernatant (tj. membránovou frakci). Provedla jsem SDS-PAGE analýzu z odebraných supernatantů a peletu (tj. inkluzních tělísek).

3.16. Přechištění rekombinantního proteinu

Inkluzní tělíška, obsahující rekombinantní protein, jsem rozpustila asi hodinovým mícháním na magnetické míchače v 10ml 6M guanidin hydrochloridu. Zbytek membrán z inkluzních tělísek jsem odstranila centrifugací (10000g, 15min). K supernatantu, obsahující rekombinantní protein, jsem přidala 100µl 100mM DTT a nechala směs 15min míchat při laboratorní teplotě. Směs jsem stočila (15000g, 10min) a pelet, obsahující nečistoty, odstranila. Poté jsem provedla refolding pomalým naředěním proteinu ve 2 litrech refoldovacího pufru (50mM Tris base, pH 8). Refolding probíhal v chladové místnosti při 6°C přes noc a měl zajistit vytvoření správné terciární struktury proteinu. Následující den jsem

refoldovací pufr s rekombinantním proteinem zcentrifugovala (10000g, 15min, 4°C), čímž jsem odstranila nečistoty obsažené v peletu, a supernatant přefiltrovala (filtr 0,2µm) pomocí vodní vývěvy. Rekombinantní protein v 50mM Trisu jsem zakoncentrovala pomocí aparatury PREP/SCALE-TFF Cartridge (Millipore) se spirálovou 3kDa membránou (Millipore). Zakoncentrovaný protein jsem stočila (10000g, 10min, 4°C) a odstranila nečistoty. Směs jsem zakoncentrovala pomocí aparatury Stirred Cell (Millipore) s 5kDa membránou (Millipore). Asi 5ml vzorek jsem dala do dialyzační komůrky s velikostí pórů 3 kDa a ponořila do 2 litrů 50mM octanu sodného. Výměna roztoku ve vzorku proběhla přes noc v chladové místnosti (6°C). Následující den jsem odebraný vzorek stočila (10000g, 10min, 4°C), abych odstranila precipitovaný protein, a ještě jej přefiltrovala přes 0,22 µm filtr filtrační injekční stříkačkou. K vzorku jsem přidala 5ml 50mM octanu sodného. Pro separaci rekombinantního proteinu jsem zvolila chromatografii FPLC („Fast protein liquid chromatography“) a kolonku MonoS 5/5 (Pharmacia), která je určená pro zásadité proteiny. Chromatografie probíhala na přístroji ÄKTA FPLC (GE Healthcare). Pro chromatografii byly použity dva pufry:

Pufr A: 50mM octan sodný (pH 5,5)

Pufr B: 50mM octan sodný 1M NaCl (pH 5,5).

Nejdříve jsem nechala kolonku promývat pouze pufrem A a postupně jsem zvyšovala gradient NaCl připouštěním pufru B. Zvyšujícím se gradientem NaCl se zvyšuje iontové napětí a dosáhne se uvolnění proteinů zachycených na koloně. Celý proces jsem sledovala prostřednictvím počítače. Bylo nutné vyzorovat rychlý nárůst absorpční křivky (při $\lambda=280\text{nm}$), který vypovídal o rychlém nárůstu koncentrace proteinu. Tuto frakci bylo potřeba zachytit do nových zkumavek. Před začátkem celého procesu jsem si prostřednictvím softwaru nastavila sbírání frakcí po 2ml. Přístroj pak sám řídil celý proces, dokud jsem jej sama manuálně nezměnila- tedy v momentě, kdy jsem předpokládala přítomnost rekombinantního proteinu a chtěla jsem jej oddělit od ostatních frakcí.

3.17. Získání protilátek z krevního séra králíka

Králík byl imunizován čtyřmi dávkami rekombinantního proteinu Monolaris1, který byl vyříznut z SDS polyakrylamidového gelu. První dávka byla smíchána s kompletním Freudovým adjuvans a další dávky s nekompletním Freudovým adjuvans v poměru 1:1.

Krevní sérum z králíka, získané centrifugací krve (2500g, 15min, 4°C) jsem smíchala s 50mM Na acetátovým pufrem (pH4) v poměru 1:2 (15ml séra k 30ml pufru). Pak jsem provedla srážení séra pomocí kaprylové kyseliny (25μl kaprylové kyseliny na 1ml směsi; přidávání po 3min za stálého míchání). Následující hodinu a půl probíhalo srážení při laboratorní teplotě. Po uplynulé době jsem směs zcentrifugovala (5000g, 10min) a přefiltrovala přes filtrační papír. Přefiltrovanou směs jsem napipetovala do dialyzačního střívka (předem namočeného v dialyzačním roztoku) a přes noc nechala dialyzovat ve 2 litrech 5mM Na₂HPO₄ v chladové místnosti (6°C). Vzorek odebraný z dialyzačního střevo jsem rozalikovtovala po 1ml do zkumavek. K dvěma alikvotům jsem přidala azid (0,02%) a uchovala při 4°C pro další práci. Zbylé alikvoty jsem nechala vysušit v lyofylizátoru.

3.18. Western Blot pro ověření účinnosti protilátek

Provedla jsem SDS-PAGE analýzu rekombinantního proteinu, naneseného do pěti jamek, pomocí kitu pro SDS elektroforézu (GE Healthcare). Rekombinantní protein byl z gelu elektroforeticky přenesen na PVDF membránu (Millipore) v blotovacím pufru za konstantního proudu (200mA) během 120 min. Marker společně s jedním vzorkem rekombinantního proteinu jsem obarvila v barvicím roztoku coomassie a následně odbarvila odbarvovacím roztokem. Zbylé 4 vzorky rekombinantního proteinu na membráně jsem nastříhala do 4 proužků a nechala je 2 hodiny třepat v mléce s PBS Tween (5g odtučněného sušeného mléka na 100ml 1x PBS 0,05% Tween) při laboratorní teplotě, aby nedošlo k nespecifickému navázání protilátek. Poté jsem je nechala inkubovat v 5ml mléka s PBS Tween a primární protilátkou v různém ředění: 100x, 500x, 1000x, 2000x (počáteční koncentrace protilátky: c= 467μg/ml). Přes noc jsem pak dala vzorky třepat do chladové místnosti. Následující den jsem membránu 3x promyla v PBS Tween třepáním po dobu 10min mezi jednotlivými promýváními. Dále jsem během hodiny nechala navázat sekundární protilátky (SwAR/Px, Sevapharma a.s.) 1000x ředěné v 10ml roztoku PBS Tween za stálého třepání při laboratorní teplotě. Po uplynulé době jsem opět membránu promyla. Na sekundární protilátky jsem nechala navázat substrát (0,6% 3,3' - diaminobenzidin tetrahydrochlorid) rozpuštěný v 100ml 0,1M Tris/HCl (pH 7,8) a 100μl H₂O₂. Tím jsem dosáhla zviditelnění sekundárních protilátek, a tedy i rekombinantního proteinu.

3.19. Izolace tkání klíšťat a detekce sledovaného proteinu v tkáních a slinách pomocí protilátek

Z pěti samic odebraných 5. den sání jsem v roztoku PBS izolovala slinné žlázy, střeva a ovaria. Tkáně jsem homogenizovala s redukčním činidlem NuPAGE[®] Sample Reducing agent (10x) a povařila společně s NuPAGE[®] LDS Sample buffer (4x) (Invitrogen) 10min při 100°C. Redukčního činidla a pufru jsem přidala tolik, abych získala celkový objem 150μl pro SG a ovaria, 500μl pro střeva. Občas jsem vzorky protřepala, po povaření je zcentrifugovala (maximální otáčky, 2 min) a odebrala supernatant. Pro SDS-PAGE analýzu jsem si také připravila sliny z klíštěte a rekombinantní protein do celkového objemu 60μl. Všechny vzorky jsem do gelu nanasla dvakrát, abych je pak mohla obarvit v coomassie a zároveň na ně nechat navázat protilátky. Elektroforéza proběhla v NuPAGE Bis-Tris gelu. Poté byly proteiny z gelu elektroforeticky přeneseny na PVDF membránu (Millipore) v blotovacím pufru za konstantního proudu (200mA) během 120 min. Marker a prvních pět vzorků jsem obarvila v barvicím roztoku coomassie a zbylých 5 vzorků jsem nechala 30 min třepat v mléce s PBS Tween. Poté jsem dala vzorky inkubovat s primární protilátkou (ředění 100x) v 5ml mléka s PBS Tween za stálého třepání v chladové místnosti přes noc. Následující den jsem membránu 3x promyla, nechala navázat sekundární protilátku, opět promyla a nechala navázat substrát (stejně jako v předchozím kroku).

