

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Lokalizace izoforem katepsinu L (IrCL) ve tkáních
klíštěte *Ixodes ricinus***

Diplomová práce

Bc. Jana Schrenková

Školitel: RNDr. Petr Kopáček, CSc.
Školitel specialista: RNDr. Marie Vancová, Ph.D

České Budějovice 2013

Schrenková, J., 2013: Lokalizace izoform katepsinu L (IrCL) ve tkáních klíštěte *Ixodes ricinus* [Localization of the cathepsin L isoforms (IrCL) in the tissues of the hard tick *Ixodes ricinus*, Mgr. Thesis, in Czech] – 44 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Two isoforms of the tick *Ixodes ricinus* digestive peptidases cathepsins L1 and L3 are expressed also in salivary glands. In order to assess their role in this tissue, the specific antibodies against these peptidases were prepared by affinity chromatography and used for their detailed immuno-localization using cutting-edge methods of electron microscopy.

Tato práce byla vypracována s podporou grantu GAČR – 13-11043 S (řešitel P. Kopáček).

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

Děkuji především svým školitelům, doktoru Petru Kopáčkovi za obrovskou pomoc a trpělivost nejen při všech pokusech, ale především při samotném psaní diplomové práce a doktorce Marii Vancové za umožnění nahlédnutí do tajů mikrosvěta. Za veškeré poznatky týkající se elektronové mikroskopie vděčím právě jí. Mé díky patří všem pracovníkům naší laboratoře, kteří mi poskytli příjemné prostředí a kteří mi vždy ochotně poradili. Zároveň bych ráda poděkovala všem zaměstnancům Laboratoře elektronové mikroskopie. Jejich ochota pomoci a vše vysvětlit mi poskytla ideální podmínky pro mé bádání. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům, kteří mě během celého studia podporovali nejen finančně, ale především morálně.

Obsah

1.	Úvod.....	1
1.1	Klíště obecné – <i>Ixodes ricinus</i>	1
1.2	Katepsin L a jeho úloha ve fyziologii klíšťat	3
1.3	Slinné žlázy klíšťat	6
1.3.1	Aciny typu I	7
1.3.2	Aciny typu II.....	8
1.3.3	Aciny typu III.....	9
2.	Cíle práce	11
3.	Materiál a metody	12
3.1	Příprava primárních protilátek.....	12
3.1.1	Chov klíšťat <i>Ixodes ricinus</i>	12
3.1.2	Příprava imunních sér	13
3.1.3	Příprava imunoglobulinové frakce.....	13
3.1.4	Purifikace protilátek pomocí afinitní chromatografie.....	14
3.1.5	Ověření specifity protilátek na střevním homogenátu	16
3.1.6	Ověření přítomnosti trávicích peptidáz ve slinných žlázách	18
3.2	Imunolokalizace peptidáz na kryo řezech	19
3.2.1	Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii	19
3.2.2	Lokalizace trávicích peptidáz	22
4.	Výsledky a diskuze	24
4.1	Příprava imunitních sér pro imunocytochemii, izolace Ig frakce protilátek a purifikace protilátek pomocí afinitní chromatografie.....	24
4.2	Imunolokalizace izoform katepsinu L ve slinných žlázách pomocí transmisní elektronové mikroskopie	26
4.2.1	Lokalizace katepsinu L1 ve slinných žlázách klíštěte <i>I. ricinus</i>	28
4.2.2	Lokalizace katepsinu L3 ve slinných žlázách klíštěte <i>I. ricinus</i>	30
4.2.3	Negativní kontrola	31
5.	Závěr	38
6.	Shrnutí.....	39
7.	Literatura.....	40

1. Úvod

Klíšťata jsou krevsající ektoparazitě taxonomicky náležící do kmene *Arthropoda*, podkmene *Chelicerata*, třídy *Arachnida*, do řádu *Acarinia* a do podřádu *Ixodida*. Celkem bylo popsáno 899 druhů klíšťat (Jongejan et al., 2004), která se vyskytují na všech kontinentech světa s výjimkou Antarktidy (Steen et al., 2006). Podřád *Ixodida* se dělí do tří čeledí, a sice *Argasidae*, jejíž zástupci jsou označováni jako tzv. měkká klíšťata a která čítá 193 druhů, *Ixodidae*, známá jako tvrdá klíšťata se 702 druhy ve 14 rodech (Guglielmone et al., 2010) a *Nuttalliellidae* s pouze jedním druhem (Nava et al., 2009).

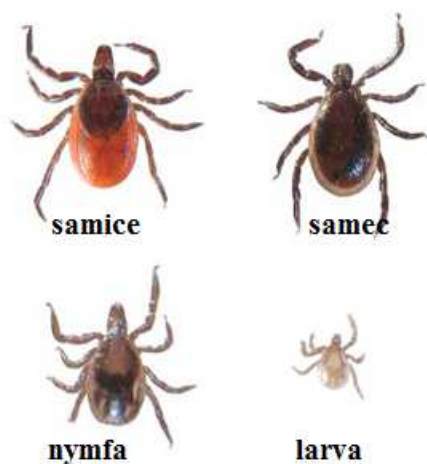
Asi 10 % z celkového počtu druhů klíšťat lze charakterizovat jako vektory významných patogenů (od virů, bakterií až po protozoa), které postihují nejen zvířata, ale i člověka (de la Fuente et al., 2008). Z hlediska ohrožení lidského zdraví jsou klíšťata po komárech nejdůležitější přenašeči infekčních a parazitárních onemocnění (Sonenshine, 1991). Z těchto důvodů je klíšťatům přisuzován mimořádný lékařský a veterinární význam a jakýkoli vědecký pokrok, vedoucí k porozumění těmto parazitům, může mít nesmírný význam při prevenci nebezpečných chorob způsobených patogeny přenášenými právě klíšťaty. Těmi jsou například klíšťová encefalitida, lymeská borelióza nebo tularémie (Nuttall, 1999) a také obtíže spojené s klíšťaty, jako anémie nebo dermatóza (Telford et al., 2004).

1.1 Klíště obecné – *Ixodes ricinus*

Do současnosti bylo popsáno 243 druhů rodu *Ixodes*. V České republice a v celé střední Evropě se setkáváme prakticky výhradně s klíštětem obecným, *Ixodes ricinus*. To bylo popsáno Carlem von Linné v roce 1758 (Horák et al., 2002). Typickým biotopem jsou otevřená prostranství, vlhké louky a lesy, které poskytují klíšťatům ideální podmínky k nalezení hostitele a kde je možné spatřit je od března do listopadu v závislosti na počasí a nadmořské výšce. Výskyt klíšťat v nadmořské výšce přesahující hranici 1000 metrů je spíše ojedinělý (Gray, 1991).

Klíště *I. ricinus* je klasickým představitelem trojhostitelského druhu, kdy k metamorfózám mezi jednotlivými stádii dochází mimo hostitele. Jednotlivé metamorfózy

jsou podmíněny vyhledáním nového hostitele, teplotou (do 15 – 18 °C) a množstvím přijaté hostitelské krve. Rozlišujeme čtyři vývojová stádia klíšťat – vajíčko, larvu, nymfu a dospělce (obr. 1). Období sání začíná v rozmezí 6 měsíců až jednoho roku po vylíhnutí, což umožňuje larvám přežít suchá a chladná období roku (Sonenshine, 1991).



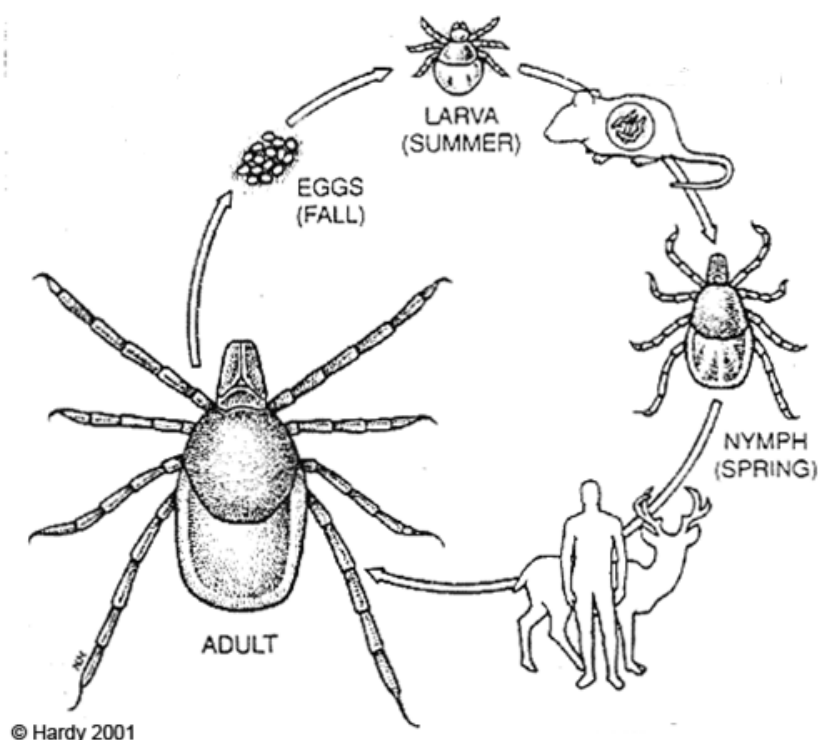
Obr. 1: Vývojová stádia klíšťat z čeledi *Ixodidae*, (upraveno dle www.tickencounter.org).

Samice produkují zhruba 2500 – 4000 vajíček. Z vajíček se líhnou šestinohé larvy o velikosti přibližně 0,8 mm, které parazitují na drobných hlodavcích (4 – 5 dní) a které se po odpadnutí přeměňují na nymfy. Nymfa prochází vývojem larválních orgánů na vyšší vývojový stupeň. Od larev se nymfy liší nejen velikostí (1,2 – 1,5 mm), ale také počtem končetin, kdy nymfu poznáme podle čtyř párů nohou. Nymfy vyhledávají větší hostitele, ideální jsou pro ně zajíci, ježci, psi, kočky, ale také člověk. Délka sání nymf se pohybuje v rozmezí 3 – 5 dnů a po plném nasání nymfa odpadá a dostává se do stádia druhé metamorfózy v dospělce (imago), které je schopno reprodukce. Samice jsou oproti samcům výrazně větší (3,5 – 4,5 mm u samic a 2,5 mm u samců) a parazitují především na zvěři. Nalézt je můžeme ale také na liškách, dobytku, koních a člověku (Volf, Horák et.al, 2007).

Díky přítomnosti typického sklerotizovaného štítku (scutum) na hřbetní straně těla se druh *Ixodes ricinus* řadí mezi tzv. “ tvrdá klíšťata“. Zatímco u samců pokrývá scutum celou dorzální část těla, u samic zasahuje pouze do třetiny těla, což umožňuje samicím několikanásobně zvětšit objem těla během sání a získat tak dostatek energie pro tvorbu

vajíček (Volf, Horák et al, 2007). Sání samic se pohybuje v rozmezí 6 – 9 dnů a po plném nasátí může samice zvětšit svou velikost až na délku 1,5 cm. Po ukončení sání na hostiteli samice naklade vajíčka a umírá. Samci v posledním vývojovém stádiu již nesají, jejich úlohou je oplodnění samice.

Délka celého vývojového cyklu klíšťat (od vajíčka k reprodukci schopného jedince) trvá v našich zeměpisných podmínkách nejčastěji 2 – 3 roky. V extrémních případech však může cyklus proběhnout za pouhý jeden rok a naopak může být prodloužen až do pěti let (obr. 2).



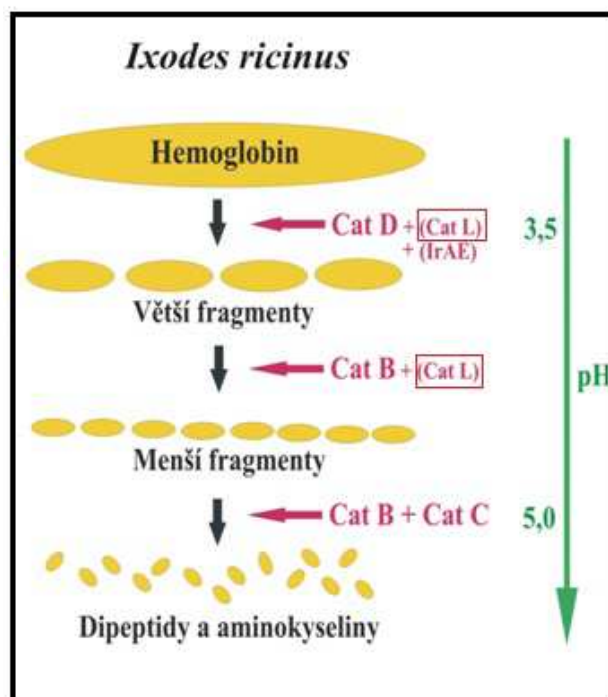
Obr. 2: Schéma vývojového cyklu klíšťat z čeledi *Ixodidae*, (upraveno dle www.wwhd.org).

1.2 Katepsin L a jeho úloha ve fyziologii klíšťat

Trávení krve hostitele, a tudíž získávání energie, je jedním z klíčových procesů probíhajících v těle klíšťat (McKerrow et al., 2006). Energie z potravy je využívána nejen pro chod organismu, získávání živin, ale také pro metamorfózu larev a nymf a pro tvorbu vajíček (Grandjean, 1984). Trávení probíhá především uvnitř buněk střevního epitelu, kde se na něm podílejí proteolytické enzymy (peptidázy) obsažené v trávicích vakuolách střevních

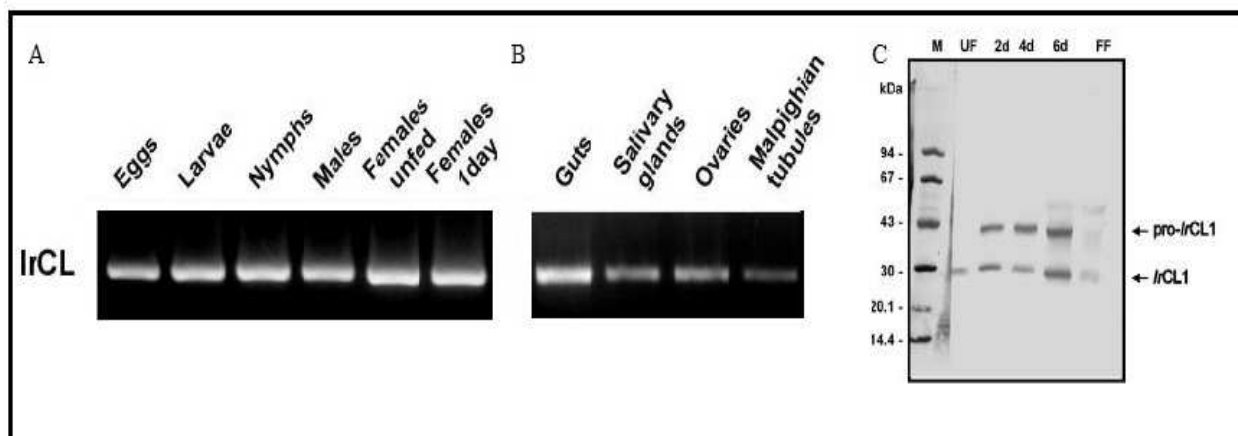
buněk (Sonenshine, 1991). Peptidázy se obecně dělí podle místa štěpení substrátu na endopeptidázy a exopeptidázy a dále podle mechanismu účinku na proteázy serinové, cysteinové, aspartátové a metaloproteázy (Vodrážka, 2002).

Trávicí enzymy zúčastněné v procesu trávení krve u klíšťat jsou zejména exo- a endopeptidázy cysteinového a aspartátového typu (Sojka et al., 2013). Ty jsou přítomny v největší míře v trávicích vakuolách střevních buněk, kde je jejich funkcí degradace přijatého hemoglobinu a ostatních proteinů obsažených v krvi hostitele. Na trávení hostitelské krve se podílí cysteinové peptidázy katepsin B, L, C, dále asparaginylová endopeptidáza legumain a aspartátová peptidáza katepsin D (Sojka et al., 2007; Sojka et al., 2008; Horn et al., 2009; Sojka et al., 2013). Trávicí systém lze připodobnit ke kaskádě cysteinových a aspartátových proteáz, které byly identifikovány a popsány například u motolice *Schistosoma mansoni* (Caffrey et al., 2004). U klíšťat dochází k primárnímu štěpení hemoglobinu za účasti katepsinu D, ten je podporován katepsinem L a legumainem. Dále jsou tyto fragmenty štěpeny na menší peptidy endopeptidázovou aktivitou katepsinu B. V konečné fázi jsou tyto fragmenty rozštěpeny na dipeptidy cysteinovými exopeptidázami (katepsiny B a C) a na jednotlivé aminokyseliny dosud blíže necharakterizovanými serinovými peptidázami popř. metaloproteázami. Degradace hemoglobinu probíhá v kyselém prostředí, pH 3,5 – 4,5 (Horn et al., 2009), (obr. 3).



Obr. 3: Degradace hemoglobinu v trávicích vakuolách trávicích buněk ve střevě *Ixodes ricinus* za účasti trávicích peptidáz (upraveno dle Pěničková, 2010).

