

**Přírodovědecká fakulta**  
**Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích**



**Izolace a analýza genu Salp25D, homologu glutathion-  
peroxidázy, klíštěte obecného *Ixodes ricinus*.**

Bakalářská práce

Lucie Jedličková

2009

vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD.

Maryna Golovchenko, MSc.

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

## **Bakalářská práce**

Jedličková L., 2009: Izolace a analýza genu Salp25D, homologu glutathionperoxidázy, klíštěte obecného *Ixodes ricinus*. [Isolation and analysis of Salp25D gene, a homologue of glutathionperoxidase, of the hard tick *Ixodes ricinus*.]

Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic., BSc. Thesis in Czech, 39 pp.

## **Annotation**

Ticks are of vast medical and veterinary public health importance due to direct damage caused by feeding and their roles in transmitting well known and emerging infectious agents. Aerobic reactions induced by tick blood feeding lead to the accumulation of reactive oxygen species, which can be toxic to the cells. Biotic and abiotic stresses can trigger a dramatic increase in the generation of reactive oxygen species such as superoxide radicals, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide in the intercellular environment. Aerobic organisms have developed several non-enzymatic and enzymatic systems to neutralize these compounds. Glutathion peroxidase catalyzes the reduction  $H_2O_2$  or organic hydroperoxides to water using reduced glutathion. The tick glutathion peroxidase homologue, named Salp25D, is expressed in the salivary glands, it does not have a secretory signal sequence, but is present in tick saliva since the tick-immune host develops antibodies against this protein. This protein, previously described in *Ixodes scapularis* and now in *I. ricinus* tick, was confirmed to have detoxification function in the tick saliva and in host tissue, and, was proved to play a critical role (in the mammalian host) for acquisition of *Borrelia burgdorferi* by the vector. Salp25D detoxified reactive oxygen species at the vector-pathogen-host interface, catalyzing the reduction of hydrogen peroxide in the presence of reduced glutathion and glutathion reductase, thereby providing a survival advantage to *B. burgdorferi* at the tick feeding site. These data demonstrate that pathogens can exploit arthropod molecules to defuse mammalian responses in order to successfully enter the vector.

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, Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

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

V Českých Budějovicích dne: 28. 4. 2009

.....

Lucie Jedličková

Ráda bych poděkovala svým školitelkám Natalii Rudenko a Maryně Golovchenko za odbornou pomoc a vedení při vypracování této práce a možnosti podílet se na zpracování zajímavého tématu. Dále děkuji Liboru Grubhofferovi za možnost pracovat v laboratoři Molekulární biologie vektorů a parazitů. Mé poděkování patří Tereze Chrudimské a Janě Horáčkové za poskytnutí cenných rad při vlastní práci v laboratoři. Děkuji svým rodičům za velkou trpělivost a podporu při mém studiu.

Děkuji.

# Obsah

<b>1.</b>	<b><i>IXODES RICINUS</i> (KLÍŠTĚ OBECNĚ)</b> .....	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>SLINNÉ ŽLÁZY A SLINY</b> .....	<b>7</b>
<b>3.</b>	<b>IMUNITNÍ SYSTÉM KLÍŠTĚTE</b> .....	<b>10</b>
3.1.	BUNĚČNÁ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ .....	11
3.2.	HUMORÁLNÍ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ .....	11
3.3.	OXIDATIVNÍ STRES .....	13
3.3.1.	<i>Glutathionperoxidáza (GPx)</i> .....	13
<b>4.</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>17</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIÁLY A METODY</b> .....	<b>18</b>
5.1.	MATERIÁLY .....	18
5.2.	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	18
5.3.	METODY .....	21
5.3.1.	<i>Izolace RNA ze slinných žláz klíštěte</i> .....	21
5.3.2.	<i>Syntéza ss cDNA (jednovláknové cDNA)</i> .....	21
5.3.3.	<i>PCR („Polymerase Chain Reaction“)</i> .....	21
5.3.4.	<i>Purifikace PCR produktu</i> .....	22
5.3.5.	<i>Klonování PCR produktu do vektoru pCR<sup>®</sup> 4-TOPO</i> .....	22
5.3.6.	<i>Transformace v systému One Shot TOP10 E. coli Competent Cells</i> .....	22
5.3.7.	<i>Izolace plazmidu</i> .....	23
5.3.8.	<i>Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu</i> .....	23
5.3.9.	<i>Klonování PCR produktu do expresního vektoru Champion<sup>™</sup> pET 100/D-TOPO<sup>®</sup></i> .....	23
5.3.10.	<i>Transformace v systému One Shot TOP10 E. coli Competent Cells</i> .....	23
5.3.11.	<i>Transformace v systému BL21 Star<sup>™</sup> (DE3) One Shot<sup>®</sup> Cells</i> .....	24
5.3.12.	<i>Expres rekombinantního proteinu (pilotní experiment)</i> .....	24
5.3.13.	<i>Kontrola exprese rekombinantního proteinu: SDS-PAGE</i> .....	24
5.3.14.	<i>Western Blot a detekce rekombinantního proteinu</i> .....	24
5.3.15.	<i>Nativní purifikace rekombinantního proteinu</i> .....	25
5.3.16.	<i>Izolace genomové DNA</i> .....	25
<b>6.</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>25</b>
6.1.	<i>Izolace RNA a syntéza jednovláknové cDNA</i> .....	25
6.2.	<i>PCR</i> .....	26
6.3.	<i>Expres genu pro SALP25D v různých tkáních I. ricinus</i> .....	27
6.4.	<i>Expres genu pro SALP25D v různých vývojových stádiích klíštěte I. ricinus</i> .....	28
6.5.	<i>Expres rekombinantního proteinu</i> .....	29
6.5.1.	<i>Nativní purifikace rekombinantního proteinu</i> .....	30
6.6.	<i>Hmotnostní spektrometrická analýza</i> .....	30
6.7.	<i>Genomová struktura genu kódujícího SALP25D</i> .....	31
6.8.	<i>Funkční aktivita rekombinantního proteinu</i> .....	31
<b>7.</b>	<b>DISKUSE</b> .....	<b>32</b>
<b>8.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>35</b>
<b>9.</b>	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>36</b>
<b>10.</b>	<b>POUŽITÉ ZKRATKY</b> .....	<b>39</b>

## 1. *Ixodes ricinus* (klíšťe obecné)

Klíšťata patří do kmene *Arthropoda*, podkmene *Chelicerata*, třídy *Arachnida*, podtřídy *Acari*, do řádu *Parasitiformes* a podřádu *Ixodida*. Dělí se na dva hlavní rody – *Ixodidae* (tzv. klíšťata - mající tvrdý štít na zádech tvořený chitinem) a *Argasidae* (tzv. klíšťáci - kteří štít nemají) (1).



Obr. 1 *Ixodes ricinus* (2)

*Ixodes ricinus* (viz. Obr. 1), klíšťe obecné, je hojně rozšířeno po České republice a celé Evropě. Je přenašečem původců několika závažných nemocí člověka, jako například virová klíšťová encefalitida nebo Lymeská borelióza a mezi přenášené mikroorganismy se řadí následující skupiny:

- **Viry:**

Klíšťová encefalitida TBE (*Flaviviridae: Flavivirus*), 3 subtypy (evropský, sibiřský, dálněvýchodní)

Virus Eyach (*Reoviridae: Coltivirus*)

Virus Uukuniemi (*Brunyviridae: Phlebovirus*)

Virus skotské ovčí encefalitidy (*Flaviviridae: Flavivirus*)

- **Rickettsiae:**

*Coxiella burnetti* (původce Q-horečky)

*Rickettsia slovaca*

*Rickettsia conori* (původce středozevní skvrnitě horečky)

*Rochalimaea quintana*

*Ehrlichia (Cytoectes) phagocytophila* (původce anaplazmózy)

- **Bacteria:**

*Francisella tularensis* (původce tularemie)

*Listeria monocytogenes*

*Staphylococcus aureus* (původci klíštěcí pyraemia u ovcí)

*Borrelia burgdorferi* s.l. (původce Lymské boreliózy)

- **Apicomplexa:**

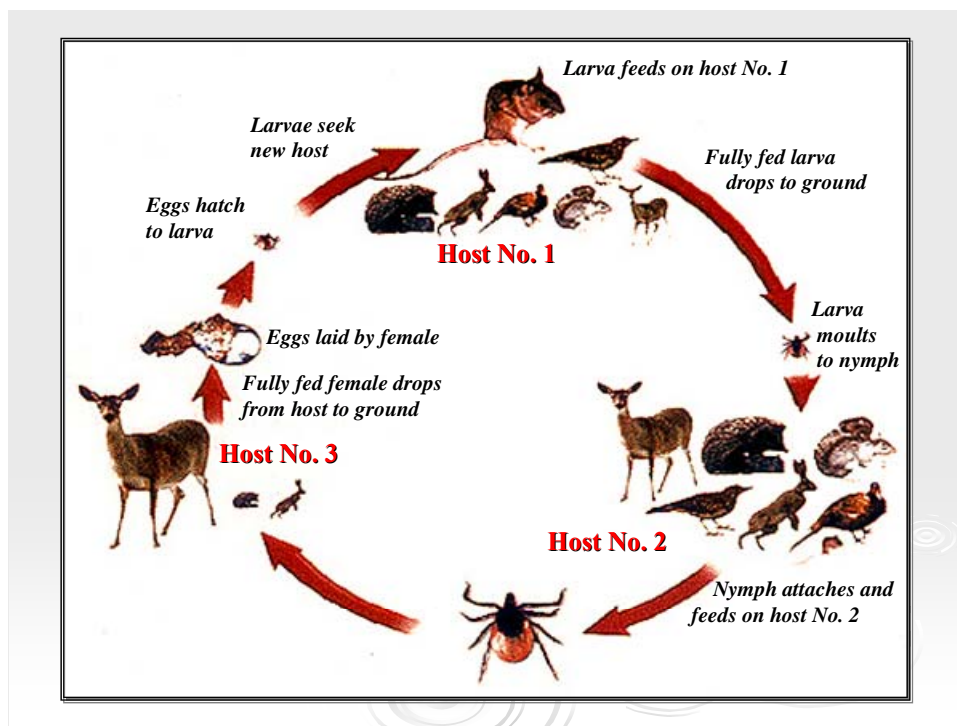
*Babesia divergens* (původce babesiózy)

*B. canis*

*B. ovis*

Klíště obecné *Ixodes ricinus* je rozšířeno do nadmořské výšky 2000 metrů a preferuje oblasti s vysokou vlhkostí a mírnými teplotami. Biotopem výskytu jsou louky, pastviny, listnaté a jehličnaté lesy (1). Parazituje na savcích, ptácích a plazech (3), při kontaktu s hostitelem dojde k přísátí pomocí uzpůsobeného ústního ústrojí. Ústní ústrojí se skládá z hypostomu, chelicer a pedipalp. Hypostom je nástroj, který je přizpůsobený k nasávání krve, je vybaven zpětnými háčky, které ztěžují odstranění parazita (4). Slinné žlázy produkují celou řadu fyziologicky aktivních molekul, které mají zásadní význam pro připojení k hostiteli nebo pro přenos patogenů a které ovlivňují hostitelskou odpověď – např. koagulace a fibrinolýza, imunita, zánětlivé procesy a angiogeneze (5).