4. VÝSLEDKY

4.1. Bioinformatická analýza: Charakteristika transkriptů a předpokládaných proteinů Monolaris 1 a Monolaris 2

Pomocí PCR metody se specifickými primery, navrženými podle sekvence contigu 102, jsem získala dvě částečně odlišné izoformy, Monolaris 1 a Monolaris 2. Oba transkripty, Monolaris 1 a Monolaris 2, mají celkem 282 bazí. Na Obr. 8 a 9 je uvedena jejich nukleotidová sekvence a přeložená peptidová sekvence pomocí programu ExPASy Translate Tool (<http://expasy.org/tools/dna.html>). Monolaris 1 a Monolaris 2 se od sebe liší zhruba v 18% ze všech aminokyselinových zbytků. Předpokládaná signální sekvence, identifikována pomocí programu SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), obsahuje 19 aminokyselinových zbytků a je u obou predikovaných proteinů zcela shodná. Signální sekvence (na Obr. 8 a 9 zeleně vyznačená část) je s velkou pravděpodobností ($p=0.998$) odštěpena v místě SMG-R v pozici mezi 19. a 20. aminokyselinou. Pomocí programů NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) a NetOGlyc 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) jsem určila potenciální N- a O-glykosylační místa. U predikovaného proteinu Monolaris 1 byla pro N-glykosylaci nalezena dvě místa- v pozici 38 s pravděpodobností $p=0,6036$ a v pozici 49 s pravděpodobností $p=0,6893$. O-glykosylační místo bylo u Monolaris 1 predikováno jen jedno (v pozici 85), navíc s velmi malou pravděpodobností $p=0,511$. U předpokládaného proteinu Monolaris 2 nebyla nalezena žádná místa pro N- ani O- glykosylaci (viz Obr. 8 a 9).

```
ATGAAGGCAACCCTCGTAGCCATTTGCTTCATCGCTGCTGTCGCGTACTCCATGGGGAGG
M K A T L V A I C F I A A V A Y S M G R
CTGTCCGAGGGACAATGCAGAGCCCTGTGCCATCTACTTTATGCGCCGCAAATGCAACA
L S E G Q C R A P V P S T L C A A N A T
GTTAGAACAGTCTACTCCTTTAGCAACCGTACTAACAATGCGTGAGTATGAAGACCTGT
V R T V Y S F S N R T N K C V S M K T C
GCGGAAGGTGTAAACCTTTTTGAAAAACCAGATTGCTGCAGGAGTGAATGCCCGTACGGA
A E G V N L F E K P D C C R S E C P Y G
AAATATTTCCAAGACCCCGGGAAGCCCGGCAAGAAGCTTCTAA
K Y S K I P G K P G K N F -
```

Legenda:
Signální sekvence
N- glykosylace
O- glykosylace
Cysteiny

Obr. 8: Nukleotidová a peptidová sekvence Monolaris 1.

ATGAAGGCAACCCTCGTAGCCATTTGCTTCATCGCTGCTGTGCGCTACTCCATGGGGAGG
 M K A T L V A I C F I A A V A Y S M G R
 CTGTCCGAGGGACAATGCAGAGCCCCGTGCCATATACTTCATGCGCCGCAAATGCTAAA
 L S E G Q C R A P V P Y T S C A A N A K
 CTTAGAATAGTCTACACCTTCAGAAACCATAGTAGCAAATGCGAGCGTATGGAGACCTGT
 L R I V Y T F R N H S S K C E R M E T C
 GCGGAAGGTGTAAACCACTTTGAAAAAGAAAAGCTGCTGCAAGAGTGAATGCCCGTACGGA
 A E G V N H F E K E N C C K S E C P Y G
 AAACATTCCAAGACCAGCGGGAAGCCCGGCAAGAAGCTTCTAA
 K H S K T S G K P G K N F -

Legenda:
 Signální sekvence
 Cysteiny

Obr. 9: Nukleotidová a peptidová sekvence Monolaris 2.

V tabulce Tab.IX. jsou uvedeny základní vlastnosti obou predikovaných proteinů. Jak je vidět, Monolaris 1 má o něco málo vyšší izoelektrický bod než Monolaris 2. Oba, se svým izoelektrickým bodem mírně přesahujícími hodnotu 9, vykazují zásaditý charakter. Počtem kladných aminokyselinových zbytků jsou si velice podobné: 12 u Monolaris 1 a 13 u Monolaris 2. Záporně nabitých aminokyselinových zbytků obsahuje Monolaris 1 5 a Monolaris 2 7.

Tab.IX: Vlastnosti predikovaných proteinů Monolaris 1 a Monolaris 2.

Predikovaný protein (bez signální sekvence)	Monolaris 1	Monolaris 2
Počet aminokyselinových zbytků	74	74
Molekulární hmotnost [Da]	8085,2	8302,4
Izoelektrický bod (pI)	9,25	9,08
Počet kladně nabitých aminokyselinových zbytků (Arg, Lys)	12	13
Počet záporně nabitých aminokyselinových zbytků (Asp, Glu)	5	7

Monolaris 1 a Monolaris 2 spadají do rodiny Kunitz inhibitorů. Jedná se o inhibitory serinových proteináz, např. koagulačních faktorů FVIIa a FXa (viz Úvod), které jsou tvořeny jednou nebo více Kunitz doménami. Kunitz doména je obvykle tvořena asi 50 aminokyselinovými zbytky, dvěma alfa helixy a dvěma beta skládanými listy, které jsou upevněny v typické 3D struktuře pomocí disulfidických můstků.

Nachází se v široké škále proteinů napříč celou podříší Eumetazoi. Kunitzovy domény se mohou vyskytovat v komplexu s jinými nepříbuznými proteinovými moduly. Pak se jedná o tzv. heterogenní proteiny. Existují ovšem i homogenní proteiny, tvořené výhradně Kunitzovými moduly (Corral-Rodríguez, 2009; Ponte a kol., 1988). Více o Kunitz inhibitorech je pojednáno v kapitole 1.5.