Katepsin L lze klasifikovat jako cysteinovou peptidázu náležící do klanu CA a do rodiny C1 papainových peptidáz. Katepsin L u klíšťat *I. ricinus* přispívá druhou nejvyšší měrou (po katepsinu D) ke štěpení hemoglobinu na větší fragmenty a v nepřítomnosti katepsinu D může jeho funkci nahradit. Katepsin L lze identifikovat ve všech vývojových stádiích klíštěte *I. ricinus* (Sojka et al., 2008), (obr. 4A). Gen pro katepsin L je exprimován nejen ve střevě, ale i ve vaječnicích, Malpighických trubicích a slinných žlázách dospělé samice *I. ricinus* (Sojka et al., 2008), (obr. 4B). Ve střevním homogenátu klíštěte *I. ricinus* lze pomocí specifických protilátek zjistit jak aktivní formu enzymu katepsin L (28 kDa), tak i jeho proenzym (40 kDa), (obr. 4C). V naší laboratoři byl úspěšně izolován a klonován gen pro katepsin L (Sojka et al., 2008) a jeho sekvence byla srovnána s paralogními geny pro katepsin L u příbuzného druhu *Ixodes scapularis* (<http://iscapularis.vector-base.org>; prosinec 2008), (Sojka et al., 2013). V genomu *I. scapularis* byly nalezeny tři izoformy katepsinu L (IsCL1, IsCL2 a IsCL3), přičemž IsCL1 je jasným ortologem k IrCL1 s více než 90 % -ní shodou v sekvenci aminokyselin (Franta et al., 2011). Zbylé dvě izoformy katepsinu L se u *I. scapularis* (IsCL2 a IsCL3) sekvenčně výrazně liší od IrCL1/IsCL1. U druhu *I. ricinus* byly v naší laboratoři dosud identifikovány dvě izoformy katepsinu L (IrCL1, IrCL3), přičemž obě formy byly připraveny jako rekombinantní pro-enzymy, které bylo možné převést na aktivní enzymy. Přítomnost tohoto enzymu ve slinných žlázách byla prokázána i proteomicky a pomocí stanovení aktivit (Mareš et al., nepublikováno). Slinné žlázy klíšťat zároveň produkují účinné inhibitory katepsinu L (tzv. sialostatiny), které výrazně ovlivňují imunitní odpověď hostitele (Kotsyfakis 2008; Sá-Nunes, 2009; Schwarz, 2012). Jaká je úloha endogenního klíštěcího katepsinu L ve slinách klíštěte je dosud nejasná. K poznání jeho funkce by měla přispět i detailní imunolokalizace tohoto enzymu ve slinných žlázách v průběhu sání klíštěte na hostiteli, což bylo předmětem této diplomové práce.



Obr. 4: (A) Katepsin L ve vývojových stádiích klíštěte *I. ricinus*; (B) Katepsin L (IrCL1) v tkáních polonasáté samice klíštěte *I. ricinus*; (C) Detekce proenzymu a aktivní formy enzymu katepsinu L (IrCL1) v průběhu sání na hostiteli ve střevním homogenátu klíštěte *I. ricinus* pomocí Western blottingu, [převzato ze Sojka et al., 2008 (A, B), Franta et al., 2011 (C)].

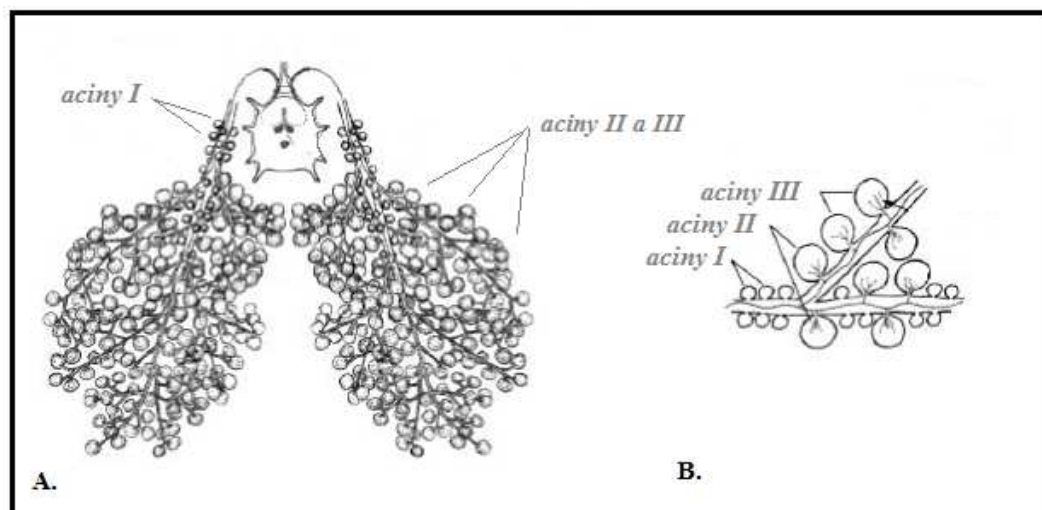
1.3 Slinné žlázy klíšťat

Slinné žlázy jsou nezbytnou částí těla klíšťat. Jedná se o největší žlázu v těle klíštěte zajišťující sekreci slin (Sonenshine, 1991). Dokud klíště nezačne sát na hostiteli, slinné žlázy nejsou plně aktivní (Walker et al., 1985). Množství vyprodukovaných slin vzrůstá v průběhu sání, což má za následek efektivnější příjem živin z krve. Během sání totiž dochází k návratu až 70 % přebytečné vody a iontů zpět do hostitele (Bowman, 2004). Slinné žlázy obsahují farmakologicky aktivní látky napomáhající potlačení imunitní odpovědi hostitele (Durdan, 2002), jako antikoagulanty a vasodilatanty (Andersen et al., 2005). Klíštěcí sliny obsahují rovněž tzv. cement, který se účastní přichycení klíštěte na hostiteli. Cement uzavírá poranění vzniklé v místě kontaktu sacího ústrojí klíštěte (hypostomu) a hostitele (Gregson, 1967; Goodman et al., 2005). Další složkou slin je řada enzymů, inhibitorů a histaminů. (Sauer et al., 1995). Důležitou roli hrají slinné žlázy v obdobích mezi jednotlivými příjmy hostitelské krve, protože absorbují vodní páru ze vzduchu, kterou přetvářejí v hygroskopickou tekutinu umožňující klíšťatům zůstat hydratována a tedy přežít (Bowman et al., 2004).

Slinné žlázy jsou uloženy anteriolaterálně v těle klíštěte. Jedná se o párový orgán připomínající svým vzhledem hrozen. Skládají se z jednotlivých oválných váčků (= acinů)

spojených slinnými trubicemi, dukty. Dukty lze odlišit podle jejich velikosti na hlavní, sekundární a lobulární (terciární). Lobulární dukt je s lumen acinu spojen tzv. krátkým acinárním duktem (Balashov, 1979b). Sliny, které se vytváří ve slinných žlázách, jsou slinnými vývody odváděny do salivária. To se v těle klíštěte nachází mezi hypostomem a chelicerami. Slinné žlázy samic jsou složeny ze třech různých druhů acinů (I, II a III), každý acinus je složen z různých typů buněk a obsahuje různé druhy sekrečních váčků (Binnington, 1978), (obr. 5). Podle přítomnosti sekrečních granul lze jednotlivé typy acinů rozdělit na skupinu agranulární (aciny typu I) a granulární (aciny typu II a III), (Kaufman, 1987). Aciny samic *I. ricinus* jsou tvořeny jednou až dvěma vrstvami buněk obklopujícími lumen. Ty jsou prostřednictvím krátkého acinárního ductu připojeny k ductu lobulárnímu (Kaufman, 1987).

Slinné žlázy samců obsahují pouze dva typy acinů, a to aciny typu I a IV. Aciny typu II a III nejsou u samců přítomny. Slinné žlázy larev a nymf vykazují strukturální podobnost se slinnými žlázami dospělých klíšťat. Rozdíl je v nepřítomnosti acinů typu IV u larev (Sonenshine, 2013).

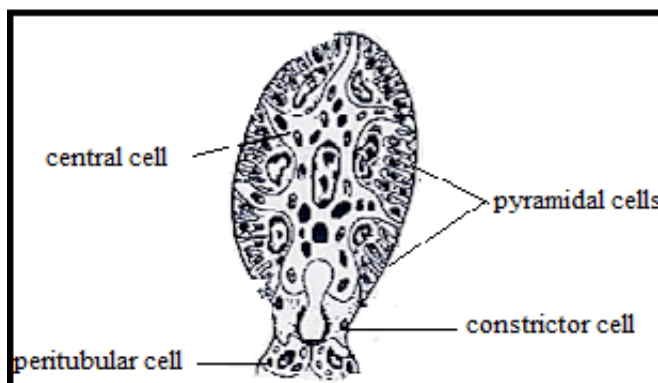


Obr. 5: Schematické znázornění slinných žláz klíšťat z čeledi *Ixodidae* (A), detail napojení acinů na dukt (B), (upraveno dle Šimo et al., 2011).

1.3.1 Aciny typu I

Aciny typu I sehrávají úlohu v absorpci vody u nesajících klíšťat (Gaede et al., 1997). V porovnání s ostatními typy acinů jsou nejmenší, neobsahují granula a jsou lokalizovány v přední části slinných žláz, kde jsou připojeny přímo k hlavnímu vývodu (Olivieri et al.,

1992). Aciny typu I jsou tvořeny čtyřmi typy buněk neobsahujících granula (velká centrální buňka a 3 druhy vnějších buněk), (obr. 6), mají výrazně vyvinutý bazální labyrint a jejich buňky obsahují velké množství mitochondrií (Sonenshine, 1991). Agranulární aciny čeledi *Ixodidae* a *Argasidae* jsou si vzájemně velmi podobné, a to nejen strukturálně, ale rovněž funkčně (Needham, Teel, 1986).



Obr. 6: Acinus typu I, upraveno dle Barker et al., 1984).

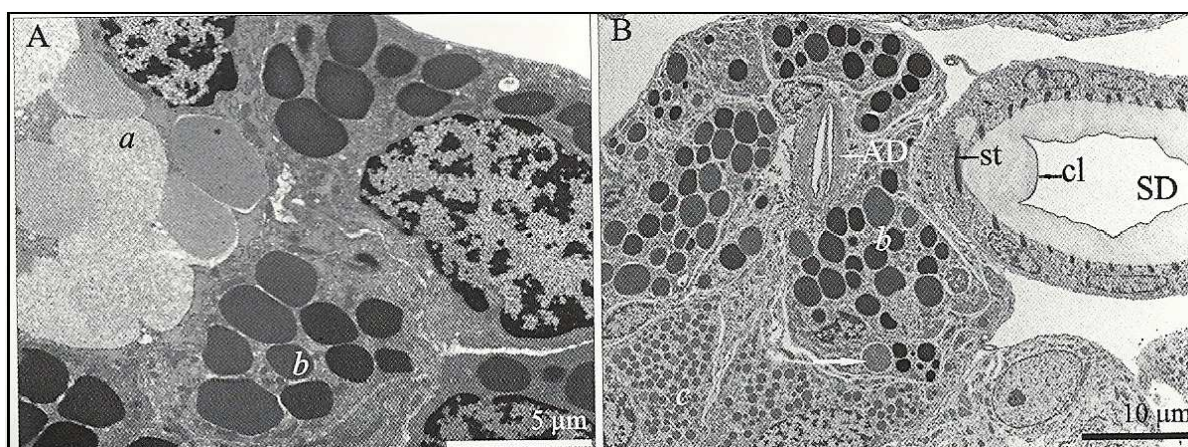
1.3.2 Aciny typu II

Aciny typu II jsou napojeny na sekundární a terciární dukty a lze je lokalizovat v přední a střední části žlázy. Mají velké množství jader a v cytoplasmě obsahují sekreční granula, která jsou umístěna u stran acinů (Olivieri et al., 1992). U nenasátých samic jsou si aciny typů II a III vzájemně velmi podobné, během sání však dochází k výrazným změnám nejen v ultrastruktuře, ale také ve fyziologii acinů II a III (Sonenshine, 1991). Aciny typu II se podílí na tvorbě cementu a pravděpodobně slouží jako zdroj antikoagulantů (Coons et al., 1988). U acinů typu II lze pomocí elektronové mikroskopie identifikovat tři typy granulárních buněk (*a*, *b*, *c*), které se liší umístěním v acinu a svou velikostí (obr. 7).

Buňky typu *a* lze lokalizovat v přední části acinu a jsou charakteristické svou značnou velikostí (více než 3 μm), díky které jsou tato granula pozorovatelná i světelným mikroskopem (Sonenshine, 1991). Granula obsahují látky podílející se na tvorbě cementu. Tyto látky jsou uvolňovány v prvních třech dnech sání na hostiteli (Kemp et al., 1982).

K buňkám typu *a* přiléhají buňky typu *b*. Ty jsou u nenasátých klíšťat méně četné než buňky *a*. Obsahují velké množství elektron-denzních středně velkých granulí (přibližně 2 μm) a dále menší granula (do 2 μm) s menší elektronovou denzitou (Vancová et al., 2006).

Buňky typu *c* lze pozorovat na straně protilehlé vývodu acinů typu II a jsou většinou nejčetnějším typem granulárních buněk (Sonenshine, 2013). Obsahují světlá granula o velikosti přibližně 400 – 700 nm a dále větší elektron-denzní granula o velikosti přibližně 2 μm (Vancová et al., 2006). U slinných žláz středně nasátých a plně nasátých samic lze rozlišit 4 podtypy *c* buněk. Jednotlivé podtypy se liší především velikostí granul a dále jejich prostupností pro primární elektrony (Walker et al., 1987).



Obr. 7: Aciny typu II. (A) Buňky typu *a* a *b* ze slinných žláz nenasátých samic klíštěte *I. ricinus*, (B) buňky typu *b* a *c* u částečně nasátých samic. AD – acinární dukt, SD – slinný vývod a jeho struktury (st – „spiral thread“, cl – „cuticular lining“). Převzato z Vancová et al., 2006).

1.3.3 Aciny typu III

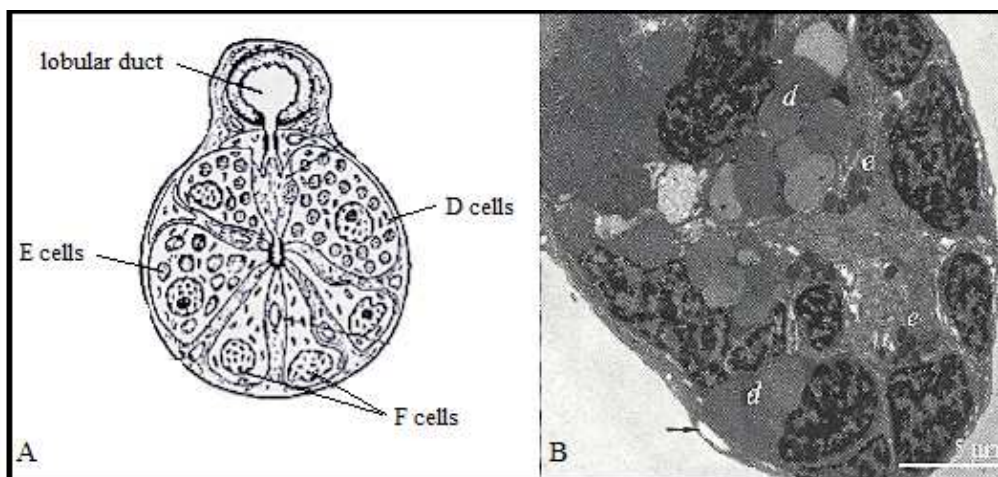
Aciny typu III jsou přítomny především v postranních částech žláz. Tento typ acinů je v porovnání s ostatními typy tvořen větším počtem buněk. Sekreční granula lze pozorovat především v části napojení acinu na dukt (obr. 8). Funkcí acinů typu III je, kromě sekrece slin, účast na osmoregulaci během sání klíštěte na hostiteli (Olivieri et al., 1992). Aciny typu III obsahují tři typy buněk (*d*, *e*, *f*), (Sauer et al., 1986).

Buňky typu *d* se podobají *a* buňkám acinů typu II. Obsahují velká granula (3 μm) složená z několika heterogenních podjednotek lišících se elektronovou denzitou (Sonenshine, 1991). Lze je lokalizovat v blízkosti acinárního ductu a jednotlivá granula jsou oddělena membránami (Fawcett et al., 1981a).

Buňky typu *e* acinů typu III obsahují malá granula (0,8 μm), která společně s *a* buňkami a *d* buňkami sekretují hlavní složky cementu, který slouží klíštěti k přichycení na hostitele (Jaworski et al., 1990).

Buňky typu *f* se vyskytují v zadní části acinů typu III, naproti acinárnímu duktu. Na rozdíl od ostatních buněk v tomto typu acinu, *f* buňky nenasátých klíšťat neobsahují granula (Fawcett et al., 1981a). Ta se objevují až po přichycení klíštěte na hostitele. Během prvních dvou dní sání dochází ke vzniku velkých granulí, jejichž sekrece následně končí a v dalších fázích sání *f* buňky granula opět neobsahují (Coons, Kaufman, 1988). Funkcí *f* buněk je sekrece vody a elektrolitů, díky které dokáže klíště vyloučit ze svého organismu přebytečnou vodu a soli a zefektivnit tak příjem krve hostitele. Tento typ buněk je charakteristický četnými záhyby plazmatické membrány (rozsáhlý bazální labyrint) s velkým množstvím mitochondrií, což je typické pro buňky transportující tekutiny (Sonenshine, 1991).

V průběhu sání dochází u obou typů acinů ke zvětšování jádra a k nárůstu cytoplasmy, což má za následek zvětšení celkového objemu slinných žláz, aniž by došlo k nárůstu počtu buněk (Sauer et al., 1995).



Obr. 8: Aciny typu III. (A) Schéma acinu typu III (*d*, *e*, *f* buňky), upraveno dle Barker et al., 1984, (B) acinus typu III u nenasátých samic *I. ricinus*, převzato z Vancová et al., 2006.

2. Cíle práce

1. Příprava imunitních sér pro imunocytochemii, izolace imunoglobulinové frakce protilátek a purifikace protilátek pomocí afinitní chromatografie.

2. Imunolokalizace izoform katepsinu L ve slinných žlázách pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

3. Materiál a metody

3.1 Příprava primárních protilátek

Primární protilátky se uplatňují v celé řadě imunochemických metod. Podstatou těchto metod je vytvoření specifických protilátek v těle obratlovců (králík, koza, prase a jiní), jejichž imunitní systém reaguje na injikovanou cizorodou látku (protein) vytvořením protilátek. Protilátky jsou poté izolovány z krevního séra v podobě imunoglobulinové frakce. Pro lepší specifitu je Ig frakci možné afinitně purifikovat. Takto získané primární protilátky jsou následně použity při lokalizacích v tkáních. Neznačené primární protilátky se specificky váží na proteiny (antigeny). K vizualizaci komplexu protein – primární protilátka se používá značená protilátka sekundární, která je druhově specifická vůči protilátkám primárním. Sekundární protilátku je možné vizualizovat s pomocí enzymatických barevných reakcí, fluorescence, chemiluminiscence, radioizotopového značení, popřípadě těžkými kovy.