Klíště obecné při hledání hostitele využívá Hallerův orgán – velmi citlivý smyslový receptor, který je umístěn na prvním páru předních nohou a reaguje na vydechovaný CO<sub>2</sub>, teplotu, různé otřesy nebo pach (1).



Obr. 2 Vývojový cyklus klíštěte obecného (6)

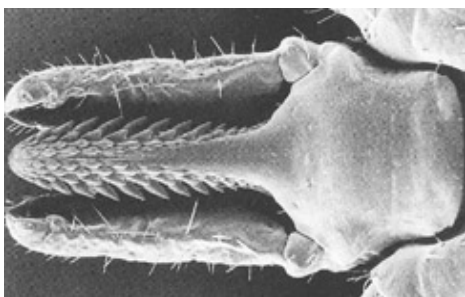
Ve vývojovém cyklu *I. ricinus* (viz. Obr. 2) jsou zahrnuta tři stádia. Délka vývojového cyklu trvá přibližně 3 roky. Nejdříve samice naklade několik tisíc vajíček, ze kterých se vylíhnou larvy se třemi páry nohou, které parazitují na malých savcích, ptácích a plazech. Po nasátí se larvy přemění v nymfy se čtyřmi páry nohou, které už stejně jako dospělci cizopasí na obratlovcích, savcích větších rozměrů, a po dalším nasátí se z nich stávají dospělci (imaga) (1).

## 2. Slinné žlázy a sliny

Slinné žlázy klíštěte syntetizují a vylučují biologicky aktivní molekuly, které se účastní procesu sání krve. Při sání klíštěť zahušťuje složky z krve hostitele tím, že pomocí slin vrací přebytečnou vodu a ionty zpět do těla hostitele. Pomocí slinných žláz se vrací zhruba 30-50% tekutin přijatých potravou. Při přenosu slin klíštěte do rány hostitele dochází současně k přenosu patogenů (viry, bakterie a protozoa), kteří jsou přítomni ve slinách klíštěte. Toto je nejběžnější způsob přenosu patogenů z klíšťat na hostitele (7).

Slinné žlázy klíštěte syntetizují a vylučují cement, kterým pevně ukotví jeho hypostom (viz Obr. 3 a Obr. 4) v hostiteli. Po opuštění hostitele slinné žlázy klíštěte vyluču-

čují hygroskopický roztok, který pohlcuje vodu ze vzduchu a chrání klíště před dehydratací (7).



**Obr. 3 hypostom (1)**



**Obr. 4 hypostom (1)**

Klíště při získávání potravy musí porušit kůži hostitele. Kousnutí klíštěte spouští u hostitele několik obranných reakcí: srážení krve, nahromadění krevních destiček, cévní kontrakci, zvětšení vaskulární permeability a chemotaxi leukocytů do poraněného místa. Farmakologické složky ve slinách klíštěte usnadňují krmení tím, že působí proti těmto reakcím nebo modifikují hostitelovu zánětlivou odpověď a hemostatický proces. Při krmení slinné žlázy zvětší svůj objem a stávají se aktivními. Zvětšení a aktivace slinných žláz je podporována tvorbou proteinů indukovaných krmením. Během sání dochází ke změnám spektra proteinů vylučovaných klíštětem do rány. Rozdíly v tvorbě proteinů nejsou jenom mezi rozdílnými třídami klíšťat, ale také mezi jedinci stejné třídy nebo jednotlivými stupni vývoje. Rovněž aktivita imunoaktivních faktorů pocházejících z klíšťat se může lišit v závislosti na hostitelském druhu, na kterém klíště parazituje (7).

Některé dříve popsané komponenty obsažené ve slinách klíštěte jsou uvedeny v tabulce 1 (5).

<b>Název</b>	<b>Funkce</b>	<b>Druh</b>
ixolaris	inhibitor faktoru X	antikoagulant
americanin	inhibitor thrombinu	antikoagulant
Salp 14	inhibitor faktoru X	antikoagulant
ixin	inhibitor thrombinu	antikoagulant
apyráza	hydrolyzuje ATP na ADP	inhibitor hromadění krevních destiček



variabilin	váže integriny a brání bu- něčné adhezi	inhibitor hromadění krev- ních destiček
PGA <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , PG- F <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub>	vasodilatace, inhibitory srážení krevních destiček, potlačují proliferaci, atd.	prostaglandiny
ISAC	regulátor aktivace komple- mentu, Inhibice alternativní cesty komplementu	inhibitor komplementu
Sialostain L	inhibitor T-buněk	imunosupresor
Salp 20	inhibitor komplementu	imunosupresor
IRAC 1 a 2	inhibitor komplementu	imunosupresor
IRIS	imunosuprese a imunomo- dulace	imunomodulátor
Salp 15	inhibice produkce IL-2	imunomodulátor
IL-2BP	inhibuje T-buňky IL-2 vaz- bou	vazebný protein
HBP	potlačení zánětu vaz- bou/eliminací histaminu nebo serotoninu	vazebný protein
IGBP	váže IgG, hraje roli ve vy- lučování IgG skrz slinné žlázy klišťete	vazebný protein
Salp 25D	antioxidant	homolog glutathionperoxi- dázy

Tabulka 1

### **3. Imunitní systém klíštěte**

Bezobratlí se brání před infekcí svým přirozeným imunitním systémem, který neobsahuje protilátky ani paměťové buňky. První stupeň obrany tvoří jejich kutikula, která slouží jako chemická a mechanická bariéra proti poranění či pronikajícím parazitům. Teprve po proniknutí útočnicka přes tyto bariéry se objevují buněčné a humorální reakce. Tyto imunoreakce jsou nespecifickými obrannými reakcemi. Buněčnou část odpovědi představují následující děje: fagocytóza, nodulace a enkapsulace. Při humorální obranné reakci se uplatňují molekulové faktory enkapsulace, hemaglutinace a antimikrobiální proteiny (8).

V současnosti je známo, že u bezobratlých se vyskytuje pouze přirozený imunitní systém - neadaptivní. Tento přirozený imunitní systém je fylogeneticky starší než získaná imunita, která se vyskytuje u obratlovců spolu s přirozenou imunitou. Mimo to bylo zjištěno, že získaná imunita představuje první obrannou linii u vyšších živočichů a také hraje rozhodující roli při přípravě adaptivní imunitní odpovědi. U různých skupin bezobratlých se vyskytují rozpoznávací molekuly, známé jako „Pattern Recognition Receptors“, které představují hlavní linii obrany. Funkčně jsou zaměřeny na rozpoznávání molekulárních struktur na povrchu patogenů. Skládají se z mnoha komponent, které zahrnují kombinace sacharidů, lipidů, proteinů a nukleových kyselin, které jsou unikátní a nezbytné pro mikrobiální přežití. Zahrnují molekuly jako jsou peptidoglykany (PGN), lipopolysacharidy (LPS) a  $\beta$ -1,3-glukany, rovněž glykosyl fosfatidyl inositol (GPI), které kupříkladu napomáhají uchycení protozoárních parazitů (9, 10, 11, 12).

Klíšťata jsou hned po komárech vektory druhého největšího počtu patogenů, které ohrožují lidský a živočišný život hostitelů, člověka a zvířat. Při procesu sání, mohou předávat široký rozsah organismů. Patogenní organizmy přenášené klíšťaty zahrnují viry, rickettsie, bakterie, helminty, protozoa i houby a přesahují počtem patogenních agens u ostatních arthropod. Přestože klíšťata jsou přenašeči patogenů, znalosti o jejich získaném imunitním systému a faktorech, které v něm hrají roli, jsou pouze omezené a zkoumání jejich přirozeného imunitního systému je na samém začátku. Porozumění imunitě klíštěte je podmínkou i k pochopení interakcí patogenů s hostitelem, které usnadňují nebo limitují přenos původců nemocí. Fylogenetické studie klíštěcích proteinů navíc usnadňují pochopit lépe evoluční adaptace krevsajících členovců a výjimečné strategie používané klíštětem (13).

### **3.1. Buněčná imunitní odpověď**

Klíčovou roli v buněčném imunitním systému hrají hemocyty, které se objevují ve zvýšeném množství s patogenní infekcí a zajišťující tři základní mechanizmy:

1. *fagocytózu* (proces, při kterém dojde k pohlcení mikroorganismů fagocytujícími buňkami),
2. *nodulaci* (proces, při kterém mikroorganismy jsou zachyceny granulovanými buňkami, ty jsou dále obklopeny dalšími hemocyty)
3. *enkapsulaci* (zahrnuje uzavření nodulů nebo mikroorganismů větších než jsou hemocyty několika vrstvami buněk a tím je izoluje z aktivní cirkulace) (8).

### **3.2. Humorální imunitní odpověď**

Při humorální buněčné odpovědi se uplatňují tři hlavní děje:

1. *humorální enkapsulace* (zahrnuje uzavření mikroorganismu do melanotického pouzdra) (8).
2. *hemaglutinace* (nastává, když specifický vazebný protein nebo glykoproteiny lektiny na sebe naváží pronikající mikroorganismus a vyvolají agregaci, opsonizaci a tím stimuluje fagocytózu). Lektiny jsou proteiny schopné rozpoznat sacharidy a zajišťují funkci molekul „pattern-recognition“ v obranných reakcích bezobratlých. Hrají také důležitou roli v rozpoznání patogenních mikroorganismů, poškození vlastních buněk a zprostředkovávají biologické aktivity buněk. Mnoho lektinů, které byly izolovány u arthropod, pocházejí z hemolymfy, extracelulární cirkulující tekutiny, která vyplňuje hemocoel (8).
3. *antimikrobiální proteiny* (syntetizovány a uvolňovány za účelem přímého napadnutí a zničení konkrétního vnikajícího mikroorganismu). Zahrnují lysozomy, cystatiny, defensiny, peptidy s vysokým obsahem prolinu, glycinu a další. Proteiny bohaté na prolin a glycin působí přednostně proti gramnegativním bakteriím a defensiny působí proti grampozitivním bakteriím. Mechanismus působení antimikrobiálních peptidů není zatím dosud objasněn. Zdá se však, že zahrnují dva hlavní děje jejich činnosti: peptidolipidové interakce a receptorem zprostředkovaný rozpoznávací proces (8).