Pomocí programu Clustal W (BioEdit 7.0.9.0. (Hall, 1999)) byl vytvořen alignment peptidových sekvencí několika Kunitzů nejpříbuznějších proteinům Monolaris 1 a Monolaris 2- viz Obr. 10. Tyto sekvence byly nalezeny v databázi GenBank pomocí tBLASTx algoritmu, který porovnává nukleotidovou sekvenci přeloženou ve všech šesti čtecích rámcích s databází nukleotidových sekvencí, rovněž ve všech šesti čtecích rámcích (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100     110
Monolaris IR1  -----MKRATLVATC---FIAAVAYSMGRLSEGCRRAPVPSTLCAANATVRTVYFSNRTNKCVSMK--TCAEG---VNLBEKPDCCRSEC---BYGKYSKTPGKPGKNF*-----
Monolaris IR2  -----MKRATLVATC---FIAAVAYSMGRLSEGCRRAPVPYTSCAANAKLRIVYTFRNHSSKCRERME--TCAEG---VNHFEKENCCKSEC---BYGKHSKTSQKPGKNF*-----
DQ066150.1| I. scap.1  -----MKRATLVATC---FLAAVAYSMGRLSEGCRRRPVPSTSCANG--LRTIYYFSNHTNKCEKMQ--SCGVG---VNHFEKEECESEEC---BYGKGSKPGRMSRRKF*-----
DQ066178.1| I. scap.2  -----MKRATLVATC---FIAAASYSMGRLAETQCRFPVPVTSCAEGAELRTVYSFNNTNQCEPVRG--SCGEG---VNOFETKDCRREC---BYGKHSKLGKVSQDGT*-----
DQ066087.1| I. scap.3  -----MKRATLVATC---FLAAVAYSMGRLTEQQCRTPVPSSMCAEDAKTRTIYSFNNTNKCEBVDQ--SCGEG---INQFEKKGCCISEC---BYGRHSKPSNNSNGNF*-----
AF483693.1| I. scap.4  -----MKRATLVATC---FLAAVAYSMGRLTEQQCRTPVPSSMCAEDAKTRTIYSFNNTNKCEBVDQ--SCGEG---INQFEKKGCCISEC---BYGRHSKPSNNSNGNF*-----
AF483686.1| I. scap.5  -----MKRATLVATC---FLAAVAHSMGRLSEGCRRRPVPSTSCASG--VRTIYYFSNHTNKCEKMQ--SCGVG---VNHFEKKKCESEC---BYG-----EKF*-----
AY674256.1| I. pac.1  -----MKRATLVATC---TFSAVVL-ISALESKEDCEAPHATPQCAPNAILVTYYNNGTHKCEEDY--NCAKG---PMDFTTEECCKKAC---BYGIYASDR*-----
AY674183.1| I. pac.2  -----MQPALQFIIFMMSFLVLVGHALVKNQGERCTEVVDEGPGRAL---IPRYFYNMETEKCCEFDYGGCYGN---NNNFFNESSCTSTC---KGVSKMDMCELTSKKDCRQMSN
AY674182.1| I. pac.3  -----MEIEFLCTFFVLILGSSKCEGTGLPEIICMMEPNELGRAS---IPGWFYDKSIDSCLELTFGAARAKNEHVNRRETKEKCESEMCRPHVQSFCFDGPPETCKGESTIM
EG363907.1| Dand 1  -----XKATLVVIT---VAFWEHSSAASSXSRAQETPTVENSIV---LLKWSFXRESNECBERNY--VCREN---ENLFDSEECTRTTC---PPISGAAPRSKEKDCYYWLSRGN
EG363923.1| Dand 2  -----XMDATFITATLVIT---VAFWEHSSAASSRSRAQETPTVENSIV---LLKWSFNRESNECBERNY--VCREN---ENLFDSEECATTC---PPISGVPPRPKEKDCYYWLYKGN
2DDI  -----EAEAEFTDACLVPVQGPGRGW---EPRWAYSPLLQCCHPFVYGGCEGN---GNNEHSRESCEDAC---EVVDHHHHHH-----

```

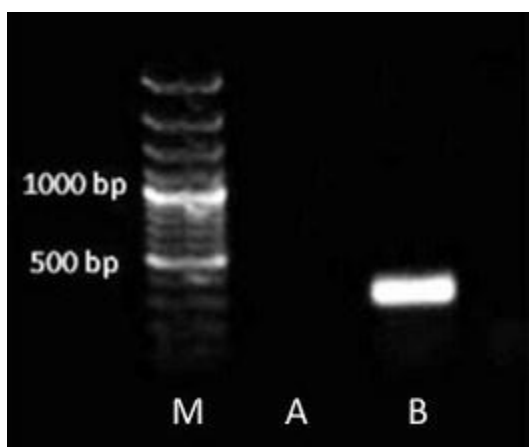
Obr. 10: Alignment peptidových sekvencí Kunitz proteinů nejpodobnějších sekvencím Monolaris 1 a Monolaris 2 z různých druhů klíšťat. I. scap.- *Ixodes scapularis*, I. pac.- *Ixodes pacificus*, Dand- *Dermacentor andersoni*, 2DDI- sekvence proteinu, podle níž byla namodelována 3D struktura Monolaris 1 a Monolaris 2 (viz Diskuze). Šedě jsou označeny chemicky a fyzikálně si podobné aminokyseliny, černě aminokyseliny identické.

4.2. Výsledky experimentální práce

4.2.1. RNA interference

4.2.1.1. Syntéza dsRNA

Pomocí PCR z cDNA izolované ze slinných žláz samičky *I. ricinus* (4. den sání) jsem získala PCR produkt o velikosti asi 300 bp, jak je vidět na obrázku Obr. 11.



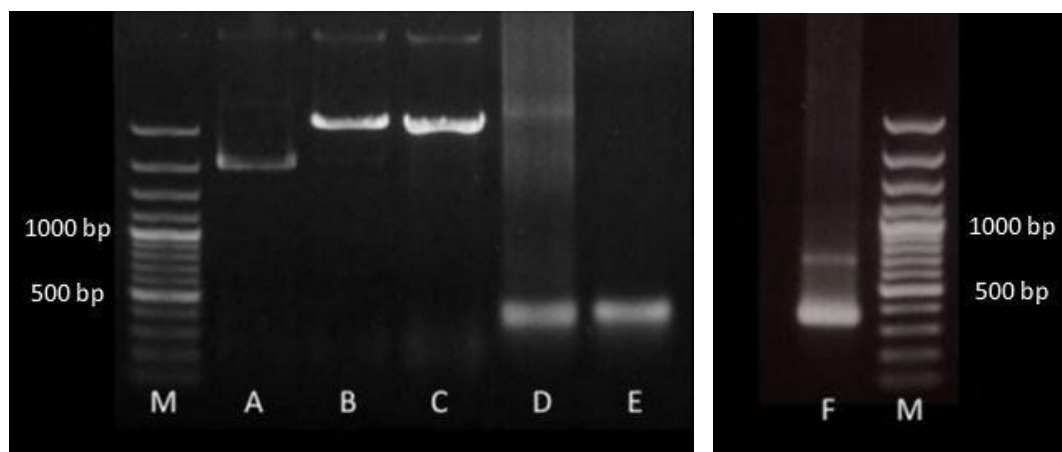
Obr. 11: PCR produkt pro RNAi. M- marker, A- negativní kontrola, B- PCR produkt.

Po zaligování PCR produktu do příslušného vektoru, transformaci plazmidu do buněk *E. coli* a izolaci plazmidové DNA jsem ověřila vložení inzertu do plazmidu prostřednictvím PCR reakce a následné elektroforézy v agarózovém gelu. Z Obr. 12 je patrné, že pozitivně vyšel pouze jeden klon, který jsem poslala na sekvenaci.



Obr. 12: Kontrola přítomnosti inzertu ve vektoru.

Po namnožení plazmidu s vloženým inzertem a jeho přečištění (Obr.13A) jsem provedla restrikcí plazmidu enzymy ApaI (Obr. 13B) a XbaI (Obr.13C) ve dvou oddělených reakcích. Přečištěný linearizovaný plazmid posloužil jako templát pro syntézu jednořetězcové RNA (ssRNA). ssRNA nasyntetizována podle plazmidu štípnutého enzymem ApaI je na Obr.13D, ssRNA nasyntetizované podle plazmidu štípnutého enzymem XbaI na Obr.13E. Po přečištění obou ssRNA jsem provedla jejich hybridizaci, která vedla ke vzniku dvouřetězcové RNA (dsRNA) (Obr.13F), určené pro injikaci do klíšťat.



Obr. 13: Příprava dsRNA. M-marker, A- kruhový plazmid, B-linearizovaný plazmid enzymem ApaI, C- linearizovaný plazmid enzymem XbaI, D- ssRNA (ApaI), E- ssRNA (XbaI), F- dsRNA.

4.2.1.2. Injikace dsRNA do klíšťat *I. ricinus* a následné sání samic na morčatech.

Nasyntetizovanou dsRNA jsem nainjikovala po cca 1,5 μ g do 21 samic klíštěte obecného a do dalších 21 samic po 0,5 μ g kontrolní GFP. Nainjikovaná klíšťata jsem pak dala sát na morčata a každý den sledovala úspěšnost jejich sání- zaznamenávala jsem počet odpadlých samic, vážila jejich tělesnou hmotnost a hmotnost snůšky- viz tabulka Tab.X a Tab.XI. Průměry z jednotlivých měření (tělesné hmotnosti samice po nasátí, hmotnosti vaječné snůšky) a procentuelní zastoupení uhynulých samic jsem vnesla do grafu a porovnávala mezi sebou hodnoty pro Monolaris 1 a GFP- viz Obr. 14, 15 a 16.

Tab. X: Průběh RNAi po nainjiování dsRNA.

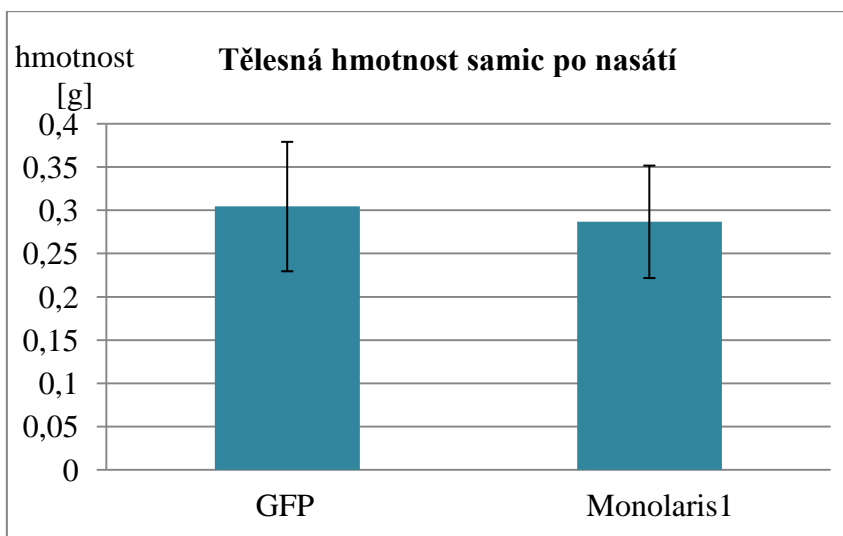
Samice (Monolaris1)	Stav samice	Hmotnost samice po nasání [g]	Počet dnů sání	Hmotnost vaječné snůšky [g]
1	D	0,404	8	X
2	D	0,234	8	X
3	D	0,159	8	X
4	D	0,24	8	X
5	D	0,275	8	X
6	+	0,356	9	0,065
7	+	0,287	9	0,053
8	N	0,167	9	X
9	+	0,287	7	0,024
10	+	0,318	9	0,062
11	N	0,295	7	X
12	+	0,283	9	0,038
13	+	0,285	9	0,062
14	+	0,365	9	0,055
15	N	0,363	9	X
16	+	0,271	9	0,045
17	A	X	0	X
18	A	X	0	X
19	A	X	0	X
20	A	X	0	X
21	A	X	0	X
Průměr		0,287		0,0505