3.1.1 Chov klíšťat *Ixodes ricinus*

Klíšťata, která byla použita pro následující pokusy, byla sbírána metodou vylajování v Branišovském lese poblíž Českých Budějovic a umístěna v laboratorním chovu Parazitologického ústavu Akademie věd ČR. Samice klíšťat byly uchovány ve skleněných nádobách s vlhkostí 95 %, při konstantní teplotě 26 °C. Pro následující pokusy bylo použito dospělých samic klíšťat, které sály na laboratorních morčatech, na kterých byla klíšťata upevněna pomocí pryžových kloboučků (obr. 9). S laboratorními zvířaty bylo zacházeno dle zákona 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání.



Obr. 9: Strojení morčat pro sání klíšťat v laboratorním chovu Parazitologického ústavu v Českých Budějovicích. (A-C) Jan Erhart, (D) Jana Schrenková).

3.1.2 Příprava imunních sér

K přípravě primárních protilátek proti testovaným peptidázám (IrCL1, IrCL3) bylo použito laboratorních králíků, kteří byli imunizováni rekombinantními proteiny. Tyto proteiny byly získány expresí v *E. coli* (Sojka et al., 2007, Franta et al., nepublikováno). Získané sérum bylo využito pro purifikaci specifických protilátek.

3.1.3 Příprava imunoglobulinové frakce

Imunoglobulinová frakce byla získána vysrážením ze séra naimunizovaného králíka pomocí kyseliny kaprylové. Za stálého míchání byl smíchán jeden díl séra se dvěma díly 50 mM Na-acetátového pufru, pH 4,0. Do směsi séra a Na-acetátového pufru byla postupně přimíchávána kyselina kaprylová v dávkách 25 μ l na jeden mililitr směsi, kdy jednotlivé přídavky kyseliny byly od sebe oddělené 2-5 minutami. Ke srážení docházelo po dobu hodiny a půl v chladové místnosti, které bylo následováno centrifugací směsi při 5000 rpm v trvání 10 minut. Směs byla poté přefiltrována přes filtrační papír a získaný supernatant

dialyzován přes noc v chladové místnosti proti 2L 5mM Na₂HPO₄. Frakce protilátek byla zakonzervována přidáním azidu sodného o výsledné koncentraci 0,02 %. Při práci s azidem sodným bylo přihlédnuto ke skutečnosti, že se jedná o nebezpečný jed. Pro určení koncentrace protilátek bylo použito metody podle Bradfordové (Bradford, 1976). Kalibrační křivka byla změřena pomocí hovězího sérum albuminu. Jako blank bylo použito 500 µl Bradford činidla a 50 µl dialyzačního roztoku. Tento blank neobsahující Ig frakci byl fotometricky porovnán s vzorkem tvořeným 500 µl Bradford média, 40 µl dialyzačního roztoku a 10 µl Ig frakce. Hodnota byla vynásobena pěti, aby bylo přihlédnuto k použitému ředění frakce protilátek.

3.1.4 Purifikace protilátek pomocí afinitní chromatografie

Ačkoli byl králík předem naimunizován požadovaným rekombinantním proteinem, není možné vyloučit, že se během svého života nesetkal s antigenem jiným a tudíž že imunoglobulinová frakce neobsahuje zároveň jiné než požadované protilátky. Z tohoto důvodu byly protilátky afinitně purifikované, čímž se zvýšila jejich specifita a potlačila nežádoucí křížná reaktivita. Podstatou metody je navázání specifických protilátek na rekombinantní protein (antigen) a tedy jejich separace od ostatních protilátek.

3.1.4.1 Příprava rozpustných rekombinantních proteinů

Roztok obsahující rekombinantní proteiny, 8 M močovinu a 125 mM imidazol o pH 8,5 byl nalit do dialyzačního střívka, utěsněn svorkami a přenesen do pufru A (4 M močovina, 150 mM NaCl, 100 mM NaHCO₃, 10 mM merkptoetanol a 20% glycerol, pH upraveno pomocí kyseliny chlorovodíkové na pH 8,5). Postupné promývání vzorku pufru slouží k vymytí močoviny a imidazolu z roztoku proteinů. Dialyzační střívko s proteiny bylo v pufru A ponecháno přes noc (10 – 12 hodin) na míchadle v chladové místnosti. Po uplynutí stanovené doby byla polovina objemu pufru A nahrazena pufrem B1, který byl připraven smícháním 0,5 M NaCl, 100 mM NaHCO₃ 10 mM merkptoeanolu a 10% glycerolu, pH 8,3. Po přibližně osmi hodinách byla polovina pufru (A + B1, 1:1) nahrazena pufrem B2, který

byl složen z 0,5 M NaCl, 100 mM NaHCO₃, pH 8,3. Ve směsi pufrů bylo střívko s proteiny ponecháno přes noc na míchadle v chladové místnosti. Následující den bylo vyměněno dialyzační střívko z důvodu zneprůchodnění pórů glycerolem, který byl obsažen v pufrch, a umístěno do pufru B2. Po přibližně osmi hodinách byl roztok proteinů z dialyzačního střívka centrifugován po dobu 10 minut při 5500 rpm a zmražen na -80 °C.

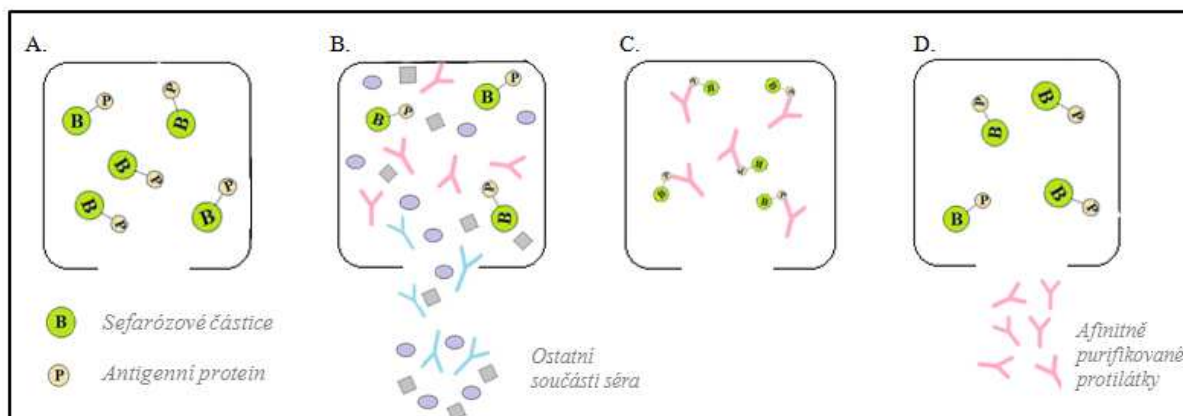
Po rozmrazení byl vzorek centrifugován (10 minut, 5500 rpm) a v získaném supernatantu byla změřena koncentrace refoldovaných rozpustných proteinů pomocí Bradford činidla.

3.1.4.2 Navázání rekombinantních proteinů na sorbent

0,5 g lyofilizovaných CNBr- aktivovaných sefarózových částic 4B (GE Healthcare) bylo 30 minut mícháno plastovou lžící s 20 ml 1 mM HCl, kdy došlo k nabobtnání sefarózových částic. Poté byly částice 15 minut promývány s 480 ml 1mM HCl na skleněné fritě v Erlenmeyerově baňce se vzduchovou vývěvou. Částice byly poté promyty 100 ml vazebného pufru B2, přemístěny z frity a smíchány s roztokem rekombinantních proteinů v poměru 1:1. Vzniklá směs byla ponechána na míchadle při pokojové teplotě. Po uplynutí dvou hodin byla směs sefarózových částic a rekombinantních proteinů centrifugována 5 minut při 4000 rpm. Do vzniklého peletu bylo přidáno 10 ml blokovacího činidla z 0,2 M glycinu (pH 8,0, 4°C, 16 hodin). Blokovací médium zajistilo inaktivaci aktivních skupin sefarózy, na které se další proteiny nemohly navázat. U supernatantu byla změřena koncentrace proteinů dle Bradfordové, jejímž cílem bylo potvrzení účinnosti navázání rekombinantních proteinů na částice (obr. 10A). Pro katepsin L1 byla zaznamenána nulová koncentrace navázaných proteinů, pro katepsin L3 koncentrace 19 µg/ml (v ideálním případě mají být koncentrace navázaných proteinů nulové). Následně byl pelet rozsuspendován v 30 ml pufru B2. Sefarózové částice byly poté střídavě promývány přes fritu s 50 ml pufrů B2 a B3 (0,5 M NaCl a 0,1 M octan amonný, pH 4). Promývání probíhalo v pěti krocích. Sefarózové částice s proteiny byly následně resuspendovány a smyty z frity pomocí sterilního PBS (8 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 2,9 g Na₂HPO₄ · 12H₂O a 0,2 g KCl. Chemikálie byly smíchány, doplněny do objemu 1 litr destilovanou vodou a autoklávovány).

3.1.4.3 Afinitní purifikace

Následně byla v chladové místnosti imunoglobulinová frakce (18 ml) smíchána v poměru 1:2 se sterilním PBS a kolona obsahující sefarózové částice 10 minut promývána fosfátovým pufrém (přibližně 50 ml). Poté bylo PBS nahrazeno IgG frakcí a vazba protilátek na rekombinantní antigen probíhala při pomalém průtoku (100 μ l/min) po dobu 6 hodin, (obr. 10C). Nezachycená, tzv. „flow through“ (FT) frakce byla jímána a uschována pro následující kontrolu (10B). Poté byla kolona opět promyta sterilním PBS (přibližně 50 ml). Poté byly navázané protilátky eluovány kyselým elučním pufrém B4 (0,15 M NaCl a 0,2 M glycin, pH 2,2), (obr. 10D). Průběh chromatografie byl monitorován pomocí UV monitoru při vlnové délce 280 nm. Frakce vytékající z kolony byly jímány do zkumavek v přibližně pětiminutových intervalech a okamžitě neutralizovány roztokem 1 M Tris-base na pH 7-8. Následovalo promytí kolony sterilním PBS (10 minut) obsahujícím 0,02% azid sodný. Koncentrace protilátek jednotlivých frakcí byla změřena dle Bradfordové a frakce s nejvyšším obsahem protilátek smíchány a zakonzervovány 0,02% azidem sodným.



Obr. 10: Schéma afinitní purifikace protilátek. (A) Sefarózové částice s navázaným rekombinantním proteinem; (B) Imunoglobulinová frakce protilátek nanesena na kolonu s navázaným rekombinantním proteinem; (C) odmytí nespecifických protilátek; (D) vyzvání specifických protilátek.

3.1.5 Ověření specifity protilátek na střevním homogenátu

Specifita protilátek byla ověřena pomocí Western Blotu (Towbin, 1979) na střevních homogenátech klíšťat, protože přítomnost katepsinu L1, resp. L3 ve střevech byla ověřena již dříve (Franta et al., 2011; Konvičková, 2012). Cílem Western Blotu bylo tedy

pouze ověření kvality protilátek, nikoli přítomnosti peptidáz ve vzorku. Šest střev z polonasátých samic bylo homogenizováno se 150 μ l 5x koncentrovaného vzorkového pufru s dithiothreitem (DTT) v poměru 12,5 mg DTT (32 mM DTT, 0,25 % (w/v) bromfenolová modř) na 500 μ l vzorkového pufru (0,75 M Tris/HCl, pH 6,8, 5 % SDS, 50% (v/v) glycerol) a vařeno 15 minut při 100 °C. Směs byla doplněna destilovanou vodou na objem 600 μ l a centrifugována 5 minut při 13 300 rpm. Supernatant byl rozaliquotován, zmrazen při -20 °C a uchován pro následnou elektroforézu.

Elektroforéza probíhala v elektroforetickém pufru po dobu přibližně jedné hodiny (15 minut 100 V, poté 45 minut 200 V). Elektroforetický pufr obsahoval 25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1 % SDS. Marker LMW (Low Molecular Weight Electrophoresis Calibration Kit, GE Healthcare) složený z 2 μ g LMW, 80 μ l destilované vody a 20 μ l DTT byl povařen při 100 °C přibližně 5 minut. Každého vzorku (včetně markeru) bylo použito 15 μ l. Gelovou elektroforézou bylo docíleno rozdělení proteinů obsažených ve střevním homogenátu na základě odlišné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli, který je dán rozdílnou molekulovou hmotností jednotlivých proteinů (Laemmli, 1970). V polyakrylamidovém gelu tak proteiny vytvořily tzv. zóny (bandy).

Následně byly rozdělené proteiny elektroforeticky přeneseny z gelu na povrch polyvinylidenfluoridové (PVDF) membrány (Imobilon), která byla předem aktivována metanolem. Přenos probíhal po dobu 120 minut za konstantního proudu 150 mA. Blotovací pufr byl připraven z 0,125 M Trisu, 0,96 M glycinu, 20 % metanolu a 0,1 % (w/v) SDS.

Část membrány s markerem byla obarvena pomocí Coomassie Brilliant Blue R-250. (0,05 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) kyselina octová). Došlo tak ke zviditelnění polohy bílkovin v markeru, membrána byla ponechána v roztoku barviva po dobu 5 minut a následně odbarvena odbarvovacím roztokem (25 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) kyselina octová), (Fox, 1987).

Pro detekci proteinů specifickými protilátkami bylo třeba povrch membrány tzv. zablokovat inertním proteinem, protože povrch membrány váže jak antigen, tak i protilátky. Nеспецифická místa byla zablokována 5 % netučným mlékem v 1x PBS s přídatkem 0,05 % detergentu Tween 20. V tomto kroku došlo k navázání mléčného kaseinu na všechna místa, kam se zatím nenavázaly proteiny z gelu. Proto se později molekuly imunoglobulinů nemohou nespecificky navázat na povrch membrány, ale pouze na specifické epitopy na přebloťovaných antigenech. Došlo tak k výraznému snížení šumu pozadí a k vyloučení falešné pozitivitu.

Pro identifikaci námi hledaných proteinů (katepsin L1, katepsin L3) bylo použito

jednak specifických protilátek proti těmto proteinům (Ab), imunoglobulinové frakce protilátek (IgG) a flow through (FT) v různých koncentracích (tab. I). Inkubace probíhala přes noc na výkyvném míchadle v 5 % mléce v PBS-T.

Tab. I: Ředění primárních protilátek.

peptidáza	Zdroj protilátek	Koncentrace protilátek [$\mu\text{g/ml}$]	Ředění	Výsledná konc. protilátek [$\mu\text{g/ml}$]
katepsin L1	IgG	208	1:100	2,08
	FT	196	1:50	3,92
	Ab	70	1:10	7,0
katepsin L3	IgG	227	1:100	2,27
	FT	189	1:50	3,78
	Ab	190	1:25	7,6

Po uplynutí doby inkubace byla membrána promyta 2 x 5 minut v PBS-T a přenesena do roztoku sekundární protilátky proti králičím proteinům (SwAR/Px, Sevapharma a.s.), která se váže na primární protilátky a která je konjugována s enzymem peroxidásou umožňujícím vizualizaci. Inkubace sekundární protilátkou zředěnou v koncentraci 1 : 1000 v PBS-T probíhala po dobu jedné hodiny a byla následována promytím membrány 2 x 5 minut v PBS-T.

Vyvolání probíhalo ve 100 mM Tris/HCl (pH 7,5) s přidavkem diamidobenzidinu (na 50 ml Tris/HCl přibližně 10 mg diaminobenzidinu) a 50 μl 30 % peroxidu vodíku.

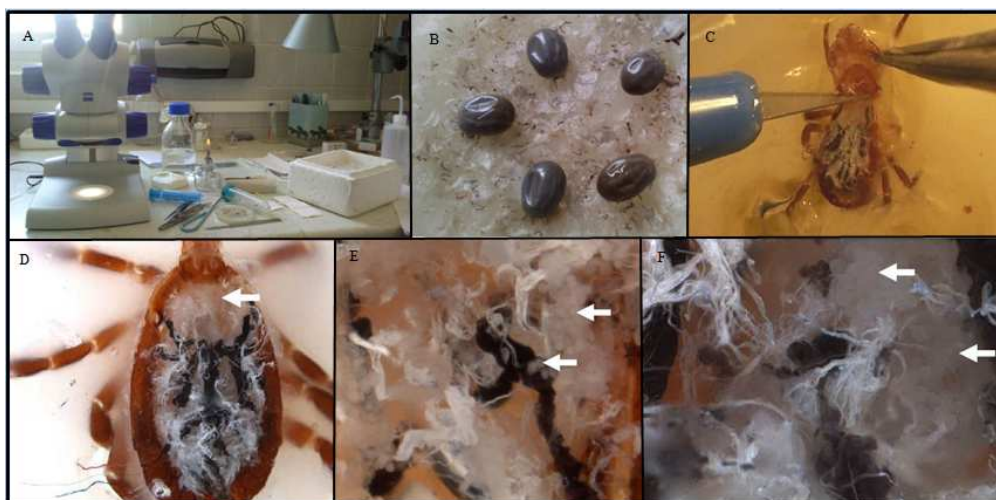
3.1.6 Ověření přítomnosti trávicích peptidáz ve slinných žlázách

Po ověření specifity protilátek bylo přistoupeno ke zjištění přítomnosti trávicích peptidáz (IrCL1, IrCL3) ve slinných žlázách klíštěte *I. ricinus*. Western blot byl proveden na vzorku extraktu slinných žláz klíšťat (SGE) krmených 7 dní na neimunizovaných morčatech, kdy obsah proteinů byl 818 $\mu\text{g/ml}$. Při pokusu se postupovalo analogicky jako při Western blotu na střevním homogenátu. Koncentrace primárních protilátek proti katepsinu L1 (IrCL1) byla 1,4 $\mu\text{g/ml}$ a proti katepsinu L3 (IrCL3) 3,8 $\mu\text{g/ml}$.