*Lysozomy* - jsou obvykle obsaženy v hemolymfě hmyzu a při infekci se jejich tvorba zvyšuje. Působí jako hydrolytické enzymy, které lyzují bakterie štěpením  $\beta$ -1,4 glykosidických vazeb v buněčných stěnách bakterií. Klíšťe uchovává potravu ve střevě, kde dochází i k jejímu postupnému trávení podle potřeby. Proto ve střevě jsou velmi dobré podmínky k namnožení mikrobů přijatých potravou (8).

*Cystatiny* - jsou reverzní inhibitory cysteinových proteáz. Cystatiny se uplatňují při potlačování hostitelské imunitní odpovědi a poslední výzkumy naznačují, že hrají rovněž důležitou roli při humorální odpovědi proti patogenům u klíšťat (8).

*Hemoglobinové fragmenty* - Hemoglobin je nejenom důležitým přenašečem kyslíku, ale nedávno bylo zjištěno, že je také zdrojem bioaktivních peptidů. Tato zjištění naznačují, že klíšťata využívají hostitelské hemoglobinové fragmenty při mikrobiálním obranném mechanismu (8).

*Defensiny* - nejrozšířenější skupina antimikrobiálních peptidů, která je nejvíce zkoumána u klíšťat. Jedná se o cyklické antimikrobiální peptidy obsahující šest cysteinových zbytků (8). Počáteční působení defensinů představují elektrostatické síly s následující permeabilizací mikrobiálních membrán mikroorganismů a vstupu defensinů do cílové buňky. Ačkoli mikrobiální a hostitelské struktury mají mnoho společných rysů, antimikrobiální polypeptidy cíleně zasahují komponenty, které chybí v hostitelské buňce. Přednostní působení defensinů na mikroby, na rozdíl od působení na hostitelské buňky, je pravděpodobně dáno složením mikrobiální membrány, bohaté na aniontové formy fosfolipidů a postrádající cholesterol (13).

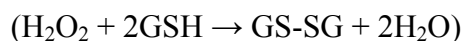
*Ostatní antimikrobiální peptidy* – zkoumání antimikrobiálních látek u klíšťat odhalilo celou škálu unikátních peptidů (např. mickroplusin, hebraein, ixodidin, ixosin) a zjistilo se, že pochopení antimikrobiální obrany je mnohem složitější, ale poskytuje více příležitostí pro vývoj nových a účinnějších antimikrobiálních látek. Antimikrobiální peptidy jsou efektorovými výkonnými molekulami imunitního systému členovců. Bez poznání mechanismů přirozené imunity klíšťat nelze pochopit, proč některé druhy (*I. ricinus*) jsou kompetentními přenašeči spirochét Lymské boreliózy (LB) a jiné druhy nikoliv (*D. variabilis*) (8).

### 3.3. Oxidativní stres

Při pozorování mechanismů uplatňujících se při detoxikaci toxinů se využívá fyziologických vlastností klíštěte. Hlavní mechanismy nepůsobí jen proti specifickým toxickým molekulám, ale také napomáhají udržovat fyziologickou rovnováhu (homeostázu) a zabraňují oxidativnímu poškození reaktivními kyslíkovými skupinami (ROS) (14). Aerobní reakce vedou k nahromadění reaktivních kyslíkových skupin, které mohou být pro buňky toxické. Biotické a abiotické stresy mohou vyvolat prudký nárůst tvorby reaktivních kyslíkových skupin, jako jsou superoxidové radikály, hydroxylové radikály a peroxid vodíku ve vnitrobuněčném prostředí. V této souvislosti si aerobní organizmy vyvinuly několik enzymatických a neenzymatických systémů k eliminaci těchto reaktivních skupin. Enzymatický systém obsahuje skupinu genových produktů, jakými jsou superoxidodismutázy, katalázy, askorbové peroxidázy a glutathionperoxidázy (15). Neenzymatický antioxidantní systém používá  $\alpha$ -tocopherol (vitamín E), kyselinu askorbovou (vitamín C) a další vhodné malé molekuly (14).

#### 3.3.1. Glutathionperoxidáza (GPx)

Glutathionperoxidáza je souhrnné označení pro rodinu čtřnásobných izoenzymů, které katalyzují redukci peroxidu vodíku nebo organického hydroperoxidu na vodu nebo odpovídající alkohol použitím redukovatelného glutathionu jako elektronového donoru (15).



Glutathionperoxidázy se vyskytují u živočichů, rostlin, hub a bakterií. Identifikovat společného předchůdce u různých glutathionperoxidázových skupin se nepodařilo. Aktivita některých izoenzymů glutathionperoxidázy závisí na selenu a selenocysteinu, které jsou kódovány v translačním procesu kodonem TGA (15).

V savčích tkáních jsou čtyři hlavní selen-dependentní GPx izoenzymy:

1. klasická GPx1, kterou můžeme najít v červených krvinkách, játrech, plicích a ledvinách
2. gastrointestinální GPx2, charakteristická pro buňky střevního traktu
3. plazmatická GPx3, která se nachází v různých orgánech, jako jsou ledviny, plíce, nadvarlata, placenta, semenné vajíčky, srdce a svaly

#### 4. fosfolipidová GPx4, která je široce distribuována v různých tkáních

Aktivní GPx1, 2 a 3 jsou homotetramery, zatímco funkčně aktivní GPx4 je monomer (15).

Glutathionperoxidázy mají rozdílné vnitrobuněčné umístění: GPx1 byla identifikována v cytosolu, jádře a mitochondriích; GPx2 se hromadí v cytosolu a v jádře; GPx3 je nalezen v cytosolu, zatímco GPx4 je přítomná v jádře, cytosolu, mitochondriích a váže se na membrány. Dva další isoenzymy, GPx5 a GPx6 identifikované u savců, jsou blízce příbuzné s GPx3 (15).

V nedávné době byla u savců popsána nová fosfolipid hydroperoxid glutathionperoxidáza (PHGPx), která obsahuje cystein místo selenocysteinu a u které byla zachována katalytická funkce. Tato nonselenocysteinová PHGPx, rovněž nazývaná NPGPx, odpovídá sedmé skupině GPx nalezené u savců. Exprese genu kódujícího NPGPx byla potvrzena v mnoha tkáních, včetně vyvíjející se prsní žlázy. Ukazuje se, že NPGPx hraje významnou roli v buňkách rakoviny prsu zmírněním oxidativního stresu způsobeného metabolismem polynenasycených mastných kyselin (15).

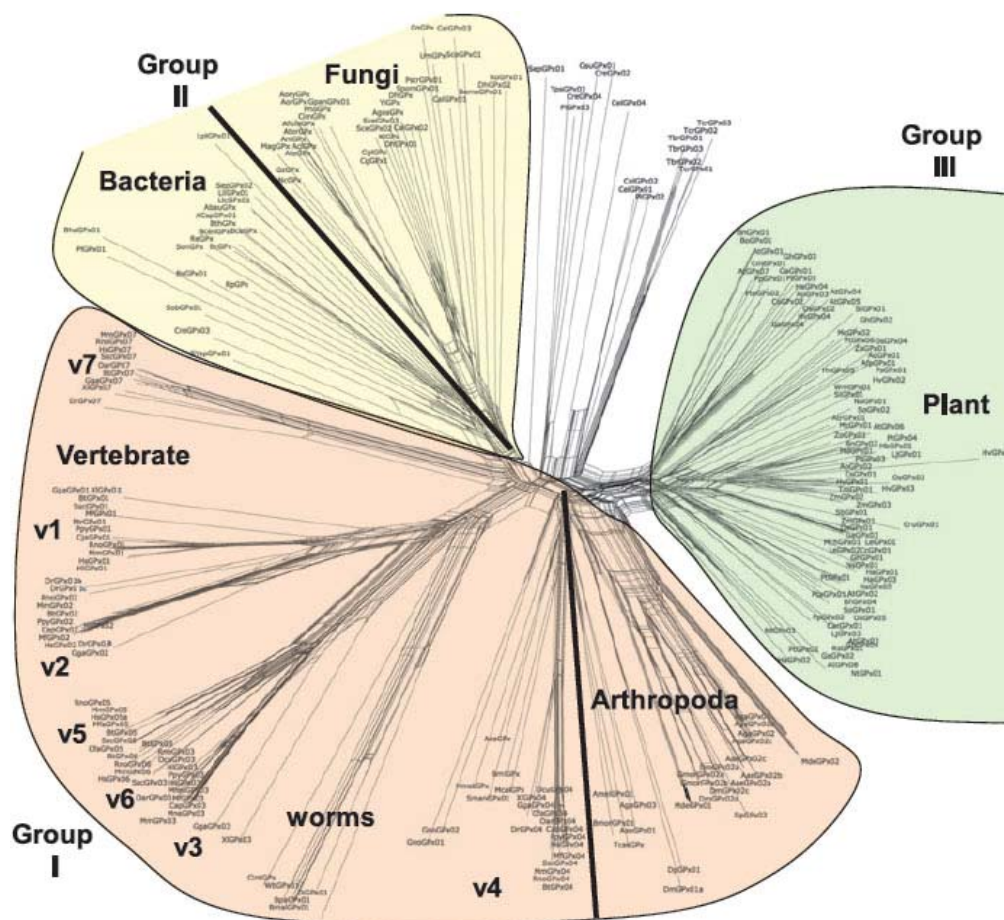
Geny kodující PHGPx enzymy byly identifikovány u mnoha organismů. PHGPx je unikátní ve své substrátové specifitě, protože může interagovat s lipofilními substráty jako jsou peroxidované fosfolipidy a cholesterol a redukovat je na hydroxylované sloučeniny (15).

Na molekulární úrovni jsou rostlinné GPx geny blízce příbuzné živočišným PHGPx a jejich odpovídající proteiny obsahují tři zachované cysteinové zbytky, které jsou nejspíš nezbytné pro enzymatické katalýzy (15).

Struktura a funkce živočišných, rostlinných a houbových GPx představuje významný přínos k pochopení funkce této třídy proteinů (15).