SD		0,065		0,0132

Tab. XI: Kontrola s GFP.

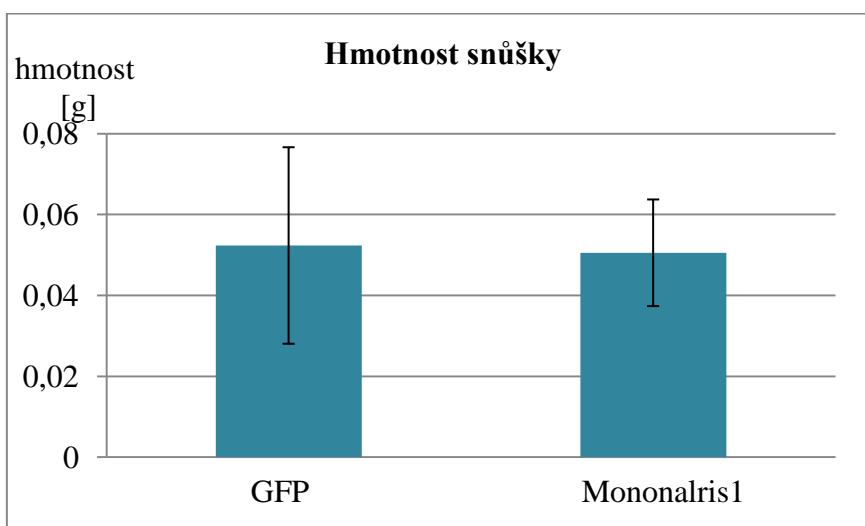
Samice (GFP)	Stav samice	Hmotnost samice po nasání [g]	Počet dnů sání	Hmotnost vaječné snůšky [g]
1	+	0,21	7	0,0153
2	+	0,294	7	0,0609
3	N	0,322	8	X
4	+	0,351	8	0,0341
5	N	0,353	8	X
6	N	0,367	8	X
7	+	0,264	8	0,0620
8	+	0,349	8	0,0285
9	+	0,305	8	0,0730
10	+	0,228	8	0,0535
11	+	0,362	8	0,0667
12	+	0,35	8	0,085
13	+	0,215	8	0,0514
14	+	0,324	8	0,0722
15	+	0,371	8	0,0835

16	+	0,371	8	0,0034
17	D	0,0691	8	X
18	D	0,244	8	X
19	D	0,306	8	X
20	+	0,359	9	0,0263
21	+	0,379	10	0,0688
Průměr		0,304		0,0523
SD		0,075		0,0243

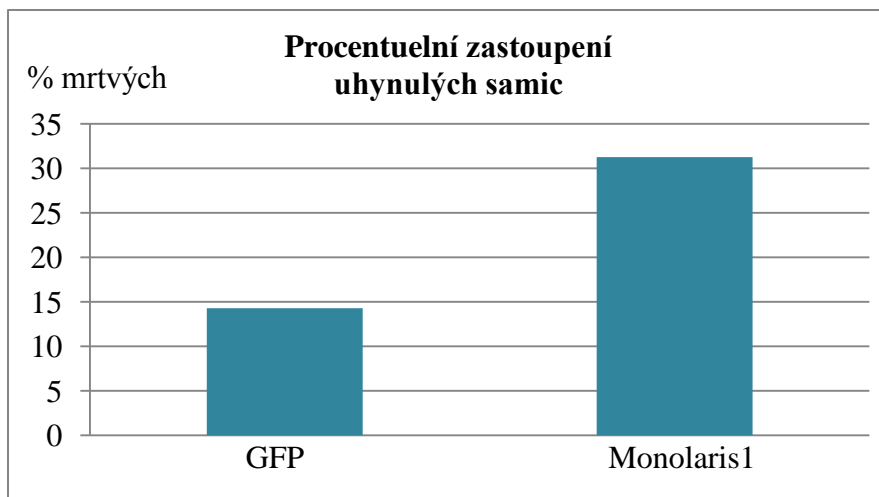
+ = samice živá, nakladla; N = samice nenakladla; D = samice chcípala; A = samice se nepřisála.



Obr. 14: Tělesná hmotnost samic po nasátí. Sloupce představují průměrnou hmotnost a úsečky směrodatnou odchylku.



Obr. 15: Hmotnost snůšky. Sloupce představují průměrnou hmotnost a úsečky směrodatnou odchylku.



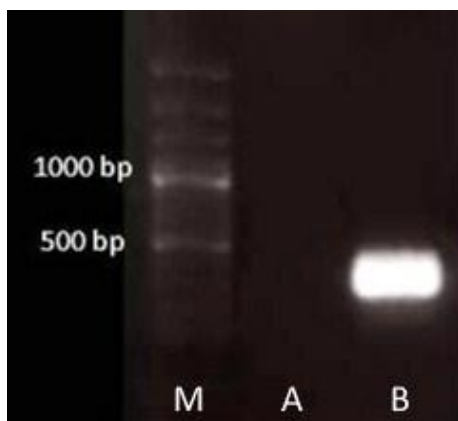
Obr. 16: Procentuelní zastoupení uhynulých samic (GFP versus Monolaris 1).

Injikace dsRNA do klíšťat byla provedena jen jednou. Zatím jsem neověřila, zda byl gen skutečně utlumen a zda se příslušný protein neexprimoval. Současná získaná data nevykazují signifikantní rozdíl mezi pokusnými a kontrolními klíšťaty, a to ani v hmotnosti samic ani v hmotnosti snůšky. Jediný rozdíl jsem pozorovala v úhynu samic, který byl vyšší u Monolaris 1 než u kontrolní skupiny. Nicméně na základě jednoho pokusu nelze vyvodit spolehlivý závěr, a proto je třeba experiment zopakovat.

4.2.2. Syntéza rekombinantního proteinu a výroba polyklonálních protilátek

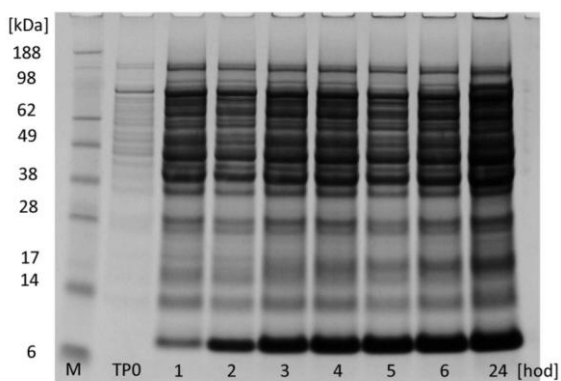
4.2.2.1. Syntéza rekombinantního proteinu a jeho přečištění

PCR reakcí z cDNA izolované ze slinných žláz samičky *I. ricinus* (4. den sání) jsem získala PCR produkt o velikosti zhruba 300 bp, jak je vidět na obrázku Obr. 17.



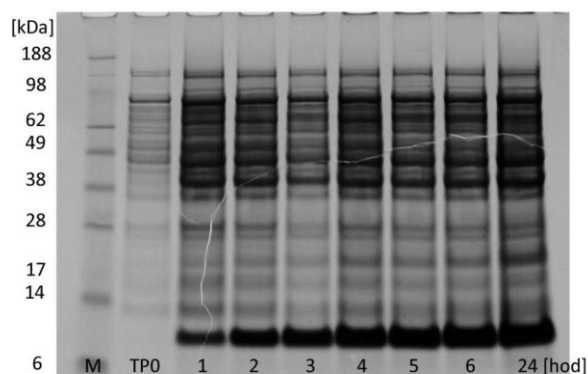
Obr. 17: PCR produkt. M- marker, A- negativní kontrola, B- PCR produkt.

PCR produkt jsem zaligovala do expresního vektoru pET17b (Merck), který jsem namnožila transformací a kultivací v *E. coli*, plazmidovou DNA jsem izolovala a ověřila jsem vložení inzertu do plazmidu prostřednictvím PCR reakce a následné elektroforéze v agarózovém gelu. Pozitivně vyšly dva klony, které jsem poslala na sekvenaci. Sekvenací byly identifikovány dva homologní proteiny, které byly pracovně nazvány Monolaris 1 a Monolaris 2. Sekvenací ověřené konstrukty (s inzerty Monolaris 1 a Monolaris 2; sekvence na Obr. 8 a 9) byly transformovány do buněk BL21pLysS. Na LB agarových plotnách s příslušnými antibiotiky (viz Metody) byly vyselektovány pozitivní kolonie a po namnožení vybrané kolonie v 10ml kultuře LB media s ampicilinem a chloramfenikolem jsem provedla pilotní expresi. Výsledek z pilotní exprese pro Monolaris 1 a Monolaris 2 je na obrázku Obr. 18 a 19. Obě pilotní exprese proběhly úspěšně. V čase 0 (TP0), tj. v době indukce exprese pomocí 1mM IPTG, nebyl v buňkách ještě podle očekávání přítomen žádný rekombinantní protein. S každou hodinou však množství rekombinantního proteinu narůstalo a exprese proteinu se zastavila kolem šesté hodiny po přidání IPTG. Díky pilotní expresi jsem zjistila čas nutný pro expresi proteinu.



Obr. 18: Pilotní exprese Monolaris 1.

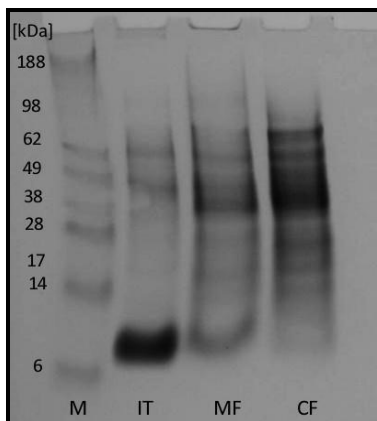
M- marker, TP0- čas 0 („time point zero“),
1 až 24 hod- po přidání IPTG.



Obr. 19: Pilotní exprese Monolaris 2.

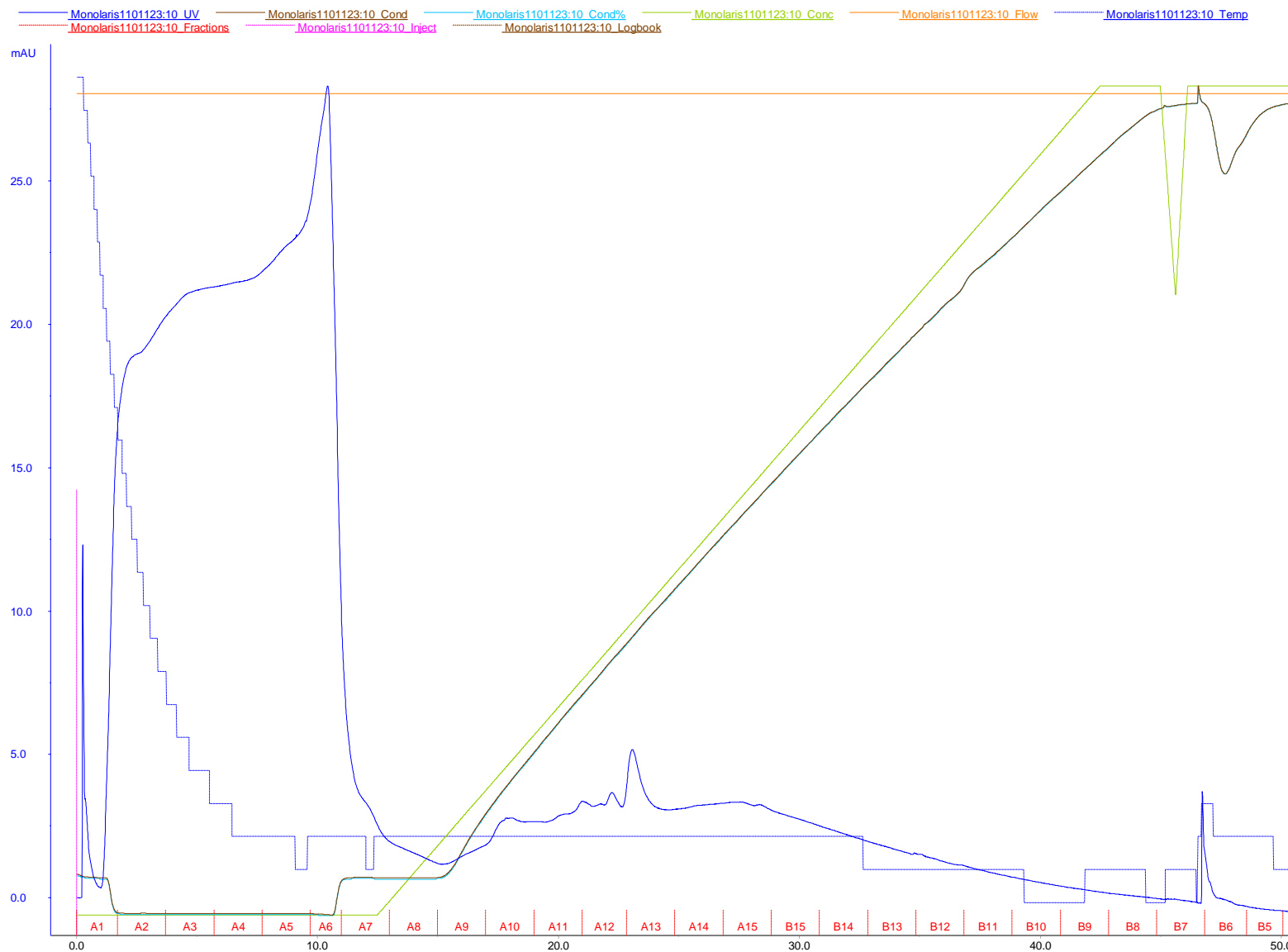
M- marker, TP0- čas 0 („time point zero“),
1 až 24 hod- čas po přidání IPTG.

Výsledek exprese kultury v 600 ml LB média s ampicilinem a chloramfenikolem po 6 hodinové inkubaci s IPTG je znázorněn na Obr. 20. Rekombinantní protein o velikosti cca 8kDa je přítomen ve frakci obsahující inkluzní tělíska.



Obr. 20: SDS-PAGE analýza jednotlivých frakcí izolace. M- marker, IT- inkluzní tělíska, MF- membránová frakce, CF- cytosolová frakce.

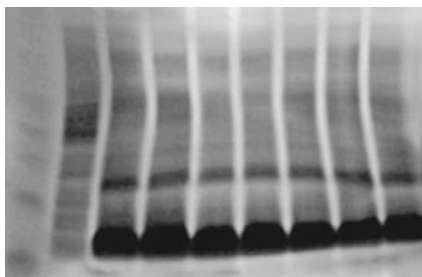
Po rozpuštění inkluzních tělísek (obsahující rekombinantní protein) v solubilizačním pufru, přidání DTT a odstranění nečistot (centrifugací a filtrací) jsem provedla refolding pro vytvoření správné terciární struktury proteinu. Poté jsem protein zakoncentrovala (celý postup popsán v kap. 3.16) a nechala jej dialyzovat v 50mM octanu sodném. Po odstranění precipitovaného proteinu ze vzorku jsem provedla FPLC chromatografii s použitím kolony pro metodu MonoS (iontová výměna). Rekombinantní protein se z kolony uvolnil ještě před zvyšováním gradientu NaCl, jak je patrné z Obr. 21. Rekombinantní protein byl zachycen ve frakcích A6 a A7.



Obr. 21: Průběh FPLC chromatografie. Modře je vyznačena absorpční křivka (vypovídá o koncentraci proteinu), zelená křivka znázorňuje koncentraci pufru B (tedy narůstající gradient NaCl), hnědá křivka je vodivost (úměrná gradientu soli); těsně nad osou x jsou červeně vyznačeny jednotlivé frakce; osa x znázorňuje čas, osa y absorbanci při 280nm.

Frakci A6 a A7 jsem přefiltrovala pomocí koncentrační zkumavky s 30kDa póry (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices) opakovanou centrifugací po 5min (5000g). Na filtru se zachytily proteiny větší než 30kDa. Poté jsem přenesla flow-through z předchozí filtrace do koncentrační zkumavky s 3kDa filtrem a opakovanou centrifugací (5min, 5000g) jsem získala asi 1ml vzorek s rekombinantním proteinem (zachycen v horní části zkumavky). Pomocí SDS-PAGE analýzy jsem ověřila přítomnost rekombinantního proteinu v tomto 1ml vzorku a změřila koncentraci. Koncentrace vyšla 0,04mg/ml, což nebylo dostatečné množství pro imunizaci králíka. Proto bylo zapotřebí zopakovat expresi proteinu.