3.2 Imunolokalizace peptidáz na kryo řezech

3.2.1 Příprava vzorků pro elektronovou mikroskopii

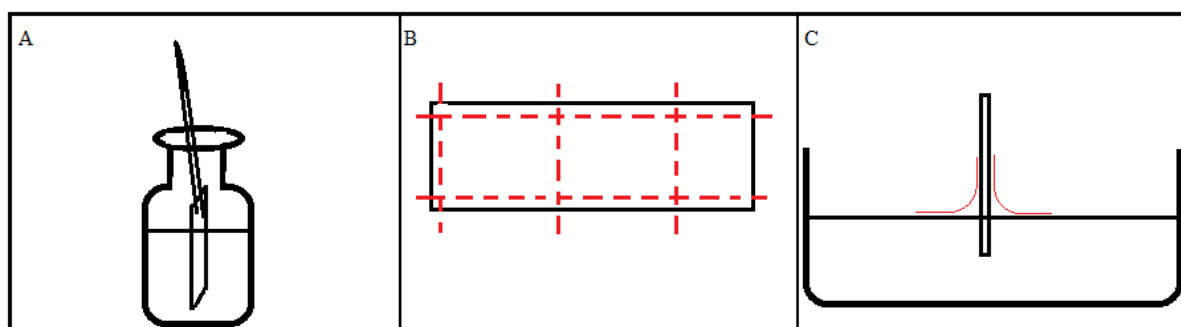
Slinné žlázy klíšťat, použité pro následující pokusy, byly pitvány v různých časových intervalech (klíšťata 3 dny sající, 6 dní sající a plně nasátá). Pro lepší manipulaci byly samice přichyceny na Petriho misce naplněné voskem a pitvány v PBS pod binokulárním mikroskopem (obr. 11A,B). S pomocí nůžek a pinzet byla vždy odstraněna posteriorní kutikula, čímž došlo k odhalení vnitřních orgánů klíšťat (obr. 11C). Část slinných žláz (obr. 11D,E) byla promyta v PBS a nasucho zmrazena v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro pozdější pokusy (2 x 19 žláz třídných klíšťat, 2 x 14 žláz šestidenních klíšťat a 2 x 15 žláz plně nasátých klíšťat). Zbylé žlázy byly vypitvány a fixovány roztokem připraveným ze 4 % formaldehydu a 0,1 % glutaraldehydu v 0,1 M Na-fosfátovém pufru, pH 7,2-7,4. Formaldehyd byl připraven depolymerizací paraformaldehydu. Paraformaldehyd byl smísen s destilovanou vodou a roztok byl ohřát přibližně na teplotu $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, zákal byl vyčeřen pomocí NaOH. Po zchlazení byl do roztoku přidán fosfátový pufr a glutaraldehyd. Fixace probíhala na rotační míchačce při pokojové teplotě po dobu dvou hodin. Po ukončení fixace byl fixační roztok odstraněn a nahrazen. Toho bylo dosaženo vymýváním vzorků v 0,1 M fosfátovém pufru s 0,01 M glycinem (3 x 10 minut). Následně byly vzorky přeneseny do 2,3 M sacharózy, kterou byly slinné žlázy syceny po dobu následujících 2-4 dnů při teplotě 4°C .



Obr. 11: Pitva klíšťat, šipky znázorňují slinné žlázy. (A, B) Schrenková; (C-F) upraveno dle Edwards et al., 2009).

Po uplynutí stanovené doby byly vzorky pinzetou přeneseny na kovové piny, přebytečná sacharóza byla odsáta pomocí filtračního papíru a vzorky byly ponořeny do tekutého dusíku, kde byly uchovány a připraveny pro další zpracování.

Před samotným krájením bylo potřeba připravit síťky, které v elektronové mikroskopii slouží k manipulaci s ultratenkými řezy. Niklové síťky promyté 100 % acetonem byly kladeny na formvarovou blánu. Formvarová blána byla připravena ponořením krycího sklíčka do 0,3 % formvaru v chloroformu (obr. 12A). Po uplynutí jedné minuty bylo sklíčko opatrně vyňato z roztoku a s pomocí diamantového hrotu byla blána na povrchu sklíčka rozkrájena tak, aby se během splavování uvolnila na vodní hladinu (obr. 12B). Poté bylo sklíčko ponořeno do odstáté destilované vody pod úhlem 90° a obě blány (z každé strany sklíčka jedna) byly splaveny na hladinu destilované vody (obr. 12C). Na blány byly kladeny síťky a pomocí parafilmu došlo k vyzvednutí blány se síťkami z vodní hladiny. Následně byly síťky pouhlikovány (JEOL – JEE 4C).



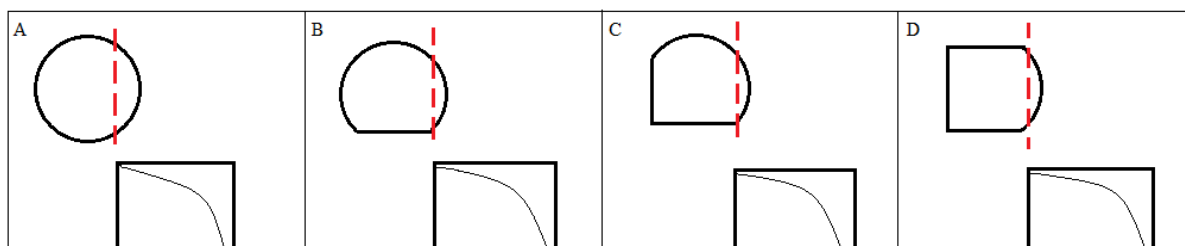
Obr. 12: Schéma přípravy formvarové blány. (A) ponoření sklíčka do roztoku formvaru, (B) nakrojení blány diamantovým hrotem; (C) splavování formvarové blány.

Krájení preparátů probíhalo na ultramikrotomu LEICA UCT 6 vybaveného kryokomorou v tekutém dusíku. Prvním krokem při krájení ultratenkých řezů byla úprava vzorku na požadovaný tvar, tzv. trimování. Cílem trimování je příprava délky řezné plochy na velikost do 250 μm . Čelní strana vzorku byla skrojena do tvaru čtverce či obdélníku (v závislosti na tvaru preparátu). Trimování je potřeba provádět precizně a s co možná největší přesností. Díky pravidelnému tvaru řezné plochy se při následném krájení jednotlivé řezy neoddělují, ale skládají se do pásky, kterou je snazší přenést na síťku a minimalizovat tak nebezpečí poškození řezů transportem z kryokomory (obr. 13).



Obr. 13: Ultratenké řezy skrajující se ve formě pásky.

Trimování probíhalo při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ s pomocí skleněného nože. Během trimování jsou odkrajovány nepotřebné části vzorků, proto bylo možné celý proces urychlit odkrajováním silnějších řezů (500 nm), (obr. 14A-D). Skleněné nože byly připraveny z odmaštěných skleněných plátů metodou rovnovážného lámání (Hagler, 2007). Při této metodě je na sklo vyvíjen takový tlak, aby k odlomení skla v místě vrypu diamantem došlo po uplynutí přibližně 3 minut. Po dosažení optimálního tvaru řezné plochy vzorku byl skleněný nůž vyměněn za nůž diamantový a zmrazené žlázy byly krájeny při teplotě $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při krájení bylo používáno anti-statické zařízení (Leica EM UC 6), které odvádělo nežádoucí elektrostatický náboj, čímž se výrazně usnadnila manipulace s kryořezy. Jednotlivé vzorky byly krájeny na přibližně 80 - 100 nm modře se lesknoucí řezy. Kryořezy byly z kryokomory přeneseny kličkou o průměru 2 mm ponořené do roztoku z 1% metylcelulózy a 1,15 M sacharózy na 3 mm niklové síťky. Roztok 2 % metylcelulózy byl připraven z práškové metylcelulózy a destilované vody smíchané v požadovaném poměru a míchán přes noc při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následující den byl roztok centrifugován 1 hodinu při 14 000 rpm a teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 14: Schéma trimování vzorku. (A-D) V každém kroku otočení preparátu o úhel 90°.

3.2.2 Lokalizace trávicích peptidáz

Z kryorezů bylo nejdříve zapotřebí odmyt ochrannou vrstvu 1 % metylcelulózy s 1,15 M sacharózou. Síťky byly přenášeny s pomocí kličky o průměru 3 mm. Vymývání metylcelulózy / sacharózy probíhalo na ledě, kdy byla každá síťka promývána destilovanou vodou 3 x 10 minut. Po odmytí metylcelulózy / sacharózy došlo k obnažení kryorezů, které musely být až do opětovného zalití do roztoku metylcelulózy na konci pokusu drženy ve vlhkém prostředí, aby nedošlo k jejich poškození a ke vzniku artefaktů. K vyblokování nespecifických vazeb bylo použito blokovacího roztoku, který byl připraven z 1 % BSA v 0,01 M PBS-T (0,05 % Tween 20) a přefiltrován přes 45 µm filtr (Millex®). Poté byl roztok smíchán s 5 % netučným sušeným mlékem (Biotechnology, Santa-Cruz). Blokování probíhalo 1 hodinu při pokojové teplotě. Primární protilátky proti katepsinu L1 byly ředěny v poměru 1 : 2 (35 µg/ml) a protilátky proti katepsinu L3 v poměru 1 : 4 (47,5 µg/ml) v 0,5 % BSA v PBS. Slinné žlázy z různě nasátých klíšťat (tři dny sajících, 6 dní sajících, resp. plně nasátých klíšťat) byly inkubovány 3,5 hodiny odděleně s oběma typy protilátek a zároveň byla provedena kontrola, kdy byla primární protilátka nahrazena PBS-T.

Po uplynutí dané doby byly primární protilátky vymyty přenesením sítěk na další kapky PBS-T a 6 x 5 minut promývány. Následně byly vzorky přeneseny do roztoku sekundární protilátky, který obsahoval zlaté nanočástice (10 nm) konjugované s proteinem A (pA10, Aurion, Nizozemí) v 0,5 % BSA v PBS v poměru 1 : 40. O hodinu později byly vzorky opět promyty 6 x 5 minut v PBS-T a přeneseny na led, kde byly promyty 3 x 10 minut destilovanou vodou. Vzorky byly přeneseny do 3 % vodného uranylu, který byl přefiltrován přes 45 µm filtr a smíchán s 2 % metylcelulózą v poměru 1 : 9. Jednotlivé síťky se vzorky byly v roztoku uranylu inkubovány po dobu 30 s + 30 s + 10 minut při 4 °C

(3 x výměna roztoku). Po uplynutí stanovené doby byly sítě sebrány z roztoku uranylu a metylcelulózy pomocí klíčky o průměru 3,5 mm. Odsátím přebytečného roztoku pomocí filtračního papíru došlo k vytvoření tenké metylcelulózkové vrstvy na povrchu sítěk, která zabránila vysychání řezů. Po uschnutí filmu byly sítě opatrně odděleny od klíček a takto připravené vzorky byly následně pozorovány pod transmisním elektronovým mikroskopem.

Pozorování a vyhodnocování zmrazených preparátů probíhalo na transmisním elektronovém mikroskopu (JEOL 1010 a JEOL 2100), vybaveném CCD kamerou. Při pozorování byly anti-kontaminační clony elektronového mikroskopu chlazeny tekutým dusíkem. Díky tomu byly chráněny ostatní součásti mikroskopu před kontaminací látkami, které se vypařují z hydratovaných roztátých kryořezů.

Snímky pořízené pod elektronovým mikroskopem byly vyhodnoceny pomocí softwaru JEOL Standard TEM, Soft Imaging System. Ten byl využit rovněž ke statistické analýze výsledků, protože software mimo jiné umožňuje měřit obsah ploch s přihlédnutím k použitému zvětšení. Plocha granul (μm^2) a počet zlatých nanočástic umožnil stanovit a porovnávat přítomnost katepsinů v granulích v různých fázích sání klíštěte na hostiteli (počet částic/celkový obsah ploch).

Fotky slinných žláz, pořízené pod elektronovým mikroskopem, a prezentované v této diplomové práci, byly upraveny ve volně dostupném programu Image J (Image Processing and Analysis in Java).

4. Výsledky a diskuze

4.1 Příprava imunitních sér pro imunocytochemii, izolace Ig frakce protilátek a purifikace protilátek pomocí afinitní chromatografie

Prvním cílem této diplomové práce byla příprava protilátek proti trávicím peptidázám, katepsinu L1 a L3, pomocí afinitní purifikace. Získané protilátky byly využity při lokalizaci katepsinů ve slinných žlázách klíštěte *I. ricinus*.

Sérum králíka imunizovaného rekombinantními proteiny bylo použito jako základní materiál pro získání protilátek. Nejdříve byla vyizolována imunoglobulinová frakce s koncentrací protilátek 208 $\mu\text{g/ml}$ pro katepsin L1 a 227 $\mu\text{g/ml}$ pro katepsin L3. Specifické protilátky byly získány pomocí afinitní chromatografie. Výsledná koncentrace protilátek proti katepsinu L1 byla 70 $\mu\text{g/ml}$ a protilátek proti katepsinu L3 190 $\mu\text{g/ml}$.

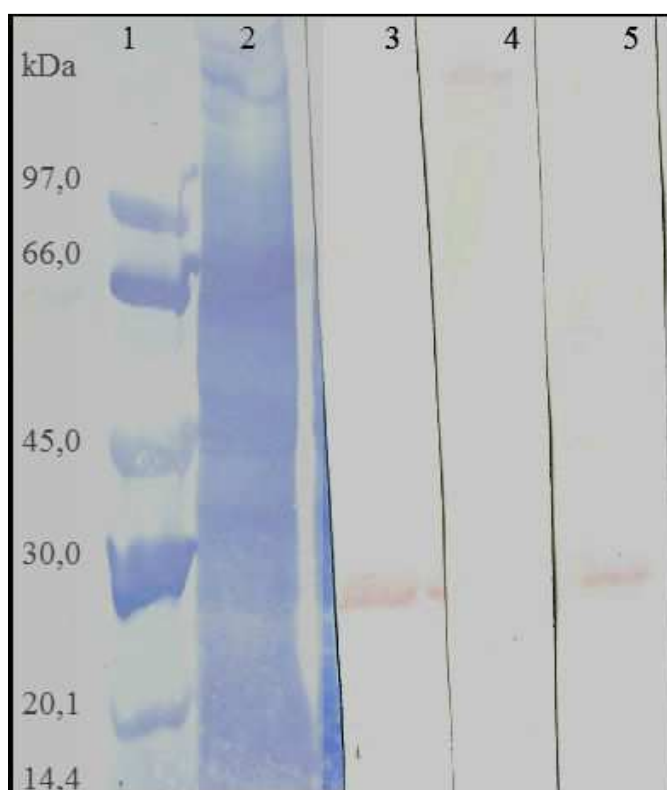
Vzhledem k složitosti celé metody a k možnosti nesprávné izolace a separace protilátek, bylo třeba ověřit jejich kvalitu a tedy i správnost celé metody. K těmto účelům byla využita metoda Western blot, která byla provedena na střevním homogenátu samic, protože přítomnost obou peptidáz ve střevech byla potvrzena v předchozích studiích, a tedy sloužila pouze k potvrzení funkčnosti a čistoty protilátek, nikoli k identifikaci proteáz v daných tkáních. Cílem metody bylo jednak stanovení čistoty protilátek, dále pak potvrzení dokonalého oddělení specifických protilátek od protilátek ostatních a nakonec potvrzení hypotézy, že v imunoglobulinové frakci byly přítomny nejen protilátky proti námi hledaným antigenům, které byly úspěšně vyseparovány, ale také protilátky, které vytvořil imunitní systém králíka bez ohledu na jeho imunizaci.

Z výsledku pokusu (obr. 15) je patrné, že při získání a přečišťování protilátek proti katepsinu L1 bylo dosaženo očekávaných výsledků. Ačkoli imunoglobulinová frakce obsahovala v nejvyšší míře protilátky proti katepsinu L1, byly zde rovněž přítomny i protilátky další, byť ve výrazně nižších koncentracích. To vede k závěru, že byla afinitní purifikace vhodnou metodou k dosažení maximální možné specifity protilátek, a tedy i k co nejkvalitnějším a nejrelevantnějším výsledkům při následujících pokusech na slinných žlázách.

Rovněž bylo potvrzeno, že specifické protilátky proti katepsinu L1 byly úspěšně

vymyty z imunoglobulinové frakce. To je patrné z nepřítomnosti bandu v oblasti, kde by byl katepsin L1 očekáván (28 kDa). Zároveň tak bylo potvrzeno, že během metody nedošlo ke snížení koncentrace specifických protilátek, ale všechny byly zachyceny na sefárové nosiče.

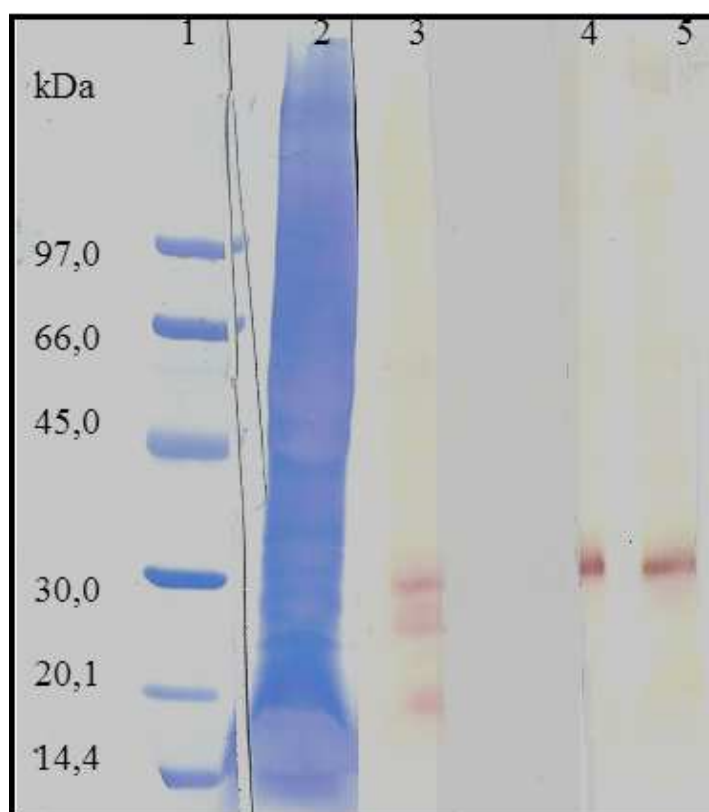
Na závěr byla ověřena specifita již přečištěných protilátek proti katepsinu L1. Ze získaného výsledku je možné dojít k závěru, že protilátky byly úspěšně separovány z frakce imunoglobulinů a že nedošlo k výraznému poklesu jejich koncentrace. Takto připravené protilátky proti katepsinu L1 byly připraveny pro další pokusy na slinných žlázách různě nasátých klíšťat.