Genová rodina GPx má nejasný původ a nesleduje lineární evoluční historii. Je patrné, že rozdílné a nezávislé evoluční cesty ovlivnily její členy, a proto je složité ustanovit původ jednotlivých tříd. Nicméně je možné oddělit tři základní skupiny s možným polyfyletickým původem (viz Obr. 6). Skupina 1 odpovídá velké skupině všech GPx u mnohobuněčných organismů, zahrnuje sedm tříd popsaných u savců a také zasahuje do jiných skupin obratlovců a bezobratlých. Skupina 2 zahrnuje sekvence genů pro GPx u

hub, bakterií, cyanobakterií a řas, zatímco skupina 3 obsahuje GPx všech rostlin. Hlavní zástupci GPx u řas vznikli velmi brzy v historickém vývoji GPx genů. Je pravděpodobné, že tyto proteiny mají společný původ, ale za tak dlouhou dobu vývoje došlo k mnoha změnám, a tuto možnost je těžké prokázat (15).



Obr. 5 (15)

Bližší pohled na fylogenetické vztahy mezi geny obratlovců odhalil přítomnost čtyř hlavních strukturních skupin. Pravděpodobně došlo k duplikaci u GPx1 a GPx2 genů před oddělením ptáků a savců, ale až po objevení obojživelníků a ryb (15).

Předpokládá se, že genová rodina GPx se u savců vyvinula ze společného předka duplikacemi a následně náhodným přenosem v genomu. Všechny genové rodiny GPx obratlovců nejspíš vznikly duplikací ze společného původního genu příbuzného s PHGPx sekvencí, protože podobné sekvence jsou také přítomny u rostlin, členovců a hub. Tento protein (PHGPx) má základní zachované funkce v organismech různých linií, což by mohlo posílit model konvergentní evoluce genů GPx. Nicméně zachování funkce naznačuje, že prekurzor byl již přítomen v buňkách před rozdělením na obratlovce a bezobratlé. Jedna původní sekvence typická pro živočichy se vyvinula v geny

kódující GPx1 až GPx7. Druhá původní sekvence se vyvinula v moderní GPx4 a je běžně přítomna v různých organismech jako jsou živočichové, rostliny a houby. Nepřítomnost GPx1, 2, 3, 5, 6 a 7 u rostlin a hub je možná důsledkem ztráty těchto genů v průběhu evoluce (15).

Různé geny GPx, odpovídající proteinům s odlišnou vnitrobuněčnou lokalizací, byly vytvořeny duplikacemi z jednotlivých původních genů. Mechanismus duplikace genů pro GPx není dosud znám (15).

V klíštěti *I. scapularis* byl nalezen homolog glutathionperoxidázy nazývaný Salp25D, a exprimován ve slinných žlázách u nasátých i nenasátých nymf klíštěte. Rekombinant Salp25D katalyzoval redukci peroxidu vodíku v přítomnosti redukujícího se glutathionu a glutathionreduktázy. Právě tyto proteiny přítomné ve slinných žlázách klíštěte *I. scapularis* dokazují přítomnost silných antioxidantů ve slinách klíštěte (16).

Salp25D neobsahuje signální sekvenci, ale protože hostitelské sérum imunní nasání klíštěte obsahuje protilátky proti tomuto proteinu, je zřejmé, že Salp25D musí být přítomen ve slinách klíštěte. Salp25D je syntetizován v rozdílných typech buněk ve žlázách, které mají holokrinní nebo apokrinní sekreci a může být takto začleněn do slin, jednak buněčnou degradací nebo jejich netěsností. Lze předpokládat, že může být sekretován přes jinou, dosud neznámou cestu. Nyní se ví, že Salp25D je enzym, který má detoxikační funkci ve slinných žlázách klíštěte, i v hostitelské tkáni (16).

Molekulová velikost Salp25D je 24566 Da. Další známé antioxidantní proteiny mají vysokou úroveň homologie se Salp25D. Sekvence Salp25D je z 75% podobná s glutathionperoxidázou u *Drosophily melanogaster* a s hovězí glutathionperoxidázou a ze 70% podobná s antioxidantním proteinem lidských keratinocytů (16).

Reaktivní kyslíkové skupiny ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^{\cdot}$ ) vytvořené v průběhu metabolismu mohou způsobit poškození buněk. Glutathion, v těsné vazbě na glutathionperoxidázu a glutathionreduktázu hraje ústřední roli v antioxidantním tkáňové ochrany systému chránící tkáň. V průběhu lokálního poranění tkáně je reaktivní kyslík syntetizován v odumřelé tkáni leukocyty, které migrují do poraněného místa. Strategie jak se vyhnout hostitelské imunitě spočívá v minimalizaci formace reaktivních kyslíkových skupin v průběhu sání klíštětem. Takto působí Salp25D u procesu sání klíštěte (16).



## 4. Cíl práce

1. Literární studie k problematice antioxidantní ochrany u klíštěte.
2. Metodární PCR detekovat a izolovat gen kódující **homolog glutathionperoxidázy** (Salp25D) u klíštěte *Ixodes ricinus*.
3. Klonovat Salp25D *I. ricinus* do bakteriálního expresního vektoru.
4. Provést pilotní indukci a purifikaci rekombinantního Salp25D.
5. Interpretovat výsledky a získané zkušenosti se zvolenými metodami s konečným cílem funkční analýzy Salp25D *I. ricinus*.
6. Zjistit expresi genu pro Salp25D u vybraných tkání a jednotlivých vývojových stádií klíštěte *I. ricinus* v závislosti na příjmu potravy.

## 5. Materiály a metody

### 5.1. Materiály

Primer (Generi Biotech)	Použitá annealing teplota °C	Sekvence
Salp25D Forw	50°C	5'- CAC CAT GGG TCC CCT GAA CCT CGG C -3'
Salp25D Rev	50°C	5'- TCA GTC CAT GGT TGT TCG GAG GT -3'
Feritin Forw	52°C	5'- CCA AAC GGT TCG CTT TCC TC -3'
Ferritin Rev	52°C	5'- GAG CCC CAC TCG TCC TGG G -3'
M13-Forw	50°C	5'- GTA AAA CGA CGG CCA -3'
M13-Rev	50°C	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'
T7-Forw	50°C	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
T7-Rev	50°C	5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3'

Tabulka 2

### 5.2. Použité chemikálie

5x TBE pufr	54g TRIS, 27.5g kys. boritá, 20ml 0.5M EDTA(pH 8.0)/1L
Agaróza	SERVA
6x vzorkový pufr	0.25%(w/v) bromfenolová modř, 0.25%(w/v) xylen cyanol, 30%(w/v) glycerol, 1.2% SDS, 60mM fosforečnan sodný, 500x SYBR Green; pH 6.8
5x vzorkový pufr	20% Ficoll, 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mg/ml Orange

	G, 500 x SYBR Green
Expresní a klonovací plasmidy	Champion™ pET100/D-TOPO® Invitrogen pCR 4-TOPO® Invitrogen
S.O.C. médium	2% 'bacto-tryptone', 0,5% 'bacto-yeast' extrakt, 0,05% NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl <sub>2</sub> , 10mM MgSO <sub>4</sub> , 20mM glukóza; pH 7,0; sterilní
LB médium	10g bacto-tryptone, 5g bacto-yeast extrakt, 10g NaCl; pH 7,0; do 1 l ddH <sub>2</sub> O sterilní
LB agar	1,5% bacto-agar v LB médiu
Antibiotika	Ampicilin (zásobní roztok 50mg/ml H <sub>2</sub> O)
50x TAE pufr	242g Tris-baze, 100ml 500mM EDTA(pH 8.0), 57,1ml kyseliny octové do 1l ddH <sub>2</sub> O
30% AA	Acrylamide a bisacrylamide
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylenediamine
5x vzorkový pufr (SDS PAGE)	250mM Tris-HCl (pH 6,8), 500mM dithiotreitol, 10% SDS, 0,2% bromophenol blue, 50% glycerol
10% APS	Amonium persulfát
10% SDS	Laurylsulfát sodný
barvicí roztok	PageBlue™ (MBI Fermentas)
C1 pufr	1,5M TRIS-HCl; pH 8,8
C2 pufr	0,5M TRIS-HCl; pH 6,8
10x SDS elektroforézový pufr	10g SDS, 30,3g TRIS, 144,1g glycin

Blotovací pufr	20% methanol, 25mM TRIS-Base, 150mM glycin
Blokovací pufr	3% BSA v 1x TBS
protilátky	Ni-NTA conjugate; TBST; ředění 1:1000
1x TBS pufr	10mM TRIS-Cl; 150mM NaCl; pH 7,5
1x TBS-Tween	20mM TRIS-Cl; 500mM NaCl; 0,05% Tween; pH 7,5
10x TRIS-saline	9% NaCl v 1mM TRIS-Cl; pH 8
Barvicí roztok (HPR)	18mg 4chloro-1-naftol; 6ml methanolu; 24ml 1x TRIS-saline; 60 µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Ni-NTA agaróza	(Qiagen)
Lyzační pufr	50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300mM NaCl; 10mM imidazol; pH 8,0
Promývací pufr	50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300mM NaCl; 20mM imadizol; pH 8,0
Eluční pufr	50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300mM NaCl; 250mM imadizol; pH 8,0
Promývací roztok 1.	8 M močovina; 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,1 M Tris; pH 8,0
Promývací roztok 2.	4 M močovina; 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,1 M Tris; pH 6,0
Promývací roztok 3.	2 M močovina; 0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,1 M Tris; pH 5,3
Promývací roztok 4.	0,1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,1 M Tris; pH 4,0
Eluční pufr	0,5 M imidazol pH 8,0
IEF pufr	7 M urea; 2M thiomočovina; 4% CHAPS; 1% dithiothreitol, H <sub>2</sub> O
FeCl <sub>3</sub>	Chlorid železitý

Tabulka 3

## 5.3. Metody

### 5.3.1. Izolace RNA ze slinných žláz klíštěte

Pro izolaci RNA bylo použito 10 nasátých neinfikovaných klíšťat *Ixodes ricinus*. Z klíšťat byly vypitvány slinné žlázy, které byly homogenizovány ve sterilní zkumavce v Trizol Reagent v poměru 1 ml roztoku na 100 mg tkáně. RNA byla vyizolována podle návodu a vysrážena 96 % ethanolom. Pelet byl rozpuštěn ve 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O. Kvalita RNA byla zhodnocena na elektroforéze v 1,2% agarózovém gelu v 1x TBE. Koncentrace RNA byla změřena v tenkostěnných kyvetách (UVette® 220-1 600 nm; Eppendorf) na přístroji BioPhotometer při vlnové délce 260 nm.