Po expresi (ve 2 litrech LB media) jsem získaná inkluzní tělíska s rekombinantním proteinem rozpustila v 5ml 6M guanidin hydrochloridu a k směsi přidala 60μl 1M DTT. Směs jsem stočila (15min, maximální otáčky) a odebraný supernatant (cca 0,5ml) přenesla do dialyzačního sítěva. Dialýza probíhala v kádince s vodou na magnetické míchače po dobu jedné hodiny, po které byl vzorek zbaven guanidin hydrochloridu. K vzorku, odebranému z dialyzačního sítěva, jsem přidala redukční činidlo a vzorkový pufr (Invitrogen) a provedla SDS-PAGE analýzu- viz Obr. 22.



← Protein Monolaris 1
(≈8kDa)

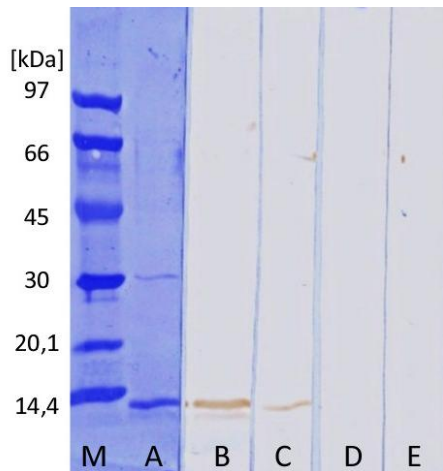
Obr. 22: SDS-PAGE analýza rekombinantního proteinu Monolaris 1 pro následnou homogenizaci a imunizaci králíka.

Rekombinantní protein jsem z gelu vyřízla a homogenizovala s fyziologickým roztokem PBS.

4.2.2.2. Výsledky ze získání polyklonálních protilátek

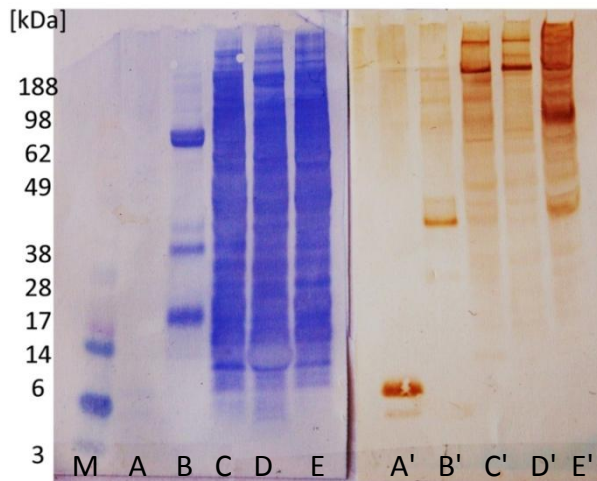
Proteinem vyříznutým z SDS polyakrylamidového gelu a homogenizovaným ve fyziologickém roztoku PBS byl imunizován králík. Po imunizaci jsem z krevního séra králíka získala protilátky. Pro ověření funkčnosti protilátek jsem nejprve provedla SDS-PAGE analýzu rekombinantního proteinu (Obr. 23A), pak protein přenesla elektroforeticky na PVDF membránu z gelu prostřednictvím Western blotu. Jeden vzorek jsem nechala obarvit v coomassie (Obr. 23A) a zbylé vzorky inkubovala s primární protilátkou v různých koncentracích. Abych dosáhla zviditelnění primární protilátky, navázané na proteinu, byla potřeba na ni nechat navázat komerčně dostupnou sekundární protilátku, značenou pomocí

HRP („horse radish peroxidase“). Po přidání substrátu pro peroxidázu se pak celý tento „sandwich“ zviditelnil (Obr. 23B-E).



Obr. 23: Ověření účinnosti primární protilátky v různých koncentracích. M- marker; A- rekombinantní protein Monolaris 1 obarvený v coomassie; B až E- protein Monolaris 1 s navázanými protiláčkami a substrátem při různém ředění primární protilátky v tomto pořadí: 100x, 500x, 1000x, 2000x.

Pro detekci proteinu Monolaris 1 v různých tkáních a slinách klíštěte jsem provedla SDS-PAGE analýzu rekombinantního proteinu a proteinů z izolovaných slinných žláz, střev, ovaríí a slin klíštěte. Proteiny jsem opět elektroforeticky přenesla na PVDF membránu. Jednu část vzorků jsem obarvila v coomassie (Obr. 24A-E) a na druhou nechala navázat protilátky a substrát (Obr. 24A'-E').

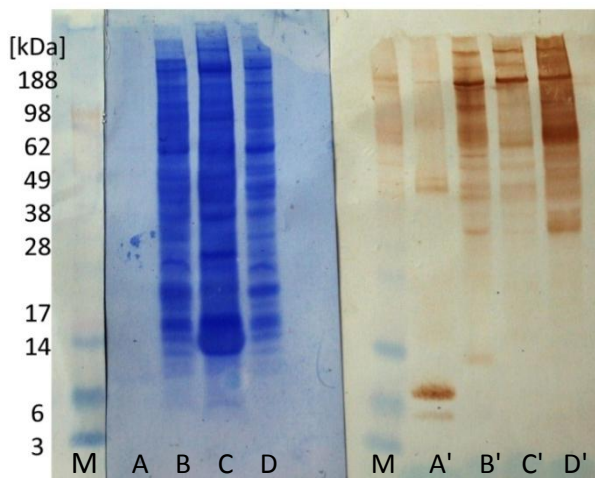


Obr. 24: Detekce proteinu Monolaris 1 v tkáních a slinách klíštěte. M- marker, A až E- proteiny obarvené v coomassie, A' až E'- proteiny s navázanými protiláčkami a substrátem; A, A'- rekombinantní protein, B, B'- sliny, C, C'- slinné žlázy, D, D'- střevo, E, E'- ovaria.

Z Obr. 24 je patrné, že se protilátky navázaly i na nějaký větší protein (okolo 188kDa) v slinných žlázách a ve střevě. Mohlo dojít ke spojení několika proteinů Monolaris 1

na základě interakce mezi cysteiny. Pro ověření této hypotézy jsem celý proces znovu zopakovala, avšak s přidáním většího množství redukčního činidla DTT a jodoacetamidu (váže se na thiolovou skupinu), které měly zabránit vzniku těchto nechtěných vazeb mezi proteiny.

Připravila jsem si zásobní roztoky DTT a jodoacetamidu (IAA): 5mg DTT/100 μ l a 185mg IAA/1ml. Do reakce jsem použila ředění 10x obou zásobních roztoků. Vzorky jsem povařila 5min při 100°C a provedla SDS-PAGE analýzu, western blot, barvení v coomassie a navázání protilátek se substrátem. Z výsledku pokusu, znázorněného na Obr. 25, je patrné, že reakce proběhla stejně jako v předchozím kroku- protilátky se navázaly na protein o velikosti cca 188kDa v slinných žlázách a střevě.



Obr. 25: Navázání protilátek s přidáním většího množství redukčního činidla a IAA.

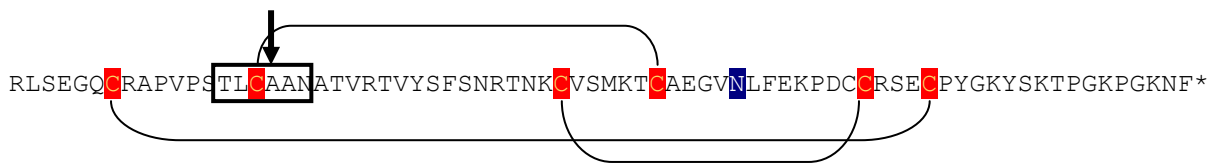
M- marker, A až D- proteiny obarvené v coomassie, A' až D'- proteiny s navázanými protilátkami a substrátem; A, A'- rekombinantní protein, B, B'- slinné žlázy, C, C'- střevo, D, D'- ovaria.

5. DISKUZE

5.1. Monolaris 1 a Monolaris 2, zástupci jednodoménových Kunitz proteinů

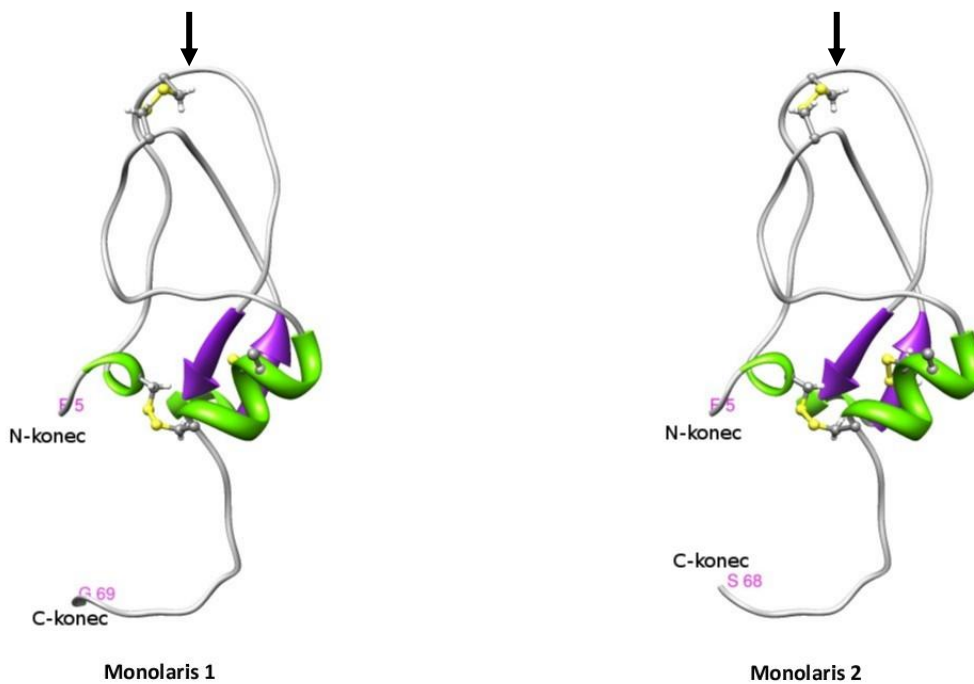
Proteiny Monolaris 1 a Monolaris 2 byly předmětem mé práce. Oba proteiny jsem bioinformaticky vyhodnotila a s Monolaris 1 dále pokračovala i v experimentálních pokusech. Sekvence obou proteinů jsou uvedeny na Obr. 8 a 9 v kapitole 4.1.

Monolaris 1 a Monolaris 2 patří do rodiny Kunitz proteinů, které se vyznačují menším počtem aminokyselinových zbytků a vysokým obsahem disulfidických můstků, jak již bylo zmíněno v kapitole 1.5. Cysteiny, které mezi sebou tvoří disulfidické můstky, hrají důležitou roli při utváření sekundární struktury proteinu a jsou v Kunitz doménách přísně konzervovány- viz alignment na Obr. 4. Na Obr. 26 jsou v peptidické sekvenci Monolaris 1 vyznačeny vazby mezi jednotlivými cysteiny. Jaké konkrétní cysteiny se spolu váží, jsem určila pomocí programu Chimera (UCSF). Pokud srovnáme toto schéma na Obr. 26 se schématem na Obr. 4 (žluté vazby pod alignmentem), pak shledáme shodu. Kromě těchto šesti cysteinů je u Kunitz inhibitorů ještě přísně konzervovaný asparagin (na Obr. 26 vyznačen modře).