Obr. 15: Katepsin L1 (IrCL1) ve střevním homogenátu klíštěte *I. ricinus*. (1) LMW marker; (2) profil proteinů střevního homogenátu; (3) Imunoglobulinová frakce; (4) Flow through; (5) specifické protilátky.

Obdobným způsobem bylo postupováno při purifikaci protilátek proti katepsinu L3. Rozdíl spočíval pouze v rozdílném ředění použitých vzorků vzhledem k rozdílným koncentracím protilátek proti oběma katepsinům.

Z výsledků je patrné, že imunoglobulinová frakce protilátek obsahovala i jiné, než námi hledané protilátky (IrCL3), které byly během purifikace úspěšně odděleny od protilátek specifických (obr. 16).

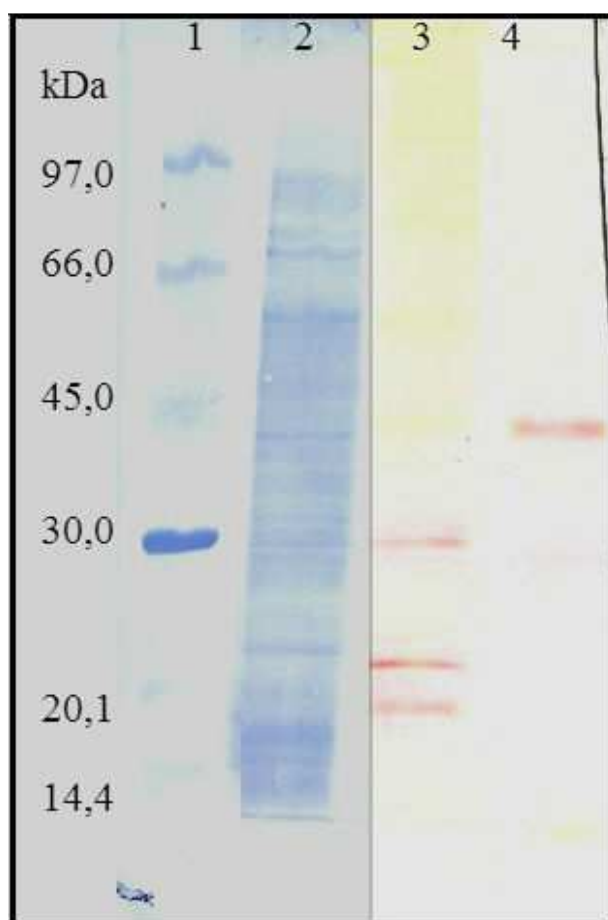


Obr. 16: Katepsin L3 (IrCL3) ve střevním homogenátu klíštěte *I. ricinus*. (1) LMW marker; (2) profil proteinů střevního homogenátu; (3) Imunoglobulinová frakce; (4) Flow through; (5) specifické protilátky.

4.2 Imunolokalizace izoform katepsinu L ve slinných žlázách pomocí transmisní elektronové mikroskopie

Dalším cílem této diplomové práce byla lokalizace katepsinu L1, resp. L3 ve slinných žlázách klíšťat *I. ricinus* v průběhu sání pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Nejdříve bylo potřeba ověřit přítomnost výše zmíněných peptidáz ve slinných žlázách klíšťat. K tomuto účelu byly použity afinitně přečištěné protilátky získané v předchozích pokusech. Ačkoli bylo použito opět metody Western blot, jejím cílem nebylo tentokrát ověření specifity protilátek, ale s pomocí protilátek potvrdit přítomnost katepsinu L1 (IrCL1) a L3 (IrCL3) ve slinných žlázách. Z výsledků je patrné, že obě izoformy

katepsinu L jsou ve slinných žlázách přítomné. Katepsin L1 (IrCL1) je zde ve formě aktivního enzymu (28 kDa) společně se štěpnými produkty o nižší molekulové hmotnosti (obr. 17.3). Katepsin L3 je ve slinných žlázách klíštěte přítomen převážně ve formě proenzymu, o čemž svědčí band o velikosti přibližně 40 kDa (obr. 17.4). Vzhledem ke skutečnosti, že v následujících pokusech byly obě peptidázy lokalizovány ve slinných žlázách v různých stádiích sání klíštěte na hostiteli, bude vhodné použít homogenáty slinných žláz získané v těchto fázích sání a pomocí metody Westen Blot určit koncentrace obou peptidáz v průběhu sání.



Obr. 17: Katepsiny L1 (IrCL1) a L3 (IrCL3) ve slinných žlázách klíštěte *I. ricinus*. (1) LMW marker; (2) profil proteinů slinných žláz; (3) katepsin L1 (IrCL1); (4) katepsin L3 (IcCL3).

Po ověření přítomnosti obou izoform katepsinu L ve slinných žlázách klíštěte bylo přistoupeno k lokalizaci katepsinu L1, resp. L3 ve slinných žlázách. Přítomnost obou proteáz byla očekávána v okrajových částech acinů typu III a v celém objemu acinů typu II.

Hypotéza vycházela ze skutečnosti, že právě v těchto částech slinných žláz jsou přítomna sekreční granula (Sonenshine, 1991).

Při přípravě preparátů pro elektronovou transmisní mikroskopii bylo využito metody značení řezů na roztátých kryořezech, která byla nazvána podle svého objevitele profesora Tokuyasuho (Tokuyashu, 1973) a u které byl později změněn způsob sbírání kryořezů (Liou et al., 1996). Oproti klasickému způsobu přípravy vzorků vhodných pro imunolokalizaci, kde se preparáty zalévají do pryskyřic (LR-White a jiné), kryometodami lze vzorky zachovat blíže nativnímu stavu, a to bez přísad cizorodých látek, jakými jsou například organická rozpouštědla sloužící k odvodnění vzorků. Jediným potenciálním denaturačním krokem je tedy fixace. Díky šetrnější přípravě vzorků jsou (ve srovnání s materiály zalitými do pryskyřic) nejen lépe zachovány antigeny, ale také je větší penetrace primárních i sekundárních protilátek s navázanými zlatými nanočásticemi (Kellenberger et al., 1987). Kryometody zažívají v současnosti velký rozvoj a jsou stále častěji používány při přípravách preparátů pro biologickou elektronovou mikroskopii. Zároveň se však jedná o velice náročnou metodu, která musí být prováděna s naprostou precizností a s dostatečnými zkušenostmi. Pokud tomu tak není, dochází k poškození vzorků, ke vzniku artefaktů a ke zkreslení výsledků.

Předpokladem pro úspěšné zmrazení preparátu a pro minimalizaci škod při mrazení je nutná dostatečně vysoká chladicí rychlost. Pokud chladicí rychlost nedosáhne hranice mezi $10^4 - 10^6 \text{ K/s}^{-1}$, dochází k poškození vzorku a ke vzniku artefaktů (Battersby et al., 1994). Ty jsou způsobeny především vznikem krystalů vody v nesprávně zmrazených nebo opětovně rozmrazených preparátech a vedou k poškození ultrastruktury kryořezů. Proto nesmí zmrazené preparáty přijít do teplot převyšujících $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

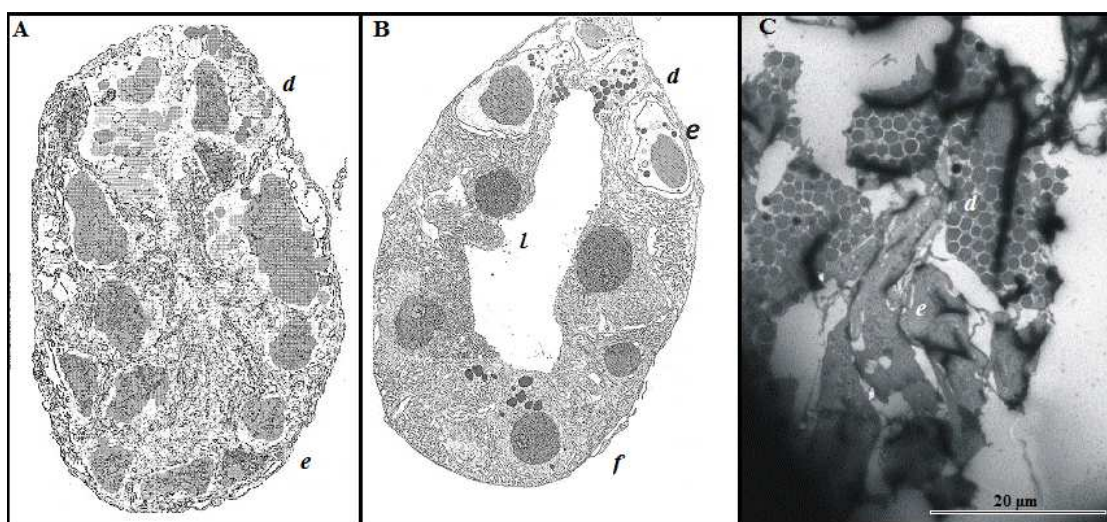
Fixované vzorky mohou být prosyceny kryoprotektantem, který umožňuje kvalitní zamrazení preparátu při nižších rychlostech chlazení (metoda ponoření preparátu do tekutého dusíku), protože kryoprotektant prosytí vzorek, čímž zajistí snížení teploty rekrystalizace a zároveň zvýšení teploty tuhnutí (Ripper et al., 2008).

4.2.1 Lokalizace katepsinu L1 ve slinných žlázách klíštěte *I. ricinus*

Pro lokalizaci katepsinu L1 bylo využito afinitně přečištěných primárních protilátek, které byly získány v předchozích pokusech. Za účelem získání co nejkvalitnějších

výsledků byly protilátky proti katepsinu L1 použity ve dvou koncentracích, a sice 35 µg/ml a 17,5 µg/ml. Ačkoli je pro značení kryosekci obvykle používáno větší ředění afinitně přečištěných protilátek (koncentrace proteinů v protilátce 100 – 500 µg/ml, ředění 1:1 - 1:50), (Griffiths, 1993), pro imunodetekci bylo pro optimální poměr signál-pozadí použito ředění na koncentraci 35 µg/ml. Sekundární protilátka byla konjugována s 10 nm zlatými částicemi, které byly viditelné při pozorování elektronovým mikroskopem (zvětšení 35 000x a větší). Lokalizace katepsinu L1 (IrCL1) byla prováděna na ultratenkých řezech. Jednotlivé vzorky byly získávány v různých časových intervalech sání (tři, šest a devět dní sající samice klíštěte *I. ricinus*). Ve všech třech fázích sání byla v různé míře zjištěna přítomnost IrCL1. Signál pro katepsin L1 byl detekován v sekrečních granulích acinů typu III a dále uvnitř cisteren endoplasmatického retikula a na mikrovilech (drobné buněčné výběžky tvořící acinární lumen), což svědčí o sekretování katepsinu L1.

V acinech typu III (obr. 18) byl signál patrný v granulích o nízké elektronové denzitě, která se vyskytovala ve shlucích 6-9 granulí oválného tvaru, jasně ohraničených membránou. Elektronová denzita granulí a okolní cytoplasmy byla stejná. V průběhu jednotlivých stádií sání docházelo k mírným změnám ve velikosti granulí. Velikost granulí se pohybovala v rozmezí 0,5 – 1 µm v závislosti na stádiu sání. Po porovnání tvaru, velikosti a elektronové denzity granulí s ostatními studii vedenými na toto téma (Fawcett et al., 1981a,b; Sauer et al., 1995; Vancová et al., 2006) bylo vyvozeno, že granula jsou s největší pravděpodobností součástí buněk typu *e* acinů typu III. Tomu odpovídalo také umístění granulí v rámci acinů.



Obr. 18: Aciny typu III. (A) schéma acinu typu III nenasáté samice; (B) schéma acinu typu III částečně nasáté samice; (C) acinus typu III částečně nasáté samice. *d* – *d* buňky, *e* – *e* buňky, *f* – *f* buňky, *l* – lumen. (A, B) upraveno dle Vancová, (C) Schrenková.

Během jednotlivých stádií sání bylo možné pozorovat zvyšování signálu pro katepsin L1 v *e* buňkách acinů typu III. U tři dny sajících samic (obr. 19) bylo zaznamenáno 20 zlatých částic na ploše $5,4 \mu\text{m}^2$, což odpovídá hustotě přibližně $3,7 \text{ Au}/\mu\text{m}^2$ (částice/obsah granulí). U šest dní sajících samic (obr. 21) byla v granulích o celkové ploše $10,8 \mu\text{m}^2$ napočítáno 57 částic. Hustota zlatých částic je tedy větší než v předchozím stádiu sání ($5,7 \text{ Au}/\mu\text{m}^2$). U samic, které sály na hostiteli po dobu devíti dnů, nebylo možné statisticky vyhodnotit množství zlatých nanočástic. Ačkoli i zde bylo možné pozorovat části *e* buněk acinů typu III (obr. 23), kryořezy byly převážně tvořeny buňkami typu *f*. Pro vypovídající statistické zpracování bude nutné připravit další kryořezy s větším množstvím *e* buněk acinu typu III.

Z výsledku je možné usuzovat, že v průběhu sání pravděpodobně dochází k nárůstu množství peptidázy IrCL1 ve slinných žlázách klíštěte. Nárůst je patrný i vzhledem k rostoucí ploše jednotlivých granulí v průběhu sání na hostiteli. Počítání zlatých částic posoužilo pouze jako přibližné stanovení nárůstu/poklesu signálu uvnitř granulí. K dosažení statisticky relevantních výsledků by bylo nutné provést pokus na větším počtu granulí, resp. nalézt větší množství zlatých částic, což by mohlo být předmětem dalších studií a dále zopakovat pokus na slinných žlázách devět dní sajících samic.

4.2.2 Lokalizace katepsinu L3 ve slinných žlázách klíštěte *I. ricinus*

Při lokalizaci katepsinu L3 (IrCL3) bylo postupováno analogicky jako při lokalizaci katepsinu L1. Rozdíl spočíval pouze v odlišném ředění primárních protilátek, kdy ředění protilátek proti katepsinu L3 bylo $23,75 \mu\text{g}/\text{ml}$ a $47,5 \mu\text{g}/\text{ml}$. Vzhledem k intenzitě signálu pro IrCL3 bylo k získání vhodných výsledků využito protilátek o koncentraci $47,5 \mu\text{g}/\text{ml}$. Signál pro katepsin L3 byl rovněž patrný v sekrečních granulích *e* buněk acinů typu III, v cisternách endoplasmatického retikula a na mikrovilech (obr. 25). Celkové množství identifikovaných peptidáz katepsinu L3 bylo nepatrně nižší, než tomu bylo v případě katepsinu L1. Rovněž bylo možné pozorovat zvyšující se tendenci výskytu katepsinu L3. U tři dny sajících samic (obr. 24) bylo na ploše $14,2 \mu\text{m}^2$ napočítáno celkem 73 zlatých částic, hustota byla tedy $5,158 \text{ Au}/\mu\text{m}^2$ plochy granulí. U šest dní sajících samic (obr. 26)

byla četnost částic $6,1 \text{ Au}/\mu\text{m}^2$ (21 částic na ploše $3,4 \mu\text{m}^2$). U devět dní sajících samic nastala stejná situace jako u pokusu k detekci katepsinu L1, protože kryořezy pocházely ze stejného vzorku. I zde bylo možné v sekrečních granulích *e* buněk acinu typu III pozorovat signál, nebylo jej zde však dostatečné množství ke statistické analýze (obr. 27). Kryořezy obsahovaly především *f* buňky acinu typu III bez sekrečních granulí, a tedy bez signálu pro katepsin L3. Proto by bylo potřeba ze slinných žláz devět dní sajících samic připravit nové kryořezy s větším množstvím *e* buněk acinu typu III.

4.2.3 Negativní kontrola

Negativní kontroly bylo při lokalizaci obou peptidáz (IrCL1, IrCL3) v jednotlivých stádiích sání dosaženo vynecháním primární protilátky a využitím pouze sekundární protilátky s navázanými zlatými částicemi (obr. 20, 22). Díky vysoce specifickým protilátkám byl tento druh kontroly dostačující. Kontrolou bylo potvrzeno, že nedochází k nespecifickému navázání sekundární protilátky na granula buněk *e* acinů typu III.