### 5.3.2. Syntéza ss cDNA (jednovláknové cDNA)

Jednovláknová cDNA byla syntetizována z celkové RNA použitím kitu „Enhanced Avian HS RT-PCR kit“ (Sigma), podle přiloženého návodu. Koncentrace cDNA byla změřena na přístroji BioPhotometer při vlnové délce 260 nm.

### 5.3.3. PCR („Polymerase Chain Reaction“)

Jednovláknová ss cDNA byla naředěna ddH<sub>2</sub>O do hodnoty 200  $\mu$ g/ml a použita jako templát pro PCR reakci. Pro amplifikaci specifického úseku byly použity genspecifické primery pro Salp25D a negativní kontrola pro ověření možné kontaminace. Reakce proběhla v 0,2 ml zkumavce a přístroji Mastercycler (Eppendorf).

Reakční směs :

2x PCR Master mix (Promega) .....	10 $\mu$ l
1mM primer Salp25D ford .....	1 $\mu$ l
1mM primer Salp25D rev.....	1 $\mu$ l
Sterilní H <sub>2</sub> O .....	7 $\mu$ l
cDNA templát (200 $\mu$ g/ml) .....	1 $\mu$ l

Program PCR :

1. 95°C..... 5 min – denaturace DNA
2. 95°C..... 30 s – denaturace DNA

3. 50°C..... 30 s – nasedání primerů

4. 72°C..... 1 min – syntéza

Kroky 2 – 4 se 35 x opakovaly.

5. 72°C..... 20 min – final extension – nezbytný krok před zaklonováním do vektoru

6. Konečná teplota ponechána na 4°C.

Výsledek reakce byl ověřen elektroforézou v 1% agarózovém gelu / 1x TAE pufru. Do 20µl reakční směsi byly přidány 4µl 5x ředěného vzorkového pufru, který obsahoval SYBR Green. Doba trvání elektroforézy byla přibližně 30 minut při 110 V. Výsledek byl zhodnocen pod UV světlem a fotograficky zaznamenán.

#### **5.3.4. Purifikace PCR produktu**

Izolace PCR produktu z gelu byla provedena pomocí kitu „QIAquick®Gel Extraction kit“ (Quiagen) podle přiloženého návodu. DNA byla eluována z kolony 30 µl ddH<sub>2</sub>O.

#### **5.3.5. Klonování PCR produktu do vektoru pCR® 4-TOPO**

Purifikovaný PCR produkt byl ligován do vektoru pCR® 4-TOPO® Vector (In-vitrogen), podle návodu. Reakční směs (4 µl PCR produktu, 1 µl Salt solution, 1 µl vektoru) byla jemně promíchána a inkubována 25 minut při pokojové teplotě.

#### **5.3.6. Transformace v systému One Shot TOP10 *E. coli* Competent Cells**

Kompetentní buňky One Shot TOP10 *E. coli* byly pozvolna rozmrazeny na ledu. K buňkám byl přidán rekombinantní plazmid, směs byla jemně promíchána a inkubována na ledu 30 minut. Poté byly buňky vystaveny teplotnímu šoku na 42°C (30 sekund) a dále byly inkubovány se S.O.C. médiem při 37°C 1 hodinu na třepačce. Transformační reakce byla rozetřena na Petriho misky s LB agar/ampicilinem (50 µg/ml) a inkubované při 37°C přes noc. Druhý den byly jednotlivé kolonie přeočkovány do LB média s am-

picilinem (50 µg/ml) a kultivovány na třepačce při 37°C přes noc. Buňky byly stočeny (5 000x g, 4 °C, 15min) a z peletu byla vyizolována plazmidová DNA.

### **5.3.7. Izolace plazmidu**

Plazmidová DNA byla izolována za použití kitu QIAprep Spin Miniprep Kit (podle návodu). Plazmidová DNA byla eluována z kolony 30 µl ddH<sub>2</sub>O.

### **5.3.8. Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu**

K ověření přítomnosti inzertu v plazmidu byla použita metoda PCR (popsána dříve v kapitole 5.3.3), kde byly použity jak gen-specifické primery pro Salp25D tak i vektor-specifické primery M13 forward a M13 reverse. Výsledek byl vyhodnocen na 1% agarózovém gelu pod UV světlem. Plazmidy, u kterých byla přítomnost inzertu potvrzena, byly sekvenovány na ABI 3130 sekvenátoru podle protokolu sekvenační laboratoře.

### **5.3.9. Klonování PCR produktu do expresního vektoru Champion<sup>TM</sup> pET 100/D-TOPO<sup>®</sup>**

Plazmidy, u kterých byla potvrzena přítomnost inzertu byly použity jako templát v PCR reakci s upravenými gen-specifickými primery (CACC sekvence na 5' konci forward primeru) pro amplifikaci genu a následovalo klonování do expresního plazmidu pET 100/D-TOPO<sup>®</sup> (podle návodu).

### **5.3.10. Transformace v systému One Shot TOP10 E. coli Competent Cells**

Kompetentní buňky One Shot TOP10 *E. coli* Competent Cells byly transformovány podle návodu. Vzniklé rekombinanty, po purifikaci plazmidové DNA a ověření přítomnosti inzertů pomocí PCR, byly osekvenovány s použitím primerů T7 promoter a T7 reverse pro zjištění správného čtecího rámce.

### **5.3.11. Transformace v systému BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) One Shot<sup>®</sup> Cells**

Rekombinantní expresní plasmidy, které obsahovaly inzert ve správném čtecím rámci byly použity pro transformaci kompetentních buněk BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) One Shot<sup>®</sup> Cells (Invitrogen) podle návodu výrobce.

### **5.3.12. Exprese rekombinantního proteinu (pilotní experiment)**

Transformované BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) One Shot<sup>®</sup> buňky byly naočkovány do čerstvého LB média (1:20) s ampicilínem (50 µg/ml) a inkubovány při 37°C po dobu 4 hodin. Po odebrání 500 µl vzorku byl do média přidán IPTG (konečná koncentrace 1 mM) pro indukci exprese. Exprese probíhala 3 hodiny na třepačce při 37°C a každou hodinu byl odebrán vzorek (500 µl). Všechny vzorky byly stočeny a pelet zmražen při -20°C. Kontrola exprese a přítomnosti rekombinantních proteinů byla provedena u všech vzorků pomocí SDS-PAGE.

### **5.3.13. Kontrola exprese rekombinantního proteinu: SDS-PAGE**

Vzorky buněčných peletů z pilotní exprese byly resuspendovány v 50 µl pufru TE (pH 8). 20 µl vzorku bylo odebráno a smícháno s proteinovým vzorkovým pufrem, který obsahoval dithiothreitol (DTT). Po povaření při 100°C 10 minut následovala inkubace po dobu 3 minut na ledu, vzorek byl stočen. Supernatant byl nanesen na SDS-PAGE gel. Gel byl složen ze dvou částí - zaostřovacího (4%) a rozdělujícího (12%) gelu. Gely a pufry byly připraveny dle návodu. Elektroforéza probíhala na aparatuře Hoefer SE 250 při napětí 130V 1,5 hodiny. Po dokončení elektroforézy byl gel 3x promyt v destilované vodě a obarven v roztoku PageBlue<sup>TM</sup> (MBI Fermentas).

### **5.3.14. Western Blot a detekce rekombinantního proteinu**

Vzorky rozdělené SDS – PAGE elektroforézou byly přeneseny na PVDF membránu (Millipore). Přenos probíhal 1,5 hodiny při 250 mA (aparatura Idea Scientific Company, USA). Po ukončení přenosu byla membrána opláchnuta v destilované vodě, usušena a uchována při 20°C. Detekce rekombinantního proteinu ve vzorcích byla provedena za pomoci anti-His Ni-NTA HRP (horseradish peroxidase) konjugátů (Qiagen), které se váží na histidinovou kotvu na N- konci rekombinantního proteinu. Membrána byla 2x promyta v TBS po dobu 10 minut, inkubována 1 hodinu v 3% BSA v TBS pufru a promyta 3x 10 minut v TBST. Následovala inkubace 1 hodinu v Ni-NTA HRP kon-



jugátu a promytí 3x 10 minut v TBST. Barvená reakce proběhla v substrátovém roztoku chromogenu 4-chloro-1-naftolem a byla zastavena promytím v destilované vodě.

### **5.3.15. Nativní purifikace rekombinantního proteinu**

Pro nativní purifikaci byly použity proteiny v rozpustné formě, které byly připraveny v expresních buňkách Champion™ pET 100/D-TOPO®. Jeden gram buněčného peletu byl resuspendován ve 4ml lyzačního pufru. Byl přidán lysozym v konečné koncentraci 1mg na 1ml resuspendovaných buněk. Proběhla inkubace 30 minut na ledu a směs byla sonifikována na přístroji Bandelin Sonoplus při 20 kHz (6 x 10 sekund). Následovala centrifugace, po které bylo odebráno 20 µl supernatantu (na kontrolu pomocí SDS-PAGE) a zbytek byl uchován pro nativní purifikaci.

Kolonka (1 ml Ni-NTA agaróza) byla promyta 2 ml lyzačního pufru a poté byly přidány 4 ml lyzovaných buněk. Buňky byly inkubovány 1 hodinu při 4°C za mírného třepání. První vzorek (FT) byl odebrán a kolonka byla 3 x promyta 4 ml promývacího pufru. Po každém promytí byly odebrány další vzorky (W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>, W<sub>3</sub>). Cílový protein byl eluován z kolony elučním puftrem (4 x 0,5 ml - vzorky E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub>). Kontrola jednotlivých frakcí proběhla pomocí metody SDS-PAGE.

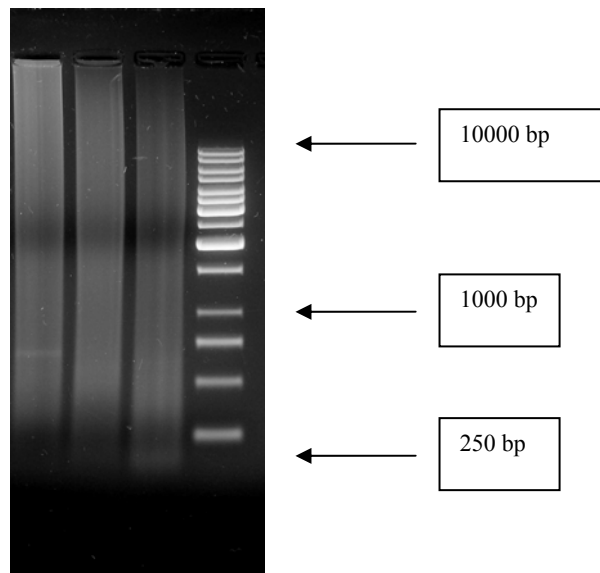
### **5.3.16. Izolace genomové DNA**

Genomová DNA byla izolována z plně nasátých samic *I. ricinus*. Izolace proběhla s použitím DNeasy® Tissue kit (Qiagen, Germany) podle návodu. Genomová DNA byla eluovaná z kolony 200 µl vody.