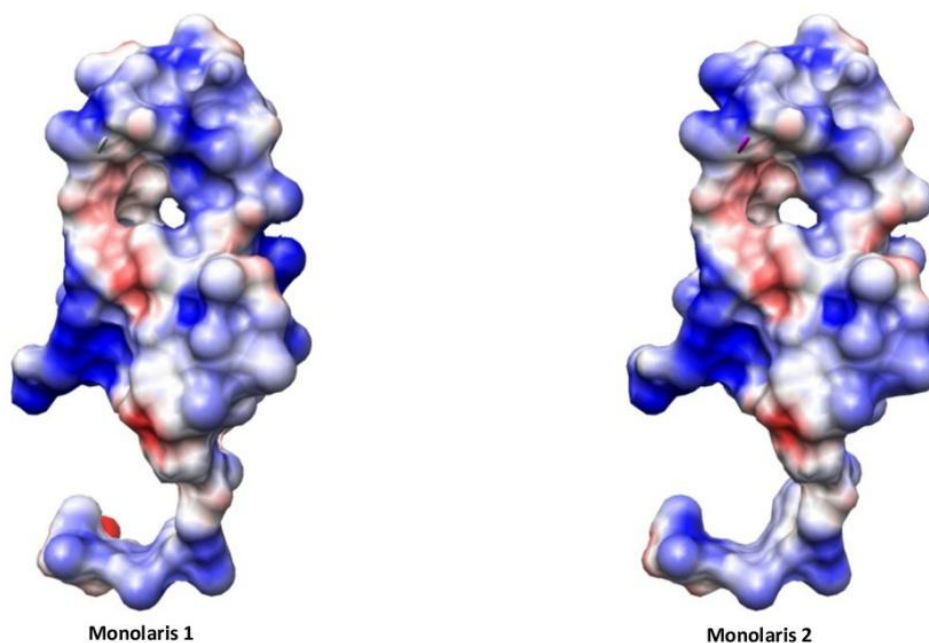


Obr. 26: Peptidová sekvence Monolaris 1 s vyznačenými vazbami mezi cysteiny, přísně konzervovanými aminokyselinovými zbytky a oblastí RSL. Přísně konzervované aminokyselinové zbytky jsou označeny červeně (cysteiny) a modře (asparagin); předpokládané místo reaktivní smyčky RSL je ohraničeno rámečkem a šipkou aktivní místo inhibitoru.

Program Phyre (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/index.cgi>) našel nejpodobnější peptidové sekvence proteinům Monolaris 1 a Monolaris 2, podle nichž namodeloval terciární struktury obou těchto proteinů. Jako vzor byl vybrán protein (PDB kód 2DDI; jedná se o Kunitz doménu lidského proteinu tzv. Wfikkn1), jehož sekvence je uvedena v alignmentu na Obr. 10, kap. 4.1. Pro vizualizaci a další úpravy byl použit program UCSF Chimera. Na Obr. 27 je znázorněna předpokládaná terciární struktura obou proteinů Monolaris 1 a Monolaris 2, na Obr. 28 pak povrchové rozložení náboje.



Obr. 27: Terciární struktura Monolaris 1 a Monolaris 2. Zeleně jsou vyznačeny α -helixy, fialově β -skládané listy, žlutě vazby mezi cysteiny, černá šipka směřuje k předpokládanému aktivnímu místu reaktivní smyčky inhibitoru.



Obr. 28: Terciární struktura Monolaris 1 a Monolaris 2 a povrchové rozložení náboje. Modře jsou vyznačeny kladně nabitě oblasti, červeně záporně nabitě, bílé jsou neutrální.

Srovnáme-li terciární strukturu Monolaris 1 a Monolaris 2 (Obr. 27) se strukturou Kunitz domén známých inhibitorů, např. BPTI a boophilinu (Obr. 5, kap. 1.5), zjistíme, že jsou si velmi podobné- dva stejně orientované α -helixy (jeden s jednou otáčkou u N-konce, druhý s necelými třemi otáčkami u C-konce), dva stejně orientované β -skládané listy (antiparalelní naproti sobě) a vazby mezi cysteiny ve shodných polohách.

Na základě znalostí známých struktur Kunitz domén inhibitorů jsem u Monolaris 1 a Monolaris 2 určila předpokládané aktivní místo RSL- viz Obr. 26 a 27 (černá šipka). V peptidové sekvenci na Obr. 26 jsem zarámováním označila všechny aminokyselinové zbytky, které pravděpodobně tvoří RSL.

Z Obr. 28 vyplývá, že oba proteiny, Monolaris 1 a Monolaris 2, mají vcelku zásaditý charakter (viz rozšířené modré oblasti). Na jistých místech však vykazují záporný náboj (červené oblasti). S touto skutečností souvisí i tabulka Tab.IX v kapitole 4.1, která zaznamenává celkový počet kladně a záporně nabitých aminokyselinových zbytků v proteinu. Kladně nabitě zbytky převládají.

Přestože Monolaris 1 a Monolaris 2 jsou si v mnoha ohledech velmi podobné, zajímavý výsledek přineslo zjištění potenciálních N- a O- glykosylačních míst, popsané v kapitole 4.1. Zatímco predikovaný protein Monolaris 1 obsahuje dvě možná N- glykosylační místa a jedno O- glykosylační místo, protein Monolaris 2 pravděpodobně není vůbec glykosylován. To by mohlo svědčit o rozdílné funkci obou proteinů.

Cílem mé práce bylo prozkoumání funkce proteinu Monolaris 1 (jeho eventuální vliv na sání klíštěte) a určení jeho přítomnost v různých tkáních *I. ricinus*.

Z DNA známé sekvence, izolované ze slinných žláz klíštěte *I. ricinus*, jsem postupným procesem došla k syntéze dvouřetězcové RNA, kterou jsem následně nainjikovala do samiček klíštěte, a tím se pokusila gen utlumit. Druhým úkolem mé práce byla příprava rekombinantního proteinu vybraného zástupce, jím pak imunizovat králíka a získat polyklonální protilátky pro detekci proteinu v různých tkáních a slinách klíštěte. Výsledky z RNA interference (RNAi) jsou zatím jen předběžné a na pokusu se bude dále pokračovat. Pro dostatečné množství dat bude nutné pokus zopakovat a teprve pak vyvodit spolehlivý závěr. Také bude potřeba ověřit, zda byl gen skutečně utlumen. Z grafů na Obr. 14-16 v kapitole 4.2.1.2 bychom mohli pozorovat jistý vliv Monolaris 1 na sání klíštěte. Klíšťata s nainjikovanou dsRNA Monolaris 1 vykazovala oproti klíšťatům s nainjikovaným kontrolním GFP vyšší úmrtnost, zatímco tělesná hmotnost

a hmotnost snůšky byly pro obě skupiny stejné.

Z cDNA pro Monolaris 1 se mi podařilo pomocí exprese v bakteriálním systému připravit rekombinantní protein. Bohužel se mi pro imunizaci nepovedlo získat dostatečné množství proteinu po celém procesu čištění, završeného FPLC chromatografií.

Pravděpodobně došlo k jeho vysrážení v jednotlivých krocích čištění. Z tohoto důvodu jsem pro imunizaci králíka musela použít protein vyříznutý z gelu po SDS-PAGE analýze a homogenizovaný v PBS. Z krevního séra králíka po imunizaci jsem získala polyklonální protilátky, které jsem spolu s komerčně dostupnou sekundární, HRP značenou protilátkou a substrátem použila pro detekování proteinu Monolaris 1 v tkáních a slinách klíštěte. Na Obr. 24 v kap. 4.2.2.2 je vidět, že protilátky poměrně citlivě reagovali na nějaký větší protein (o velikosti cca 188 kDa) v slinných žlázách, střevě a ováriích. Kunitz proteiny díky velkému obsahu cysteinů tvoří disulfidické můstky a mohou se tak spojovat i mezi sebou a tvořit větší komplexy. Tento fakt mě vedl k názoru, že se protilátky navázaly na nějaký takový „komplex“ z proteinů Monolaris 1. Pokus jsem proto opakovala s přidáním většího množství redukčního činidla a jodoacetamidu, což mělo zabránit interakcím mezi proteiny. Výsledek (viz Obr. 25, kap. 4.2.2.2) byl však stejný jako v předchozím případě. Protilátky tedy buď reagují zkříženě s jiným proteinem, nebo se jedná o kovalentní komplexy Monolaris 1 a neznámého, či neznámých proteinů.