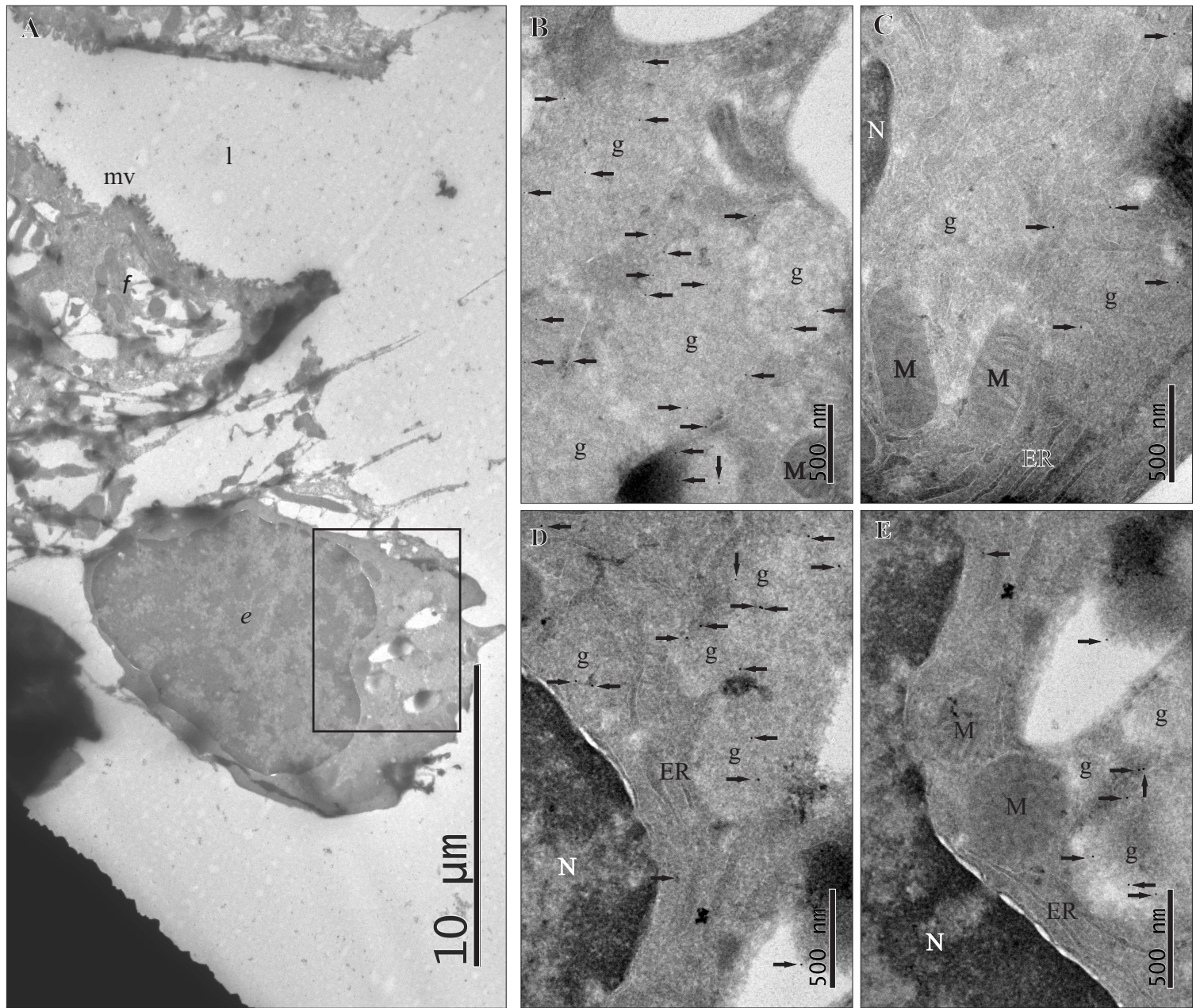
U devět dní sajících samic nebylo možné vytvořit kontrolní snímek *e* buněk se sekrečními granuly, protože byly kryořezy tvořeny téměř výhradně *f* buňkami acinu typu III. Proto by bylo vhodné připravit nové kryořezy slinných žláz devět dní sajících samic.

Na kryořezech bylo možné pozorovat také nespecifické reakce. Ty byly patrné především v místech přehybů řezů, které byly pravděpodobně způsobeny nesprávným přenesením řezů z kryokomory na síťky. Přenášení řezů je nejkritičtější část celé metody, protože řezy nemají podporu pryskyřice a jsou tedy velmi křehké. V místech přehybů došlo k nesprávnému vymytí sekundární protilátky, a tedy k jejímu usazení.

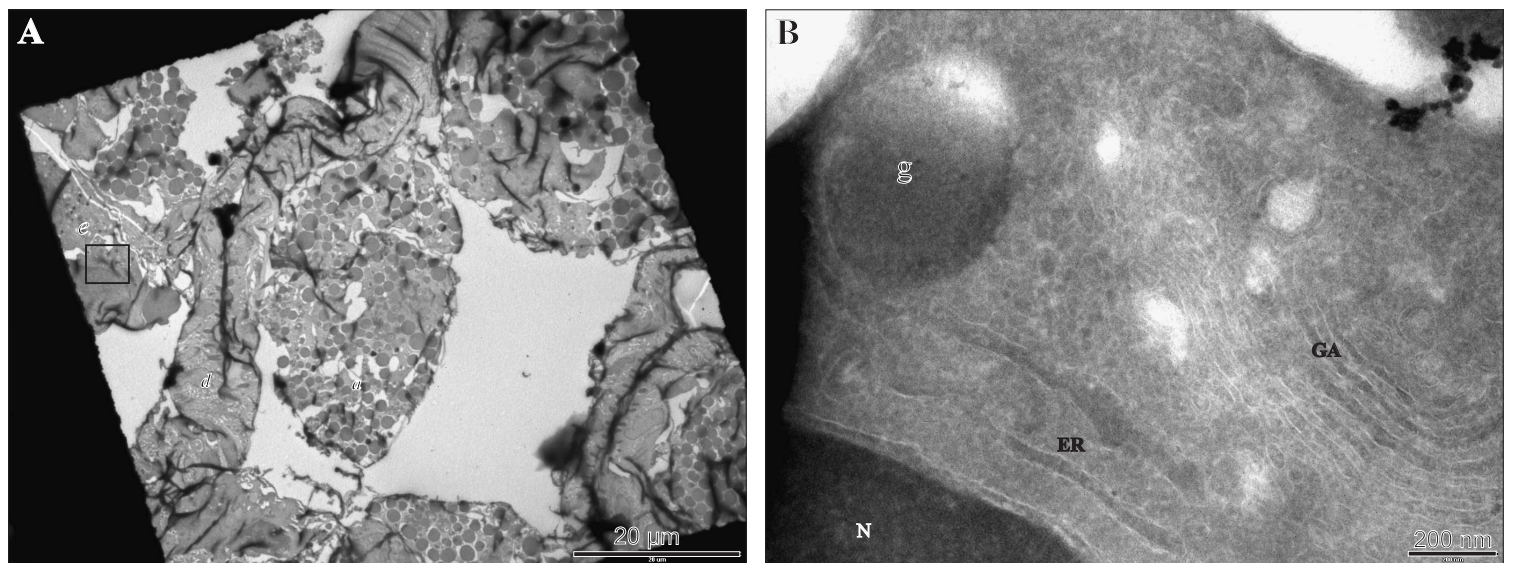
Nespecifická reakce byla pozorovatelná rovněž v místech, kde se ve slinných žlázách vyskytoval polysacharid chitin (dukty, acinární lumen). V těchto místech bylo možné pozorovat reakci, i když zde nebyl předpokládán výskyt ani jedné peptidázy (obr. 28). Nespecifická reakce na chitin mohla být způsobena interakcí negativně nabitých zlatých nanočástic s chitinem s výrazně kladným nábojem. K odstranění této nespecifické reakce by bylo nutné provést další pokusy.

Na ostatních částech acinů (mitochondrie, jádro, granula jiných typů sekrečních

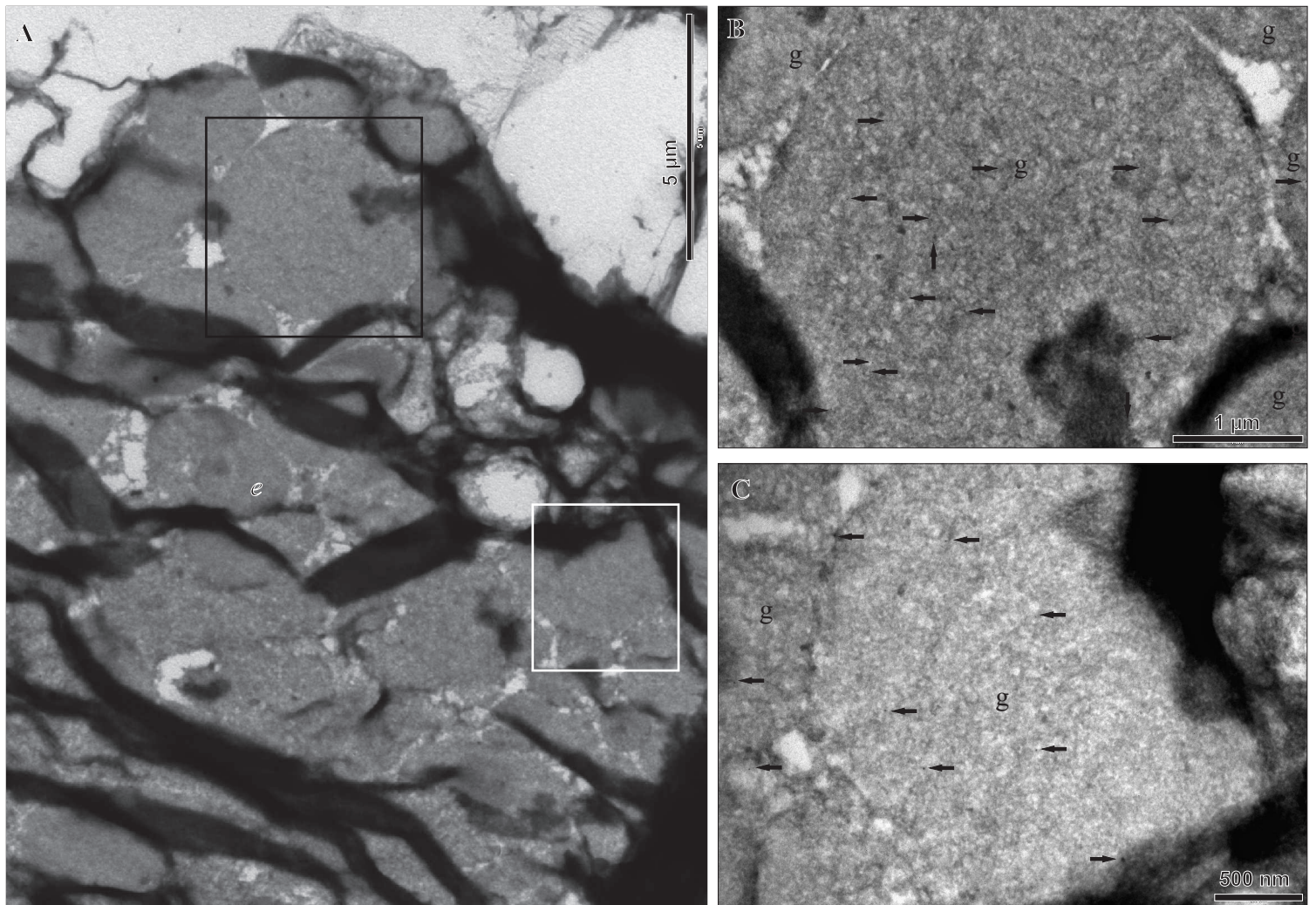
buněk) nebyla pozorovatelná specifická reakce na zkoumaných ani kontrolních vzorcích, což svědčí o specifitě značení.



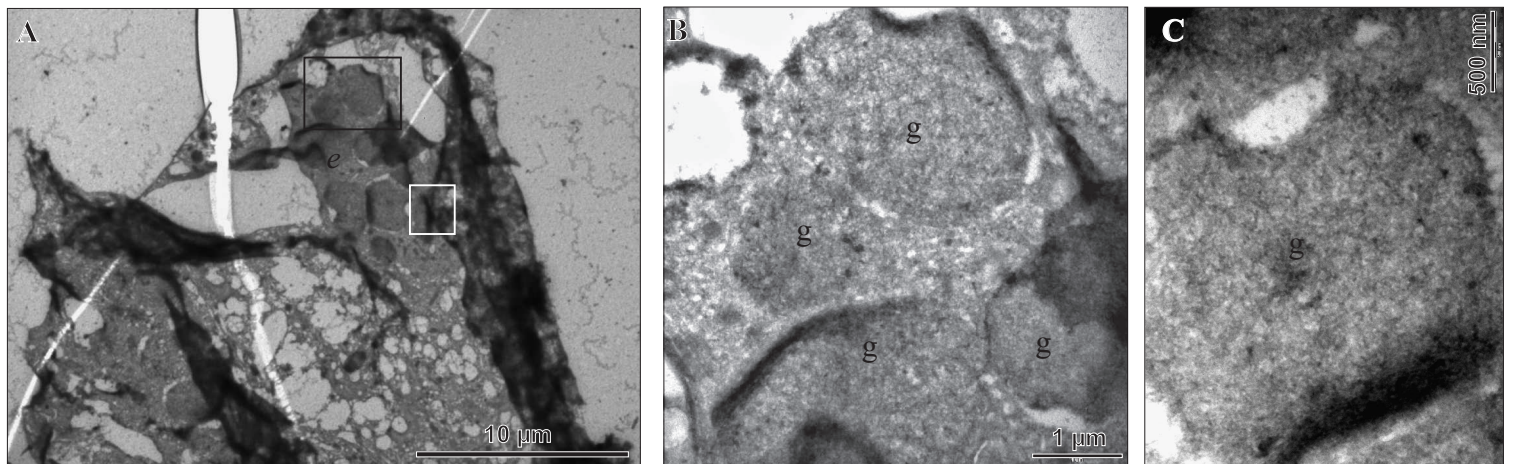
Obr. 19: Lokalizace katepsinu L1 v roztátných kryořezech slinných žláz 3 dny sajících samic. Značení v buňkách typu *e*. (A) Přehledové zvětšení; (B,C,D,E) detail. Šipky označují zlaté nanočástice; mv - mikrovily; l - lumen; *e* - *e* buňky acinu typu III; *f* - *f* buňky acinu typu III; *g* - granulum; M - mitochondrie; ER - endoplasmatické retikulum; N - jádro.



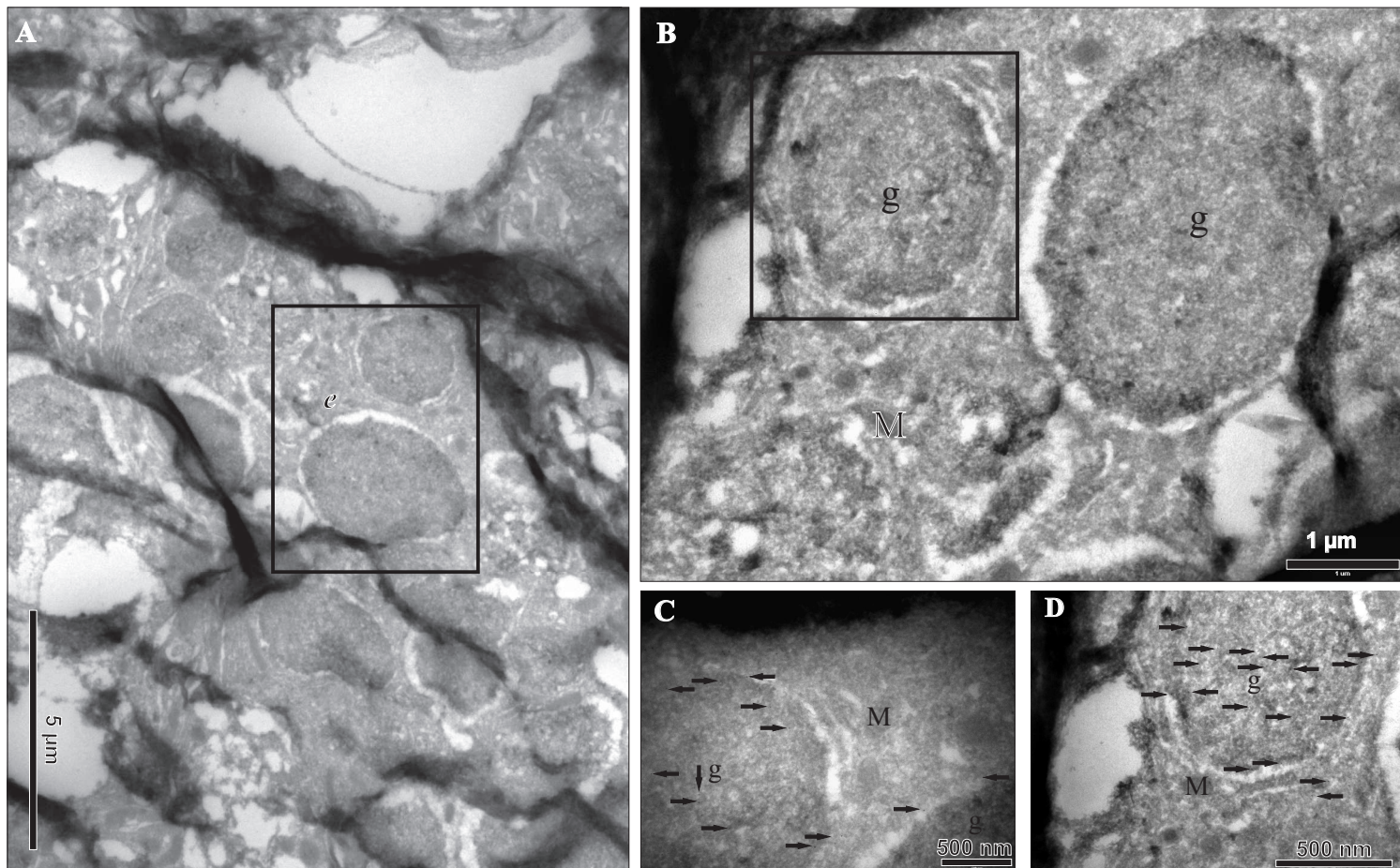
Obr. 20: Kontrolní značení provedené na roztátných kryořezech slinných žláz 3 dny sajících samic vynecháním primární protilátky. (A) Přehledové zvětšení; (B) detail. *e* - *e* buňky; *d* - dukt; *a* - acinus typu III; *g* - granulum; ER - endoplasmatické retikulum; GA - Golgiho aparát; N -



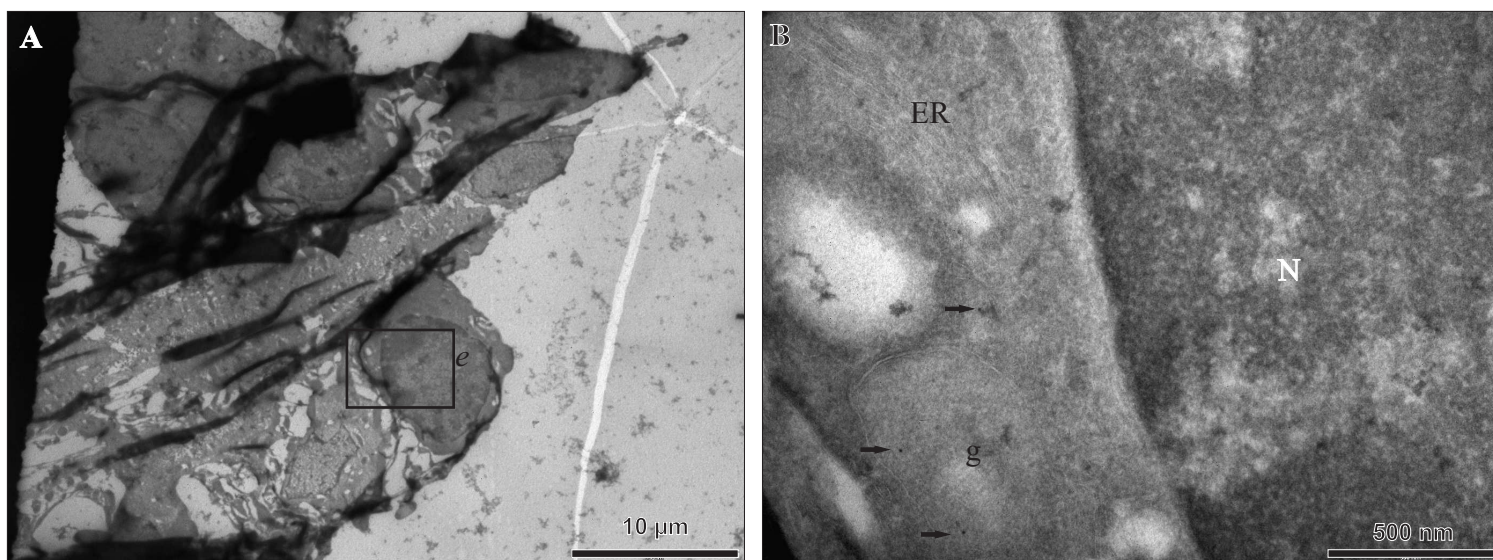
Obr. 21: Lokalizace katepsinu L1 v roztátných kryožezech slinných žláz 6 dní sajících samic. Značení v buňkách typu *e*. (A) Přehledové zvětšení; (B) detail - černý obdélník, (C) detail - bílý obdélník. Šípky označují zlaté nanočástice; *e* - *e* buňky acinu typu III; *g* - granulum.