## **6. Výsledky**

### **6.1. Izolace RNA a syntéza jednovláknové cDNA**

Celková RNA (350 µg/ml) byla vyizolována z 10 nasátých neinfikovaných klíšťat *Ixodes ricinus*. Jednovláknová cDNA (203 µg/ml, Obr. 7) byla syntetizována z celkové RNA a použita jako templát v reakci amplifikace genu, kódujícího Salp25D (homolog glutathionperoxidázy).



Obr. 6 cDNA

## 6.2. PCR

Použitím metody PCR se specifickými primery pro Salp25D byl z cDNA klíštěte *Ixodes ricinus* získán gen Salp25D o velikost 666 bp. PCR produkt byl purifikován, ligován do vektoru pCR® 4-TOPO® a osekvenován. Srovnání získané sekvence (tabulka 4) se sekvencemi dostupnými v Gen Banku (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) prokázalo 100% homologii s částečnou sekvencí glutathionperoxidázy (ACI49692) u *Ixodes ricinus* a z 97% homologii s glutathionperoxidázou (AAK97814) u klíštěte *Ixodes scapularis*.

1	ATGGGTCCCCTGAACCTCGGCGATCCTTTCCCAACTTCACCTGCGACACA
1	M G P L N L G D P F P N F T C D T
52	ACCGAGGGCAAGATCGACTTCCACGAATGGCTCGGCAACTCGTGGGGCATC
18	T E G K I D F H E W L G N S W G I
103	CTGTTCTCGCACCCCGCCGACTACACCCCGGTGTGCACGAGCGAACTGGCC
35	L F S H P A D Y T P V C T S E L A
154	AGGGCAGCTCAGCTGCACCACGTCTTTCAAAGAAGGGTGTCAAGCTCATC
52	R A A Q L H H V F Q K K G V K L I
205	GCTCTCTCCTGCGACAGTGTGGAGAGCCACCGTGGTTGGATCAAGGACATC
69	A L S C D S V E S H R G W I K D I
256	AACGCCTTTGGGGAGCTGCCGGACGGGCCCTTCCCGTACCCCATCATCGCG
86	N A F G E L P D G P F P Y P I I A
307	GATGAGAAGCGCGACATTGCCGTCAAGCTGGGCATGCTGGACCCCGTGGAG
103	D E K R D I A V K L G M L D P V E
358	AAGGACAAGGAAGGGCTGCCTCTCACCTGCAGGGCGGTGTTTCATCATTGGT
120	K D K E G L P L T C R A V F I I G
409	CCCACAAGAAAATGAAGCTCTCCATGCTGTATCCCGCCACGACTGGAAGG
137	P D K K M K L S M L Y P A T T G R
460	AACTTCGACGAGGTCTGCGTGCCACCGATTCCCTGCTGGTGACGGAGACC
154	N F D E V L R A T D S L L V T E T
511	AGGAAGGTGGCGACGCCTGCTGGTTGGCAGAAGGGCACCCCGTGCATGGTC
171	R K V A T P A G W Q K G T P C M V
562	CTGCCTTCGGTGACCGAGGAAGAGATTCCCAAGCTGTTCCCGACGGGCATC
188	L P S V T E E E I P K L F P T G I
613	AAGCAGTACGAAGTTCCGTCTGGCAAGAACTACCTCCGAACAACCATGGACTGA
205	K Q Y E V P S G K N Y L R T T M D

Tabulka 4 Nukleotidová a přeložená proteinová sekvence genu pro Salp25D

Molekulová hmotnost genu Salp25D je 24 549 Da. Skládá se z 221 aminokyselin, z toho je 25 aminokyselin bazických (K, R), 29 kyselých (D, E), 73 hydrofóbních (A, I, L, F, W, V) a 47 polárních (N, C, Q, S, T, Y).

### 6.3. Expresí genu pro Salp25D v různých tkáních *I. ricinus*

Pro zjištění exprese genu pro Salp25D v různých tkáních klíštěte obecného, byla vyzolována RNA ze slinných žláz, malpighické trubice, ovárií, střeva a hemolymfy nasáté samice *Ixodes ricinus*. Následovala syntéza cDNA. Koncentrace cDNA všech vzorků byla vyrovnána, ředěním upravena na přibližně stejnou koncentraci a stejné množství bylo použito pro PCR reakci s gen-specifickými primery pro Salp25D, která prokázala různou expresi v tkáních (Obr. 8 a Obr. 9). Bylo prokázáno, že Salp25D je přítomen ve všech testovaných tkáních, ale nejvíce je exprimován ve slinných žlázách, střevě a ováriích.



Obr. 7 Detekce transkriptu Salp25D v různých tkáních klíštěte *I. ricinus*

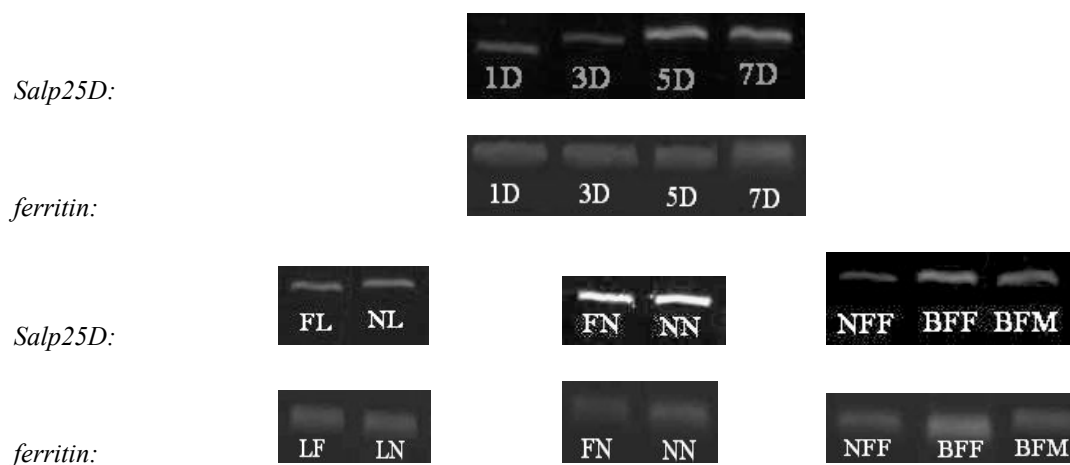


Obr. 8 Pozitivní kontrola - exprese genu kódující ferritin

SG – slinné žlázy	HL – hemolymfa	- negativní kontrola
G – střevo	OV - ovária	
MT – malpigiická trubice	+ - pozitivní kontrola (7 dní nasátá samice)	

#### **6.4. Exprese genu pro Salp25D v různých vývojových stádiích klíštěte *I. ricinus***

Pro zjištění exprese genu pro Salp25D v různých stádiích klíštěte bylo postupováno jako v kapitole 6.3. Jako vzorky byla použita jednotlivá stadia klíštěte (larva, nymfa, dospělec) a to jak nasátá i tak i nenasátá. Bylo prokázáno (Obr. 10), že exprese genu pro Salp25D je výraznější u nasátých samic než u nenasátých. Dále bylo prokázáno, že Salp25D je přítomen v každém stádiu klíštěte, nejmenší exprese byla prokázána u nenasáté samice. U zbylých vývojových stádií byla exprese genu téměř shodná, což může potvrdit důležitost Salp25D v životním cyklu klíštěte *I. ricinus*. Předchozí zmínku o funkci Salp25D, jako o jednom ze skupiny antioxidantních enzymů zahrnutých v detoxikačním procesu organismu, podporuje jeho přítomnost ve všech zkoumaných stádiích a tkáních.



**Obr. 9** Rozdílná exprese genu pro Salp25D u různě nasátých stádií klíštěte s pozitivní kontrolou exprese ferritinem

*1D – 1 den nasátá samička*

*FL – plně nasátá larva*

*NFF – nenasátá samička*

*3D – 3 dny nasátá samička*

*NL – nenasátá larva*

*BFF - plně nasátá samička*

*5D – 5 dní nasátá samička*

*FN - plně nasátá nymfa*

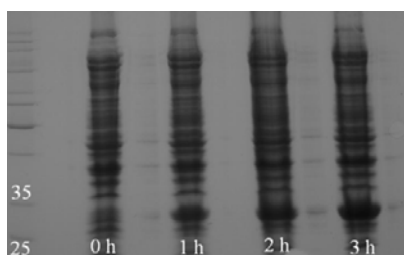
*BFM - plně nasátý samec*

*7D – 7 dní nasátá samička*

*NN – nenasátá nymfa*

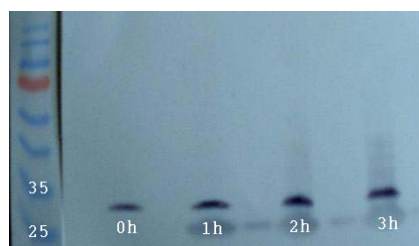
## **6.5. Expresa rekombinantního proteinu**

Po transformaci kompetentních buněk BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) One Shot<sup>®</sup> rekombinantními plazmidy, byla provedena pilotní exprese proteinu. Po 4 hodinách růstu byl odebrán vzorek (čas 0) a bylo přidáno IPTG a v časových intervalech (1 hodina, 2 hodiny a 3 hodiny), byly odebrány další vzorky. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí SDS – PAGE (viz Obr. 11). Rekombinantní protein o molekulové hmotnosti přibližně 28 kDa byl exprimován již od 1 hodiny po indukci a nárůst jeho exprese byl pozorován do 3. hodiny. Po přenosu na membránu byla provedena detekce His-tag fúzního Salp25D pomocí za pomoci anti-His tag protilátek (Obr. 12). Nejvyšší exprese po 3 hodinách byla potvrzena.



