

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Scavenger receptor – trypsinová peptidáza IrSRP-1  
z klíštěte *I. ricinus***

Diplomová práce

**Bc. Barbora Singerová**

Školitel: RNDr. Daniel Sojka, Ph.D.

České Budějovice 2013

Singerová B., (2013): Scavenger receptor – trypsinová peptidáza IrSRP-1 z klíštěte *I. ricinus* [Scavenger receptor – trypsin-like protease IrSRP1 from the tick *Ixodes ricinus*. Mgr. Thesis, in Czech ]- 46 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

Scavenger receptors are a large family of structurally diverse molecules that have been implicated in a range of biological functions. In this work, a newly identified multi-domain scavenger receptor-serine protease IrSRP-1 from the tick *Ixodes ricinus* is characterized. IrSRP-1 is related to the serine protease Sp22D from the mosquito *Anopheles gambiae*. IrSRP-1 is expressed mainly in the tick gut but also in hemocytes, Malpighian tubules, tracheas and ovaries of fully fed females. This was confirmed with Western blots and immunohistological labeling with antibodies raised against recombinantly expressed IrSRP-1 trypsin-like domain. According to acquired qRT-PCR profiles relative expression of *IrSRP-1* is strongly up-regulated during female feeding and remains unchanged in ticks experimentally injected with various microbes. Functional characterization by RNA interference revealed that lowering IrSRP1 expression leads to a higher mortality rate during tick female feeding.

Tato práce byla financována z grantu P502/11/P682 GAČR.

Prohlašuji, že jsem předloženou magisterskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené 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 svého 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 své kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz

provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 12. prosince 2013

---

Barbora Singerová

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Danielu Sojkovi, Ph.D. za vedení mé práce, RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc. za možnost pracovat v Laboratoři imunologie vektorů na Parazitologickém ústavu AV ČR v Českých Budějovicích. Děkuji všem, kdo mi během mého působení v laboratoři pomáhali a poskytovali cenné rady. Děkuji svým rodičům za finanční a především psychickou podporu po celou dobu studia.