Zajímavé je, že k podobným výsledkům dospěla také studentka Tereza Cermanová ve své magisterské diplomové práci (Cermanová, 2009). T. Cermanová se také zabývala Kunitz proteiny. V jejím případě reagovaly protilátky, vytvořené po imunizaci proteinem Ixoccludin 2 (cca 17kDa), na protein ve slinných žlázách o velikosti cca 57kDa.

6. ZÁVĚR

Z klíštěte *Ixodes ricinus* byly získány dva nové geny, homology Monolaris 1 a Monolaris 2, o velikosti 282 bp s otevřeným čtecím rámcem kódujícím přibližně 8,1kDa velký protein Monolaris 1 a 8,3kDa Monolaris 2. Oba proteiny patří do rodiny Kunitz inhibitorů, takže se předpokládá jejich vliv na utlumení hostitelské imunity prostřednictvím interakce se serinovými proteinázami.

Z předběžných výsledků RNA interference byl pozorován jen částečný vliv Monolaris 1 na sání klíštěte. Po nainjikování dsRNA Monolaris 1 (a předpokládaném utlumení genu) byla zaznamenána pouze vyšší úmrtnost klíšťat. Tělesná hmotnost a hmotnost snůšky nevykazovaly pokles.

Z cDNA pro Monolaris 1 byl připraven rekombinantní protein pomocí exprese v bakteriálním systému. Po imunizaci králíka tímto rekombinantní proteinem jsem získala protilátky, které poměrně citlivě reagovaly na zhruba 188kDa velký protein ve slinných žlázách, střevě a ováriích, zatímco Monolaris1 nebyl v tkáních ani slinách detekován. Pravděpodobně se v klíštěti vyskytuje jen ve velmi malém množství.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ascenzi P, Bocedi A, Bolognesi M, Spallarossa A, Coletta M, De Cristofaro R, Menegatti E (2003) The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Current Protein & Peptide Science* 4: 231-251.
- Ascenzi P, Coletta M, Amiconi G, de Cristofaro R, Bolognesi M, Guarneri M, Menegatti E (1988) Binding of the bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) to human alpha- beta- and gamma-thrombin; a kinetic and thermodynamic study. *Biochim Biophys Acta* 956: 156-161.
- Bode W, Huber R (2000) Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477: 241-252.
- Bode W, Mayr I, Baumann U, Huber R, Stone SR, Hofsteenge J (1989) The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO Journal* 8: 3467-3475.
- Bode W, Turk D, Karshikov A (2008) *Protein Science* 1: 426-471.
- Brandstetter H, Kühne A, Bode W, Huber R, von de Saal W, Wirthensohn K, Engh RA (1996) X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa: implications for drug design and substrate recognition. *Journal of Biological Chemistry* 271: 29988-29992.
- Broze JGJ (1995) Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annual Review of Medicine* 46: 103-112.
- Broze JGJ, Girard TJ, Novotny WF (1990) Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. *Biochemistry* 29: 7539-7546.
- Cermanová T (2009) Expres rekombinantního proteinu Kunitzova typu, potenciálního toxinu ze slinných žláz klišťe *Ixodes ricinus*. *Mgr. Thesis, University of South Bohemia*.
- Corral-Rodríguez MÁ, Macedo-Ribeiro S, Pereira PJB (2009) Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 579-595.
- Ferenčík M, Rovenský J, Mařha V. *Ilustrovaný imunologický slovník*. Praha: Galén, 2004. 88 s. ISBN 80-7262-243-9. s. 131; 254; 287-288.
- Ferguson JJ, Zaqa M (1999) Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists: current concepts and future directions. *Drugs* 58: 965-982.
- Francischetti IM, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM (2002) Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood* 99: 3602-3612.

- Francischetti IMB, Sa-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JMC (2009) The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience* 14: 2051-2088.
- Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, Likert KM, Brown SG, Miletich JP, Broze JGJ (1989) Functional significance of the Kunitz-type inhibitory domains of lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature* 338: 518-520.
- Grütter MG, Priestle JP, Rahuel J, Grossenbacher H, Bode W, Hofsteenge J, Stone SR (1990) Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition. *EMBO Journal* 9: 2361-2365.
- Hajnicka V, Kocakova P, Slavikova M, Slovak M, Gasperik J, Fuchsberger N, Nutall PA (2001) Anti-Interleukin-8-activity of tick salivary gland extracts. *Parasite Immunology* 23: 483-489.
- Hartley BS (1970) Homologies in serine proteinases. *Phil. Trans. R. Soc. B* 257: 77-87.
- Hugli TE, Muller-Eberhard HJ (1978) Anaphylatoxins: C3a and C5a. *Advances in Immunology* 26: 1-53.
- Chmelař J (2005) Identifikace imunomodulačních molekul ze slin klíštěte *Ixodes ricinus*. *Mgr. Thesis, University of South Bohemia*.
- Chmelař J, Anderson JM, Jianbing M, Ryan CJ, Valenzuela JG, Kopecký J (2008) Insight into the sialome of the castor bean tick, *Ixodes ricinus*. *BMC Genomics* 9: 233
- James MNG (1976) Relationship between the structures and activities of some microbial serine proteases. II. Comparison of the tertiary structures of microbial and pancreatic serine protease. *Proteolysis and Physiological Regulations* (vydavatelé: Ribbons DW, Brew K). Academic Press, New York, s. 125-142.
- Joiner KA (1988) Complement evasion by bacteria and parasites. *Annual Review of Microbiology* 42: 201-230.
- Jutel M, Watanabe T, Klunker S, Akdis M, Thomet OA, Malolepszy J, Zak-Nejmark T, Koga R, Kobayashi T, Blaser K, Akdis CA (2001) Histamine regulates T-cell and antibody responses by differential expression of H1 and H2 receptors. *Nature* 413: 420-425.