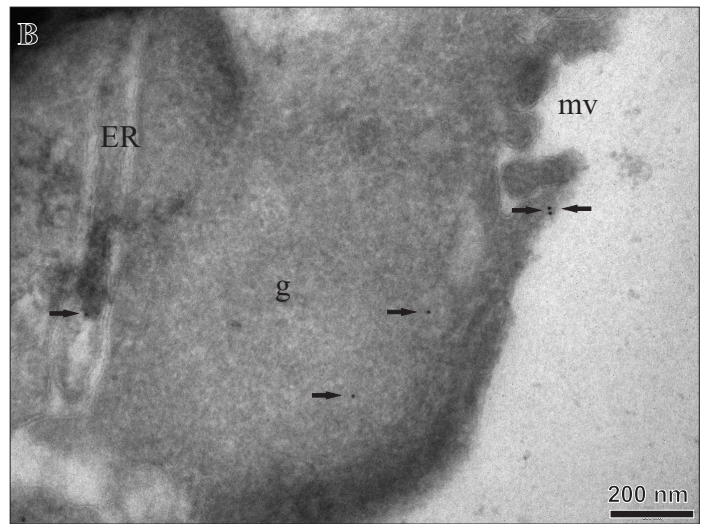
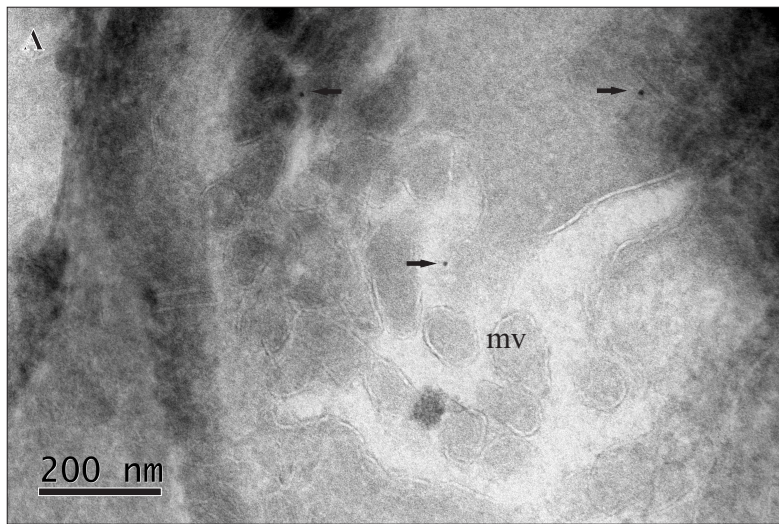
Obr. 22: Kontrolní značení provedené na roztátných kryožezech slinných žláz 6 dní sajících samic vynecháním primární protilátky. (A) Přehledové zvětšení; (B) detail - černý obdélník, (C) - bílý obdélník. *e* - *e* buňky acinu typu III; *g* - granulum.



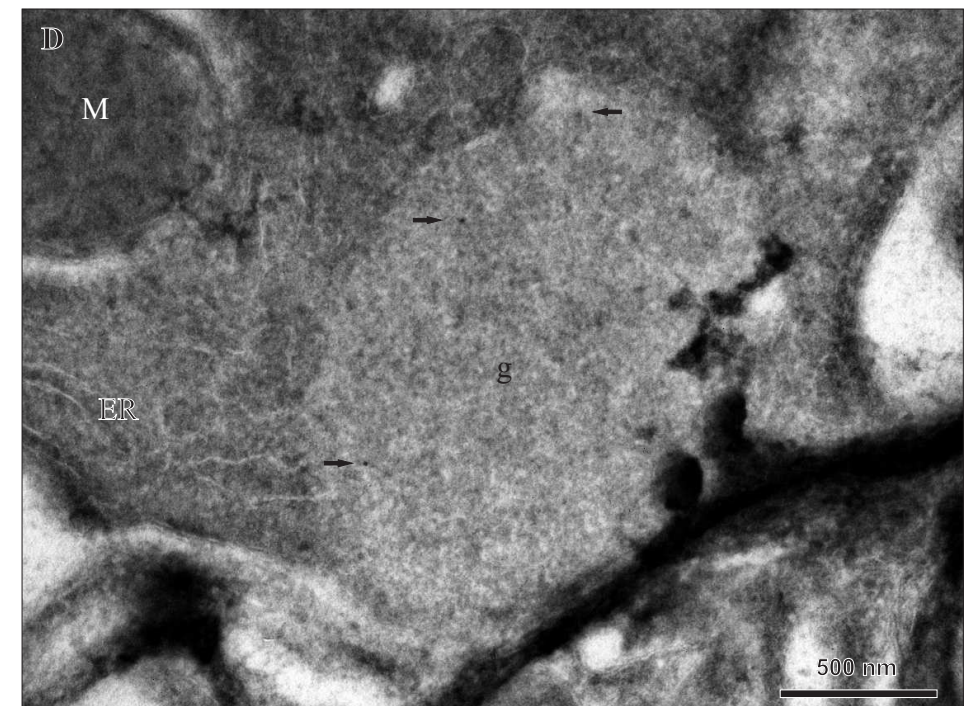
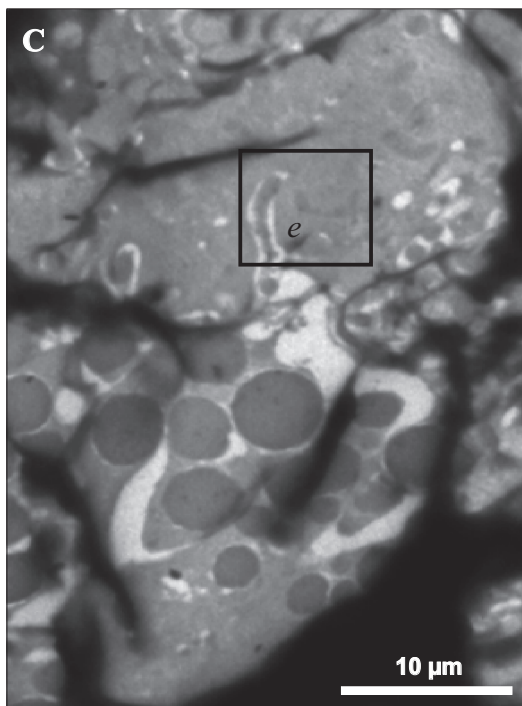
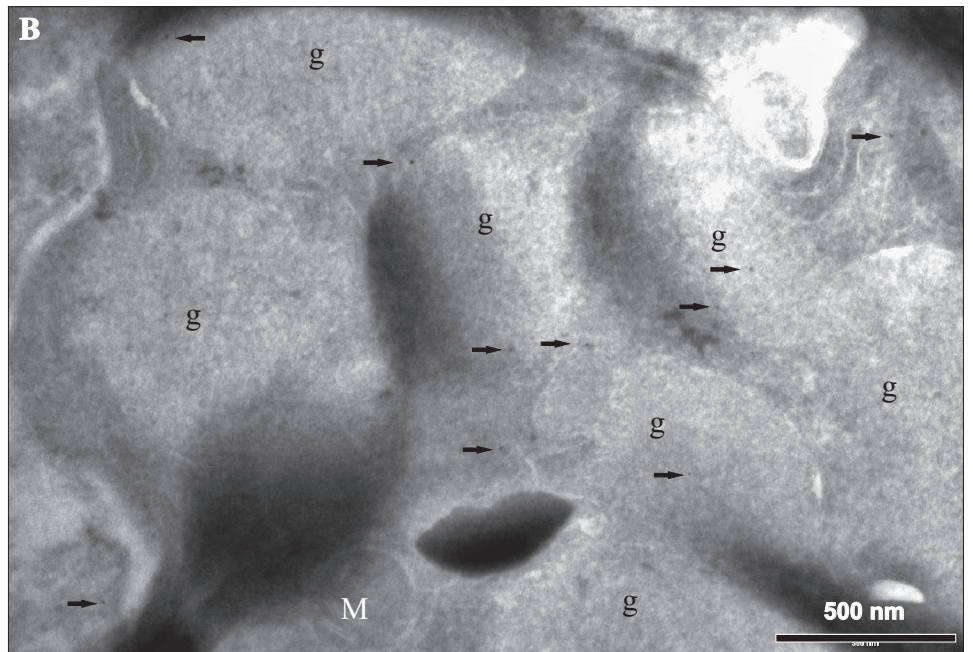
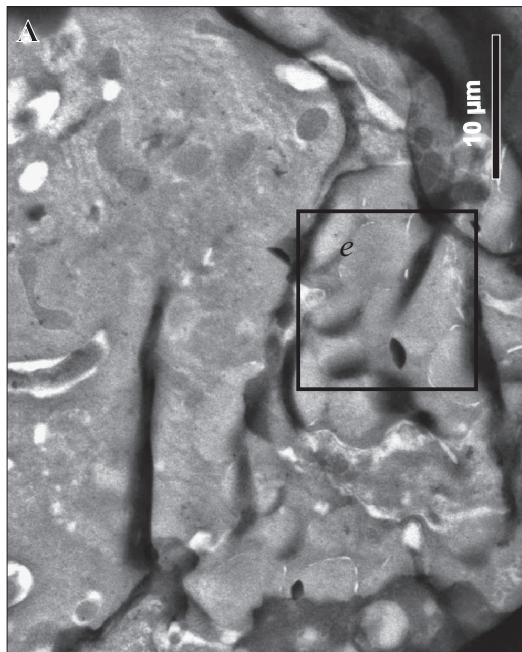
Obr. 23: Lokalizace katepsinu L1 v roztátých kryorezech slinných žláz 9 dny sajících samic. Značení v buňkách typu *e*. (A, B) Přehledové zvětšení; (C,D) detail. Šipky označují zlaté nanočástice; *e*- *e* buňky acinu typu III; *g* - granulum; *M* - mitochondrie.



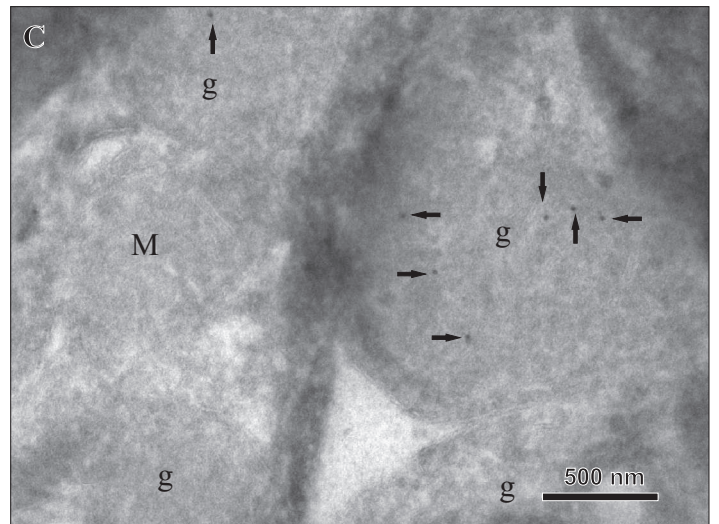
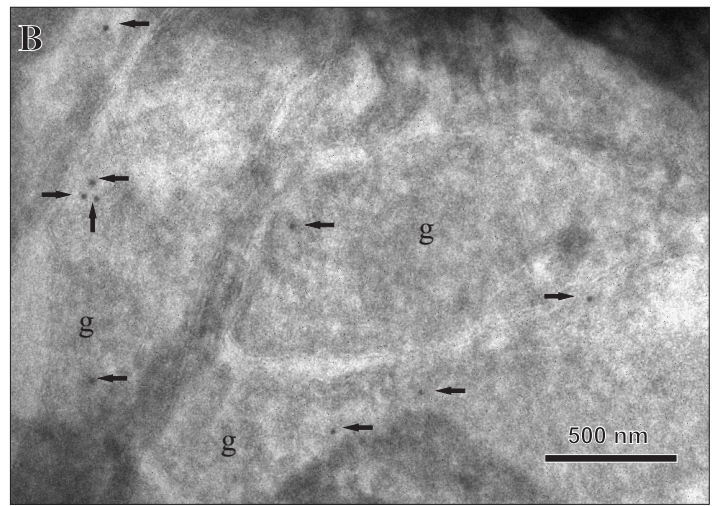
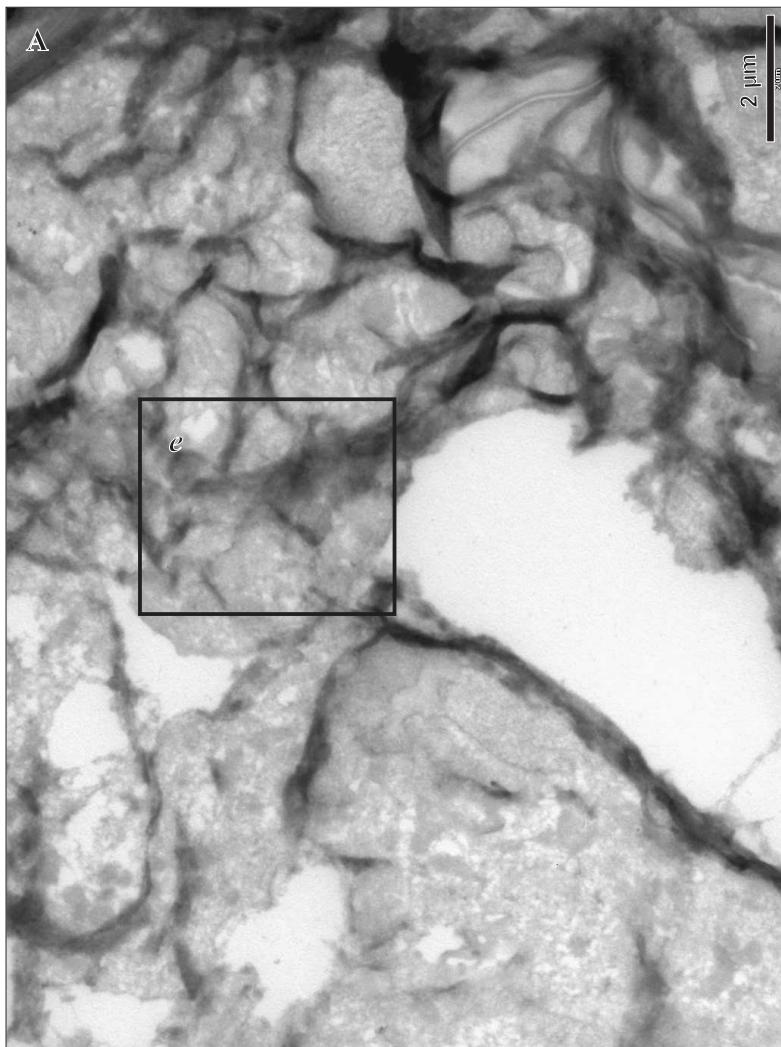
Obr. 24: Lokalizace katepsinu L3 v roztátých kryorezech slinných žláz 3 dny sajících samic. Značení v buňkách typu *e*. (A) Přehledové zvětšení; (B) detail. Šipky označují zlaté nanočástice; *e*- *e* buňky acinu typu III; *g* - granulum; ER - endoplasmatické retikulum; N - jádro.