**Obr. 10** Expresa rekombinantního proteinu Salp25D

0h – kontrola

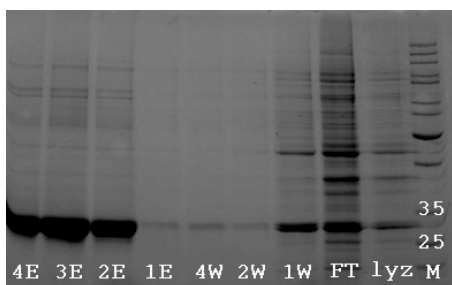


**Obr. 11** Rekombinantní protein detkován pomocí Ni NTA konjugátů

1h-3h počet hodin od začátku exprese

### 6.5.1. Nativní purifikace rekombinantního proteinu

Lyzát byl nanesen na kolonku s Ni-NTA agarózou. Kolonka byla promyta a cílový protein byl eluován elučním pufrem. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí SDS-PAGE (viz Obr. 13). Koncentrované frakce proteinů byly naneseny na gel SDS-PAGE a rozděleny podle dříve popsaného postupu. Salp25D byl pozorován ve velké míře ve všech elučních frakcích. Po přenosu proteinů na PVDF membránu a následné detekci pomocí anti-His protilátek, byly zaznamenány proužky na membráně 2, 3, 4. elučních frakcích (viz Obr. 14).



**Obr. 12** SDS - PAGE gel –nativní purifikace

Lyz – lyzát

FT - Flow through- proteiny nenavázané na kolonu



**Obr. 13** Detekce rekombinantního Salp25D pomocí Ni NTA konjugátů při nativních podmínkách

1W-3W – promývací frakce

1E-4E – eluční frakce

### 6.6. Hmotnostní spektrometrická analýza

Pomocí hmotnostní spektrometrické analýzy byla určena částečná aminokyselinová sekvence purifikovaného proteinu s následným srovnáním identifikovaných peptidů s proteinovou sekvencí odvozenou z nukleotidové sekvence genu glutathionperoxi-

dázy klíštěte *I. ricinus*. Shodnost byla prokázána ze 40,7 %, což znamená, že produkce rekombinantního proteinu Salp25D v systému klonovaným genem byla potvrzena.

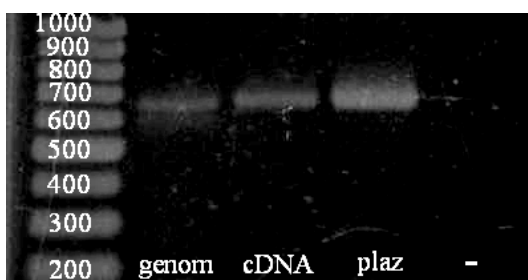
1	MGPLNLGDPF	PNFTCDTTEG	KIDFHEWLGN	SWGILFSHPA	DYTPVCTSEL
51	ARAAQLHHVF	QKKGVKLIAL	SCDSVESHG	WIKDINAFGE	LPDGPFPYPI
101	IADKRDIAV	KLGLMDPVEK	DKEGLPLTCR	AVFIIGPDKK	MKLSMLYPAT
151	TGRNFDEVLR	ATDSLIVTET	RKVATPAGWQ	KGTPCMVLP	VTEEEILKLF
201	PTGIKQYEVF	SGKNYLRTTM	D		

Obr. 14 Identifikace rekombinantního proteinu Salp25D

Žlutá - shodné aminokyseliny se sekvencí glutathionperoxidázy

## 6.7. Genomová struktura genu kódujícího Salp25D

Genomová DNA, která byla izolována z plně nasátých samiček klíštěte *I. ricinus*, byla použita pro ověření přítomnosti intronů v genu kódujícím Salp25D pomocí metody PCR s použitím stejných primerů jako v případě amplifikace genu Salp25D z cDNA. Tři PCR produkty amplifikované z genomové DNA, cDNA a plazmidové DNA klíštěte *I. ricinus* potvrdily, že gen Salp25D v sobě nenese žádné introny. Analýza sekvence pomocí programu Genewise (<http://www.ebi.ac.uk/Wise2/index.html>), potvrdila, že gen pro Salp25D žádné introny nemá, což odpovídá našim výsledkům.



Obr. 15 Ověření genomové struktury genu pro Salp25D

Genom – genomová DNA

plaz – osekvenovaný plazmid

cDNA – cDNA ze slinných žláz nasáté samice

- negativní kontrola

## 6.8. Funkční aktivita rekombinantního proteinu

V tomto experimentu by mělo být prokázáno, že Salp25D dokáže chránit „supercoiled“ DNA před jejím rozštěpením OH radikály. 3 mM FeCl<sub>3</sub>, 0,1 mM EDTA a 10 mM DTT v HEPES pufru (pH 7,2) byly inkubovány při 37°C 1 hodinu pro vytvoření hydroxylových radikálů. Následovalo přidání 1 mg „supercoiled“ pBR322 plasmidu (New England Biolabs) a inkubace pokračovala další 4 hodiny v přítomnosti nebo nepřítomnosti vzrůstajících koncentrací proteinu Salp25D. Reakčvčetně produktů ní směs

byla vyhodnocena elektroforézou na 0,8 % agarózovém gelu a vizualizována pod UV světlem. Experiment zatím probíhá, ale nemohl být dosud dokončen.

## 7. Diskuse

Klíšťata jsou pozoruhodní živočichové. Klíště obecné *Ixodes ricinus*, přenašeč lymfské borreliózy, je schopno přilnout k nic netušícímu hostiteli, do podkoží vnořit ostnatý hypostom a z vytvořené kapky krve získávat potravu po dobu 5-7 dnů. Toto vše se odehrává bez vědomí hostitele. Aby klíště zabránilo odhalení své přítomnosti, sekreduje do místa poranění sliny, které snižují dráždivost hostitele a hrají tak klíčovou roli v interakcích přenašeč-hostitel-patogen. Ve slinách se nachází mnoho farmakologicky aktivních komponent, které zahrnují vazodilatátory, antikoagulanty, inhibitory hromadění krevních destiček, inhibitory komplementu a imunosupresory, které společně usnadňují sání krve (17, 18, 19). Na základě jejich účinné a cílené biologické aktivity pozměňují komponenty ze slinných žláz klíštěte místo kousnutí, a umožňují vektorem přenášeným patogenům úspěšné infikování hostitele (17, 20, 21). Salp25D je jedna z mnoha molekul účastnících se v tomto procesu. Je to protein, který je homologem glutathionperoxidázy, patřící do velké rodiny peroxidáz závislých na thioredoxinu. Tyto peroxidázy jsou přítomné v bakteriích, rostlinách a savcích a jsou zapojeny do enzymatické degradace peroxidu vodíku, lipidové hydroperoxydy a peroxidusitan (22). Salp25D je exprimován ve slinných žlázách a střevu klíštěte (16). Prokázalo se, že gen pro Salp25D u klíštěte *I. ricinus* je exprimován ve všech orgánech, ale s různou intenzitou. Největší exprese byla potvrzena ve slinných žlázách, ováriích a ve střevě. Tyto orgány jsou vystaveny působení antigenů z hostitele s přijímanou potravou. Expresce Salp25D v těchto orgánech není překvapením a může souviset s obranou klíštěte. Dále se prokázalo, že gen pro Salp25D je exprimován u všech stádiích klíštěte. Podle předpokladu nejsilnější exprese, byla zjištěna u nasáté samice a to potvrzuje, že sání krve skutečně indukuje expresi genu, který má detoxikační funkci a slouží k ochraně klíštěte.

Salp25D úspěšně potlačuje kyslíkové radikály produkované aktivovanými neutrofily. I když Salp25D nemá vylučovací signální sekvenci, hostitel imunní proti klíštěti vyvíjí protilátky proti tomuto proteinu. Z toho vyplývá, že Salp25D musí být přítomen ve slinách klíštěte. Může být syntetizován v rozdílných typech buněk ve žlázách, které mají holokrinní nebo apokrinní sekreci a může být takto začleněn do slin, buď



buněčnou degradací nebo jejich netěsností. Dále může být Salp25D sekretován další neznámou cestou (16).

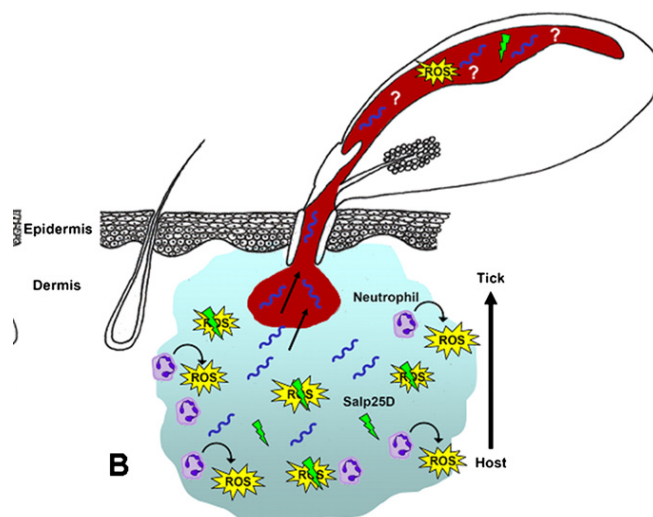
Podářilo se nám izolovat cDNA genu Salp25D z klíštěte *I. ricinus*, která obsahuje otevřený čtecí rámec (666 bp) kódující 221 aminokyselin, proteinu o molekulové hmotnosti 24,5 kDa. Porovnání Salp25D *I. ricinus* s antioxidantními proteiny z různých organismů odhalilo vysokou úroveň homologie mezi nimi a prokázalo zachování jejich téměř nezměněné sekvence v průběhu evoluce (16). Prokázat funkční aktivitu rekombinovaného proteinu při použitých koncentracích Salp25D se zatím nepodařilo. Příčinou může být nedostatečné množství aktivní bílkoviny nebo nesprávná posttranslační úprava bílkoviny. Pro vyřešení tohoto problému musí být podmínky optimalizovány.

Reaktivní kyslíkové skupiny ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO^-$ ) vytvořené v průběhu metabolismu mohou způsobit buněčná poškození. Glutathion, pomocí glutathionperoxidázy a glutathionreduktázy, hraje roli jako součást antioxidantního systému chránícího tkáň. Také v průběhu lokálního poranění tkáně je reaktivní kyslík syntetizován v odumřelé tkáni leukocyty, které migrují do poraněného místa (16).

Zmíněné procesy byly důkladně popsány dříve. Naopak existuje jen velmi málo informací o opačném procesu – jak patogeny překonávají nepřátelské prostředí vytvořené soupeřením mezi klíštětem a imunitní odpovědí hostitele při interakci klíště – hostitel.