- Kamata K, Kawamoto H, Honma T, Iwama T, Kim SH (1998) Structural basis for chemici inhibition of human blood coagulation factor Xa. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 95: 6630-6635.
- Laskowski MJ, Kato I (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry* 49: 593-626.
- Macedo-Ribeiro S, Almeida C, Calisto BM, Friedrich T, Mentele R, Stürzebecher J, Fuentes-Prior P, Pereira P (2008) Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS ONE* 3: e1624.

- Manithody C, Yang L, Rezaie AR (2002) Role of basic residues of the autolysis loop in the catalytic function of factor Xa. *Biochemistry* 41: 6780-6788.
- Mans BJ, Louw AI, Neitz AWH (2002) Evolution of hematophagy in ticks: common origins for blood coagulation and platelet aggregation inhibitors from soft ticks of the genus *Ornithodoros*. *Molecular Biology and Evolution* 19: 1695-1705.
- Monteiro RQ, Rezaie AR, Ribeiro JM, Francischetti IM (2005) Ixolaris: a factor Xa heparin-binding exosite inhibitor. *Biochemical Journal* 387: 871-877.
- Padmanabhan K, Padmanabhan KP, Tulinsky A, Park CH, Bode W, Huber R, Blankenship DT, Cardin AD, Kisiel W (1993) Structure of human des (1-45) factor Xa at 2.2 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* 232: 947-966.
- Paesen GC, Adams PL, Harlos K, Nuttall PA, Stuart DI (1999) Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning and three dimensional structure. *Molecular Cell* 3: 661-671.
- Perona JJ, Craik CS (1997) Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *Journal of Biological Chemistry* 272: 29987-29990.
- Pintigny D, Dachary-Prigent J (1992) Aprotinin can inhibit the proteolytic activity of thrombin. A fluorescence and an enzymatic study. *European Journal of Biochemistry* 207: 89-95.
- Ponte P, DeWhitt PG, Schilling J, Miller J, Hsu D, Greenberg B, Davis K, Wallace W, Lieberburg I, Fuller F a kol. (1988) A new A4 amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors. *Nature* 331: 525-527.
- Read RJ, James MNG. *Proteinase inhibitors* (vydavateľ: Barrett AJ, Salvesen G). Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V., 1986. 661s. ISBN 0-444-80763-2. Kapitola 7: Introduction to the protein inhibitors: X-ray crystallography, s. 304-305.
- Ribeiro JMC (1987) *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Experimental Parasitology* 64: 347-353.
- Ribeiro JMC, Francischetti IMB (2003) Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annual Review of Entomology* 48:73-88
- Ribeiro JMC, Makoul G, Levine J, Robinson D, Spielman A (1985) Antihemostatic, anti-inflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of the tick, *Ixodes dammini*. *Journal of Experimental Medicine* 161: 332-344.
- Ribeiro JMC, Makoul GT, Robinson DR (1988) *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. *Journal of Parasitology* 74: 1068-1069.
- Ribeiro JMC, Weis JJ, Telford SR (1990) Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Experimental Parasitology* 70: 382-388.

- Richardson JL, Kroger B, Hoeffken W, Sadler JE, Pereira P, Huber R, Bode W, Fuentes-Prior P (2000) Crystal structure of the human alpha-thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor. *EMBO Journal* 19: 5650-5660.
- Richardson JS (1981) The anatomy and taxonomy of protein structure. *Advances in Protein Chemistry* 34: 167-339.
- Rydel TJ, Ravichandran KG, Tulinsky A, Bode W, Huber R, Roitsch C, Fenton 2nd JW (1990) The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha-thrombin. *Science* 249: 277-280.
- Rydel TJ, Tulinsky A, Bode W, Huber R (1991) Refined structure of the hirudin-thrombin complex. *Journal of Molecular Biology* 221: 583-601.
- Sangamnatdej S, Paesen GC, Slovak M, Nutall PA (2002) A high affinity serotonin- and histamine-binding lipocalin from tick saliva. *Insect Molecular Biology* 11: 79-86.
- Sauer JR, McSwain JL, Bowman AS, Essenberg RC (1995) Ticksalivary gland physiology. *Annual Review of Entomology* 40: 245-267.
- Stubbs MT, Huber R, Bode W (1995) Crystal structures of factor Xa specific inhibitors in complex with trypsin: structural grounds for inhibition of factor Xa and selectivity against thrombin. *FEBS Letters* 375: 103-107.
- Valenzuela JG (2004) Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. *Parasitology* 129: S83-S94.
- Valenzuela JG, Francischetti IMB, Pham VM, Garfield MK, Mather TN, Ribeiro JMC (2002) Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Experimental Biology* 205: 2843-2864.
- Valenzuela JG, Charlab R, Mather TN, Ribeiro JM (2000) Purification, cloning and expression of a novel salivary anti-complement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry* 275: 18717-18723.
- Volf V, Horák P, a kol. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton, 2007. 318 s. ISBN 978-80-7387-008-9. Kapitola 4.3.1: Podřád *Metastigmata* (*Ixodida*), s. 260- 263.
- Votava M a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-6-5. Kapitola 4.5.1.2: *Ixodidae* (klíšťatovití), s.441-442.
- Wang X, Coons LB, Taylor DB, Stevens SEJ, Gartner TK (1996) Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. *Journal of Biological Chemistry* 271: 17785-17790.
- Wikel SK, Ramachandra RN, Bergman DK (1994) Tick-induced modulation of the host immune response. *International Journal for Parasitology* 24(I) : 59-66.