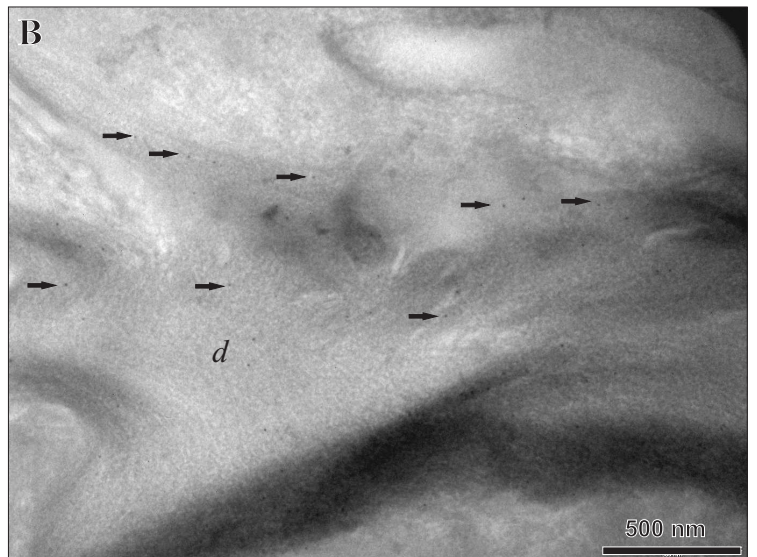
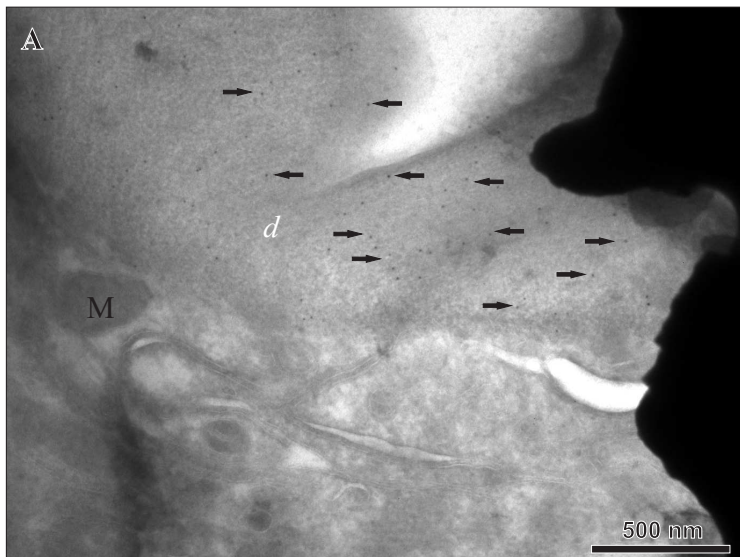
Obr. 25: Lokalizace katepsinu L3 v roztátných kryožezech slinných žláz 3 dny sajících samic. (A, B) Značení na mikrovilech a v cisternách endoplasmatického retikula. Šípky označují zlaté nanočástice; mv - mikrovily; g - granulum; ER - endoplasmatické retikulum.



Obr. 26: Lokalizace katepsinu L3 v roztátných kryožezech slinných žláz 6 dní sajících samic. (A,C) Přehledové zvětšení; (B, D) detail. Šípky označují zlaté nanočástice; g - granulum; ER - endoplasmatické retikulum; M - mitochondrie.



Obr. 27: Lokalizace katepsinu L3 v roztátých kryožezech slinných žláz 9 dní sajících samic. Značení v buňkách typu *e*. (A) Přehledové zvětšení; (B, C) detail. Šipky označují zlaté nanočástice; *e* - *e* buňky acinu typu III; *g* - granulum; *M* - mitochondrie.



Obr. 28: Nespecifické reakce navázáním zlatých částic na dukt slinných žláz (A, B). Šipky označují zlaté nanočástice, *M* - mitochondrie, *d* - dukt.

5. Závěr

Jedním z cílů diplomové práce byla příprava specifických protilátek proti peptidázám katepsinu L1 a katepsinu L3. V předchozích studiích týkajících se cysteinové peptidázy katepsinu L bylo potvrzeno, že je přítomna nejen ve střevech, ale také v ostatních tkáních klíštěte *I. ricinus*, včetně slinných žláz (Sojka et al., 2008). Imunolokalizace trávicí peptidázy katepsinu L (IrCL) v nymfách *I. ricinus* byla předmětem mé bakalářské práce (Schrenková, 2011), a proto bylo v diplomové práci přistoupeno k lokalizaci katepsinu L ve slinných žlázách dospělých samic klíštěte *I. ricinus*. V naší laboratoři byly identifikovány dvě izoformy katepsinu L (IrCL1, IrCL3). Obě formy byly připraveny jako rekombinantní pro-enzymy, které bylo možné převést na aktivní enzymy. Takto připravené rekombinantní proteiny byly použity k imunizaci králíka, jehož sérum s vytvořenými polyklonálními protilátkami bylo použito jako základní materiál pro mé pokusy. Ze séra byla získána imunoglobulinová frakce, která byla následně přečištěna afinitní chromatografií na koloně navázanou rekombinantní peptidázou. Specifita takto získaných protilátek proti oběma peptidázám byla ověřena na střevním homogenátu. Následně byly specifické protilátky použity k ověření přítomnosti katepsinu L1 a L3 ve slinných žlázách klíštěte *I. ricinus*.

Dalším cílem této diplomové práce byla imunolokalizace izoform katepsinu L ve slinných žlázách pomocí elektronové mikroskopie. Díky elektronové mikroskopii bylo možné zkombinovat lokalizaci obou peptidáz a získání detailní informace o ultrastruktuře slinných žláz klíštěte *I. ricinus*. Ačkoli byla přítomnost katepsinu L ve slinných žlázách klíštěte potvrzena v předchozích studiích, není známa role katepsinu L ve slinných žlázách, stejně jako ultrastrukturální lokalizace v rámci slinných žláz. V diplomové práci bylo ukázáno, že obě izoformy katepsinu L jsou přítomny v acinech typu III, kde se nachází sekreční granula. Granula byla popsána na základě tvaru, velikosti a elektronové denzity a srovnána s ostatními granuly acinů. Bylo zjištěno, že během různých stádií sání dochází k mírnému vzestupu množství obou izoform katepsinů L ve slinných žlázách. Dále bylo stanoveno, že ačkoli byla koncentrace protilátek proti katepsinu L1 nižší než koncentrace protilátek proti katepsinu L3, bylo detekováno větší množství signálu pro katepsin L1. Pro další srovnání přítomnosti obou izoform ve slinných žlázách v průběhu sání by bylo vhodné ověřit množství peptidáz v různých stádiích sání na hostiteli prostřednictvím Western Blotu.

6. Shrnutí

- Příprava specifických protilátek proti katepsinu L1 (IrCL1) ze séra imunizovaného králíka pomocí afinitní chromatografie o koncentraci 70 µg/ml.
- Příprava specifických protilátek proti katepsinu L3 (IrCL3) ze séra imunizovaného králíka pomocí afinitní chromatografie o koncentraci 190 µg/ml.
- Imunolokalizace obou peptidáz (IrCL1, IrCL3) ve slinných žlázách klíštěte *Ixodes ricinus* v různých stádiích sání na hostiteli (tři, šest a devět dní sající samice).
- Intracelulární lokalizace katepsinů L1 a L3 pomocí transmisní elektronové mikroskopie.
- Charakteristika ultrastruktur, ve kterých byly obě izoformy lokalizovány.
- Porovnání množství obou peptidáz a vyhodnocení změn v množství obou peptidáz v průběhu sání samic na hostiteli.

7. Literatura

- Andersen J. F., Gudderra N. P., Francischetti I. M., Ribeiro J. M., 2005. The role of salivary lipocalins in blood feeding by *Rhodnius prolixus*. Arch. Insect. Biochem. Physiol. 58: 97-105.
- Balashov Y. S., 1979b. An atlas of elektron microscopical anatomy of ixodid ticks. USSR Academy of science/Nauka Publishers, Leningrad, Russia, 265 pp.
- Balashov Y. S., 1983. An atlas of Ixodid tick ultrastructure. Special Publication Entomological Society of America.
- Battersby B. J., Sharp J. C. W., Webb R. I., Barnes G. T., 1994. Vitrification of aqueous suspensions from a controlled environment for electron microscopy: an improved plunge-cooling device. Journal of Microscopy, 176: 110-120.
- Binnington K. C., 1978. Sequential changes in salivary gland structure during attachment and feeding of the cattle tick, *Boophilus microplus*. Int. J. Parasitol., 8: 97-115.
- Bowman A. S., Sauer J. R., 2004. Tick salivary glands: function, physiology and future. Parasitology, 129: S67-S81.
- Bradford M. M., 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72: 248-254.
- Barker D. M., Ownby C. L., Krolak J. M., Claypool P. L., Sauer J. R., 1984. The effects of attachment, feeding and mating on the morphology of the type I alveolus of salivary glands of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. J. Parasitol., 70: 99-113.
- Caffrey C. R., McKerrow J. H., Salter J. P., Sajid M., 2004. Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. Trends Parasitol., 20: 241-248.
- Coons L. B., Kaufman W. R., 1988. Evidence that developmental changes in type III acini in the tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) are initiated by a hemolymph-borne factor. Experimental and Applied Acarology 4: 117-139.
- Durden L. A., 2002. Medical and veterinary entomology. Academic Press, 597 pp.
- Dykstra, M. J., Reuss, L. E., 2004. Biological Electron Microscopy: Theory, Techniques, and Troubleshooting. Kluwer Academic/ Plenum Publisher, New York.
- Edwards, K. T., Goddard J., Varela-Stokes A. S., 2009. Examination of the Internal Morphology of the Ixodid Tick, *Amblyomma maculatum* Koch, (Acari: Ixodidae); a "How-to" Pictorial Dissection Guide. Midsouth Entomologist, 2.

- Fawcett D. W., Doxsey S., Büscher G., 1981. Salivary gland of the tick vector (*R. appendiculatus*) of east coast fever. I. Ultrastructure of the type III acinus. *Tissue and Cell*, 13: 209-230.
- Fawcett D. W., Doxsey S., Büscher G., 1981. Salivary gland of the tick vector (*R. appendiculatus*) of east coast fever. II. Cellular basis for fluid secretion in the type III acinus. *Tissue and Cell*, 13: 231-253.
- Fox, M. R., 1987. Dye-makers of Great Britain 1856-1976: A History of Chemists, Companies, Products and Changes. Manchester: Imperial Chemical Industries, 38 pp.
- Franta Z., Sojka D., Frantová H., Dvořák J., Horn M., Srba J., Talacko P., Mareš M., Schneider E., Craik Ch. S., McKerrow J. H., Caffrey C. R., Kopáček P., 2011. IcCL1 – The haemoglobinolytic cathepsin L of the hard tick, *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.*, 41: 1253-1262.
- de la Fuente J., Estrada-Pena A., Benzyl J. M., 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.* 13: 6938-6946.
- Gaede K., Uuml Kn., Lle, W., 1997. On the mechanism of water vapour sorption from unsaturated atmospheres by ticks. *Journal of Experimental Biology*, 200:1491-1498.
- Goodman L. L., Dennis D. T., Sonenshine D. E., 2005. Tick – Borne Diseases of Humans, ASM Press, 401 pp.
- Grandjean O., 1984. Blood digestion in *Ornithodoros moubata* Murray sensu stricto Walton (Ixodidea: Argasidae) females. I. Biochemical changes in the midgut lumen and ultrastructure of the midgut cell, related to intracellular digestion. *Acarologia*, 25: 147-165.
- Gray J. S., 1991. The development and seasonal activity of the tick *I. ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Rev. Med. Vet. Entomol*, 6: 324-333.
- Gregson J. D., 1967. Observations on the movement of fluids in the vicinity of the mouthparts of naturally feeding *Dermacentor andersoni* Stiles. *Parasitology*, 57: 1-8.
- Griffith J. M., Posthuma G., 2002. A reliable and convenient method to store ultrathin thawed cryosections prior to immunolabeling. *J. Histochem. Cytochem.*, 50: 57-62.
- Griffiths G., 1993. Fine Structure Immunocytochemistry. Springer-Verlag, Berlin.
- Guglielmone A. A., Robbins R. G., Apanaskevich D. A., Petney T. N., Estrada-Pena A., Horak I. G., Shao R. F., Barker S. C., 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, 1-28.
- Hagler H. K., 2007. Ultramicrotomy for Biological Electron Microscopy. *Methods in Molecular Biology*. 369: 67-96.

- Harris K. F., 1987. Current topics in vector research. Volume I.
- Horn M., Zikmundová-Nussbaumerová M., Šanda M., Kovářová Z., Srba J., Franta Z., Sojka D., Bogyo M., Caffrey C.R., Kopáček M., Mareš M., 2009. Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chem. Biol.* 16: 1053-1063.
- Jaworski D. C., Muller M. T., Simmen F. A., Needham G. R., 1990. *Amblyomma americanum*: identification of tick salivary gland antigens from unfed and early feeding females with comparisons to *Ixodes dammini* and *Dermacentor variabilis*. *Exp. Parasitol.* 70: 217-226.
- Jongejan F., Uilenberg G., 2004. The global importance of tick. *Parasitology* 129: S3-S14.
- Kaufman W. R., 1987. The function of Tick Salivary Glands. *Current Topics in Vector Research.* 1: 215-245.
- Kellenberger e., Durrenberger M., 1987. The efficiency of immunolabel on Lowicryl sections compared to theoretical predictions. *J. Histochem. Cytochem.* 35: 959-969.
- Kemp D. H., Stone B. F., Binnington K. C., 1982. Tick attachment and feeding: role of the mouth-parts, feeding apparatus, salivary gland secretions and the host response. In F. D. Obenchain and R. Galun (Eds.), *Physiology of Ticks*, Vol. I, Oxford, UK: Pergamon Press, 119-168.
- Kotsyfakis M., Anderson J. M., Andersen J. F., Calvo E., Francischetti I. M., Mather T. N., Valenzuela J. G., Ribeiro J. M., 2008. Cutting edge: Immunity against a "silent" salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *J. Immunol.*, 181: 5209-5212.
- Laemmli U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259): 680-685.
- Liou W., Geuze H. J., Slot J. W., 1996. Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem. Cell. Biol.* 106: 41-58.
- McKerrow, J. H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., Sajid M., 2006. Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 1: 497-536.
- Nava S, Guglielmo A. A., Mangold A. J., 2009. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci*, 14: 2857-2877.
- Needham G. R., Teel P. D., 1986. Water balance by ticks between blood meals. In J. R. Sauer and J. A. Hair (Eds.), *Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks*. Chichester, UK: Ellis Horwood, 100-151.
- Nuttall P. A., 1999. Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zentralbl Bakteriolog.*, 289: 492-505.

- Olivieri J. A., Serra-Freire N. M., 1992. Structure of the salivary glands of the unfed female tick *Ambylomma cajennense* (Fabricius), (Acarina: Ixodidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 87: S167-174.
- Patton T. G., Dietrich G., Brandt K., Dolan M. C., Piesman J., Gilmore R. D. Jr., 2012. Saliva, salivary gland, and hemolymph collection from *Ixodes scapularis* ticks. J. Vis. Exp., 60: 3791-3894.
- Pěničková H., 2009. Peptidázy v trávicích buňkách střeva klíštěte *Ixodes ricinus* – lokalizace a funkce. České Budějovice. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Pěničková H., 2010. Fyziologie trávení u klíšťat a trávicí peptidázy. České Budějovice. Doktorandská literární rešerše. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Ripper D., Schwarz H., Stierhof Y. D., 2008. Cryo-section immunolabelling of difficult to preserve specimens: advantages of cryofixation, freeze-substitution and rehydration. Biol. Cell, 100: 109-123.
- Sá-Nunes A., Báfica A., Antonelli L. R., Choi E. Y., Francischetti I. M., Andersen J. F., Shi G. P., Chavakis T., Ribeiro J. M., Kotsyfakis M., 2009. The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. J. Immunol. 182: 7422-7429.
- Sauer J. R., Essenberg R. C., Bowman A. S., 2000. Salivary glands in jodid tick: kontrol and mechanism of secretion. Journal of Insect Physiology, 46: 1069-1078.
- Sauer J. R., McSwain J. L., Bowman A. S., Essenberg R. C., 1995. Tick salivary gland physiology. Annu. Rev. Entomol., 40: 245-267.
- Schrenková J., 2011. Imunolokalizace trávicích peptidáz v nymfách klíštěte *Ixodes ricinus* v průběhu sání na hostiteli a během přeměny na dospělé. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Schwarz A., Valdés J. J., Kotsyfakis M., 2012. The role of cystatins in tick physiology and blood feeding. Ticks Tick Borne Dis., 3: 117-127.
- Sojka D., Hajdušek O., Dvořák J., Sajid M., Franta Z., Schneider E. L., Craik C. S., Vancová M., Burešová V., Bogyo M., Sexton K. B., McKerrow J. H., Caffrey C. R., Kopáček P., 2007. IrAE – An asparaginyl endopeptidase (legumain) in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*. Int. J. Parasitol. 37: 713-724.
- Sojka D., Franta Z., Horn M., Hajdušek O., Caffrey C. R., Mareš M., Kopáček P., 2008. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. Parasit. Vectors., 1: 7.
- Sojka D., Franta Z., Horn M., Caffrey C. R., Mareš M., Kopáček P., 2013. New insight into the machinery of blood digestion in tick. Trends in Parasitology, 29: 276-285.

- Sonenshine D. E., 1991. *Biology of Tick*, Vol. 1, Oxford University Press, New York. Steen N. A., Barker S. C., Alewood P. F., 2006. Proteins in the saliva of the Ixodida (ticks): pharmacological features and biological significance. *Toxicon*, 47: 1-20.
- Šimo L., Žitňan D., Park Y., 2012. Neural control of salivary glands in ixodid ticks. *Journal of Insect Physiology*, 58: 459-466.
- Telford S. R. 3rd, Goethert H. K., 2004. Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly 'new'? *Parasitology*, 129 Suppl: S301-27.
- Tokuyasu K. T., 1973. A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J. Cell Biol.* 57: 551-565.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76: 4350-4354.
- Vancová M., Zacharovová K., Grubhoffer L., Nebesářová J., 2006. Ultrastructure and lecithin characterization of granular salivary cells from *Ixodes ricinus* females. *J. Parasitol.*, 92: 431-440.
- Vodrážka Z., 2002. *Biochemie*, Academia.
- Volf P., Horák P., Čepička I., Flegr J., Lukeš J., Mikeš L., Svobodová M., Vávra J., Votýpka J., 2007. *Paraziti a jejich biologie*. TRITON, Praha.
- Walker A. R., Fletcher J. D., Gill H. S., 1985. Structural and histochemical changes in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus* during feeding. *Int. J. Parasitol.*, 15: 81-100.
- Walker A. R., Fletcher J. D., 1987. Histology of digestion in nymphs of *Rhipicephalus appendiculatus* fed on rabbits and cattle naive and resistant to the tick. *Int. J. Parasitol.*, 17: 1393-1411.

Internetové zdroje:

- www.tickencounter.org
- www.wwhd.org
- <http://iscapularis.vector-base.org>
- <http://rsbweb.nih.gov/ij/>