Protože klíště během sání krve vylučuje sliny, může přijímat svoje vlastní sliny zpět s hostitelskou krví a patogeny. Degradace hemu a tvorba kyslíkových radikálů, která nastává v průběhu trávení ve střevu klíštěte, představuje problém pro získané spirochéty případně přenesené z hostitele do střeva klíštěte. Bylo prokázáno že Salp25D ze slin *I. scapularis* může chránit borelie ve střevě klíštěte, stejně jako na kůži hostitele. Poslední zprávy ukazují, že oxidativní stres ve střevě mouchy tsetse ovlivňuje vývoj trypanozóm. Dodání antioxidantů do trávené krve chrání trypanozómy před kyslíkovými radikály ve střevě přenašeče, což poukazuje na důležitost antioxidantů pro přežití patogenů ve střevu přenašeče (23). Na rozdíl od ostatních arthropod, klíšťata musejí zůstat přisáta na kůži hostitele delší časové období, aby se dokončilo krmení, proto není překvapivé, že počet a rozmanitost slinných transkriptů je u klíšťat mnohem větší ve srovnání s ostatními přenašeči, jak dokazují nedávné výsledky výzkumu genomiky slinných žláz klíštěte (16, 19). Ve slinách klíštěte byly popsány různé molekuly, které

ovlivňují hostitelský imunitní systém a mohou ovlivnit přenos patogenů. Patří mezi ně inhibitory B-, T- a NK buněk, inhibitory makrofágů a neutrofilové aktivity, cytokinové a chemokinové modulátory a cystatiny (19, 20, 21). Nicméně identita molekul zodpovědných za většinu těchto procesů zůstává neznámá. Genomika slinných žláz klíštěte v kombinaci s funkčními přístupy (jako je vypínání genů metodou RNA interference, diferenciální exprese jejich exprese a jejich produktů) pomáhají identifikovat molekuly ve slinách, které se uplatňují při krmení klíštěte krví i při imunosupresi hostitele, rovněž také molekuly využívané patogeny k usnadnění jejich „zabydlení se“ v hostiteli a v přenašeči. Práce autorů Narasimhan a kol. (2007) představuje první příklad proteinu ze slin klíštěte *Ixodes scapularis*, Salp25D, který může pomoci boreliím přežít nepříznivé prostředí ve střevě klíštěte a na kůži hostitele a ochránit je při migraci z hostitele do přenašeče. Klíště *Ixodes ricinus* stejně jako *I. scapularis* je kompetentní přenašeč spirochét *B. burgdorferi*, předpokládáme proto, že protein Salp25D má stejnou funkci u obou druhů klíšťat rodu *Ixodes*. Tato data pomáhají vyplnit mezery v našem chápání funkce klíštěčích molekul, které se účastní přenosu patogenů. Poznatky o biologicky aktivních molekulách ze slin klíštěte zdůrazňují jejich rozhodující roli v přenášení patogenů a předpokládají jejich možné využití jako prostředků, pro kontrolu onemocnění přenášených arthropody.



**Obr. 16** Schéma působení Salp25D ze slin klíštěte na ochranu a přenos *B. burgdorferi* (25)

Migrace borelií ze savčího hostitele do klíštěte je prozkoumána méně, ale nyní se jeví, že Salp25D neutralizuje účinky různých druhů reaktivního kyslíku (ROS) vytvářených aktivovanými neutrofily. Tím usnadňuje a umožňuje boreliím proniknout do vnitřního prostředí klíštěte s krví hostitele. Úloha těchto nebo dalších antioxidantů ve střevu klíštěte ještě není prozkoumána.

## 8. Závěr

U klíštěte *Ixodes ricinus* se pomocí metody PCR podařilo izolovat gen (666 bp) kódující Salp25D (24,5 kDa), homolog glutathionperoxidázy, který prokázal 97% homologii s glutathionperoxidázou klíštěte *Ixodes scapularis*. Exprese Salp25D je indukována sáním krve. Bylo prokázáno, že Salp25D je produkován u všech nasátých i nenasátých stádií klíštěte *I. ricinus*, ale s různou úrovní exprese. Bylo prokázáno, že Salp25D je produkován ne jen ve slinných žlázách klíštěte *I. ricinus*, ale i ve střevě, ováriích (u kterých se nachází s vysokou expresí), malpigických trubicích a hemolymfě. Analýza nukleotidové sekvence genu kódujícího Salp25D amplifikovaného na cDNA a genomové DNA *I. ricinus* ukázala, že gen Salp25D v sobě nenese žádné introny. Hmotnostní spektrometrická analýza prokázala, že rekombinantní Salp25D produkováný v bakteriálním expresním systému odpovídá předpokládané proteinové sekvenci odvozené z nukleotidové sekvence genu.

## 9. Použitá literatura

1. **Oschmann P., Kraiczy P., Halperin J., Brade V. (1999):** Lyme Borreliosis and Tick-Borne Encephalitis. UNI-MED, Bremen: 30-32.
2. **<http://www.pylovasluzba.cz/novinky/kousnuti-klitetem-muze-vyvolat-alergickou-reakci-161>**
3. **[http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/ixodes\\_ricinus.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/ixodes_ricinus.pdf)**
4. **[http://www.ecmost.cz/cd/data/zdravi/prirod\\_nakazy/kliste.htm](http://www.ecmost.cz/cd/data/zdravi/prirod_nakazy/kliste.htm)**
5. **Hovious J.W.R., Levi M., Fikrig E. (2008):** Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. PLoS Medicine 5: e43.
6. **[http://meduni09.edis.at/eucalb/cms/index.php?option=com\\_content&task=view&id=53&Itemid=87](http://meduni09.edis.at/eucalb/cms/index.php?option=com_content&task=view&id=53&Itemid=87)**
7. **Kovář L. (2004):** Tick Saliva in Anti-Tick Immunity and Pathogen Transmission. Folia Microbiol. 49: 327-336.
8. **Taylor D. (2006):** Innate Immunity in Tick: A review. J. Acarol. Soc. Jpn. 15: 109-127.
9. **Wang X.G., Fuchs J.F., Infanger L.C., Rocheleau T.A., Hillyer J.F., Chen C.C., Christensen B.M. (2005):** Mosquito innate immunity: involvement of  $\beta$ -1,3-glucan recognition protein in melanotic encapsulation immune response in *Armigeres subalbatus*. Molec. Biochem. Parasitol. 139: 65-73.

10. **Munderloh U.G. and Kurtti T.J. (1995):** Cellular and molecular interrelationships between ticks and procaryotic tick-borne pathogens. *Annu. Rev. Entomol.* 40: 221-243.
11. **Friedhoff K.T. (1990):** Interaction between parasite and tick vector. *Int. J. Parasitol.* 20: 525.
12. **Coburn J., Magoun L., Bodary S.C., Leong J.M. (1998):** Integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$  mediate attachment of Lyme disease spirochetes to human cells. *Infect Immun* 66: 1946–1952.
13. **Sonenshine D.E. (1991):** *Biology of ticks.* Oxford: Oxford University Press.
14. **Freitas D.R.J., Rosa R.M., Mores J., Campos E., Logullo C., Da Silva Vaz I. Jr., Masuda A. (2007):** Relationship between glutathion S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larva of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146: 688-694.
15. **Margis R., Dunaje C., Teixeira K. F., Margis-Pinheiro M. (2008):** Glutathion peroxidase family-an evolutionary overview. *FEBS* 275: 3959-3970.
16. **Das S., Banerjee G., DePonte K., Marcantonio N., Kantor F.S., Fikrig E. (2001):** Salp25D, an *Ixodes scapularis* Antioxidant, In 1 of 14 Immunodominant Antigens in Engorged Tick Salivary Glands. *J. Inf. Dis.* 184: 1056-1064.
17. **Ribeiro José M.C., Francischetti Ivo M.B. (2003):** Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and Post-Sialome. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 73-88.
18. **Anguita J., Ramamoorthi N., Hovius J.W., Das S., Thomas V., Persinski R., Conze D., Askenase P.W., Rincón M., Kantor F.S., Fikrig E. (2002):** Salp15, an *ixodes scapularis* salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation. *Immunity* 16 (6): 849-59.

19. **Kotsyfakis M., Sá-Nunes A., Francischetti I.M.B., Mather T.N., Andersen J.F., and Ribeiro J.M.C. (2006):** Immunosuppressive Activity of Sialostatin L, a Salivary Cystatin from the Tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 281: 26298-26307.
20. **Ramamoorthi N., Narasimhan S., Pal U., Bao F., Yang X.F., Fish D., Anguita J., Norgard M.V., Kantor F.S., Anderson J.F., Koski R.A., Fikrig E. (2005):** The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature* 436 (7050): 573-7.
21. **Bishop J.V., Majia J.S., Pérez de León A., Tabachnick W.J., Titus R.G. (2006):** Salivary gland extracts of *Culicoides sonorensis* inhibit murine lymphocyte proliferation and no production by macrophages. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 75(3): 532-536.
22. **Georgiou G, Masip L. (2003):** Biochemistry. An overoxidation journey with a return ticket. *Science* 300(5619): 650-653.
23. **MacLeod E.T., Maudlin I., Darby A.C., Welburn S.C. (2007):** Antioxidants promote establishment of trypanosome infections in tsetse. *Parasitology* 134(Pt 6): 827-831.
24. **Narasimhan S., Sukumuran B., Bozdogan U., Thomas V., Liasng X., DePonte K., Marcantonio N., Koski R.A., Anderson J.F., Kantor F., Fikrig E. (2007):** A tick antioxidant facilitates the Lyme disease agent's successful migration from the mammalian host to the arthropod vector. *Cell Host Microbe* 2(1): 7-18.
25. **Anderson J.M., Valenzuela J.G. (2007):** Spit-acular entry: *Borrelia* gets help from a tick salivary protein to move from the mammalian host to the arthropod vector. *Cell Host Microbe* 2(1): 7-18.

## **10. Použité zkratky**

**GPx** – glutathionperoxidáza

**ROS** – Reaktivní kyslíkové skupiny

**IPTG** - isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid

**DTT** – dithiothreitol

**HEPES** - N'-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2 ethanesulfonová kyselina

**EDTA** - Ethylendiamintetraoctová kyselina

**PHGPx** - fosfolipid hydroperoxid glutathionperoxidáza

**PGN** – peptidoglykany

**LPS** – lipopolysacharidy

**GPI** – glykosyl fosfatidyl inositol