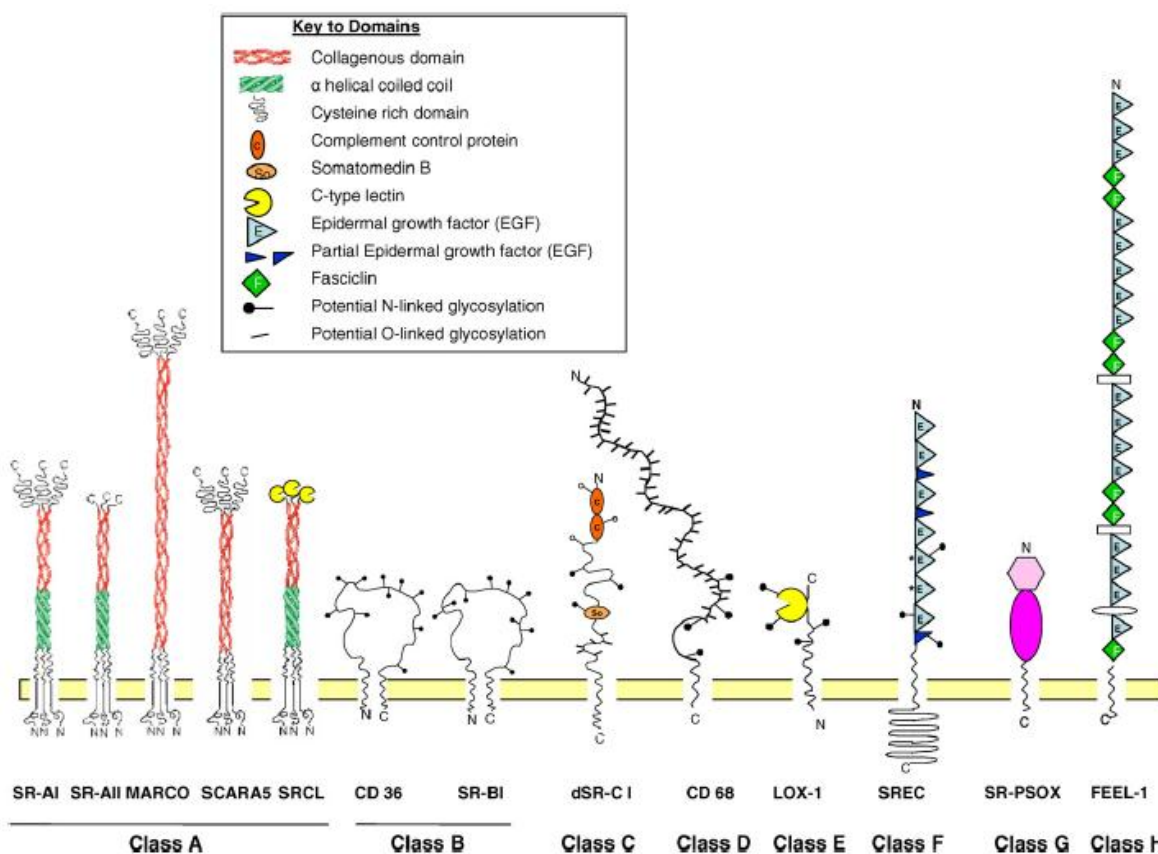
# Obsah

1. Úvod .....	1
1.1. Scavenger receptory.....	1
1.2. Scavenger receptory u parazitů.....	3
1.3. Klíšťata a jejich scavenger receptory.....	4
1.4. Vnitrobuněčné trávení a přenos patogenů u klíšťat .....	6
2. Cíle práce.....	8
3. Materiál a metody.....	9
3.1. Chov klíšťat <i>I. ricinus</i> .....	9
3.2. Příprava vzorků: pitva klíšťat, izolace RNA, syntéza cDNA, vzorky pro SDS-PAGE elektroforézu a Western blot.....	9
3.3. PCR reakce .....	10
3.4. Klonování a sekvenování PCR produktů.....	11
3.5. Příprava rekombinantního fúzního proteinu .....	12
3.6. Příprava primární protilátky imunizací králíka a její přečištění .....	14
3.7. SDS-PAGE elektroforéza a Western blot.....	15
3.8. Imunohistochemie.....	16
3.9. RNA interference .....	18
4. Výsledky.....	20
4.1. Identifikace a struktura IrSRP-1 .....	20
4.2. qRT-PCR profily transkripce IrSRP-1.....	25
4.3. Příprava rekombinantního proteinu- trypsinové proteázy rIrSRP-1.....	27
4.4. Příprava polyklonálních protilátek proti rIrSRP-1, detekce a lokalizace IrSRP-1 v tkáních <i>I. ricinus</i> .....	29
4.5. RNA interference .....	32
5. Diskuze.....	34
6. Závěr.....	39
7. Seznam použité literatury.....	40

# 1. Úvod

## 1.1. Scavenger receptory

Scavenger receptor byl poprvé popsán v roce 1979 Brownem a Goldsteinem, kteří při své studii hypercholesterolémie našli receptor pro modifikovaný nízkodenzitní lipoprotein (LDL, *low-density lipoprotein*) (Goldstein a kol., 1979). V současné době představují scavenger receptory (SR) rozmanitou skupinu glykoproteinů, jež rozpoznávají různé polyanionické struktury endogenního i exogenního původu (Murphy a kol., 2005) a které se účastní řady fyziologických a patologických procesů, jakými jsou například ateroskleróza či Alzheimerova choroba (Plüddemann a kol., 2007). Podle uspořádání mnohodoménové struktury se SR rozdělují do osmi základních skupin - viz Obr. 1 (Krieger, 1997, Plüddemann a kol., 2007).



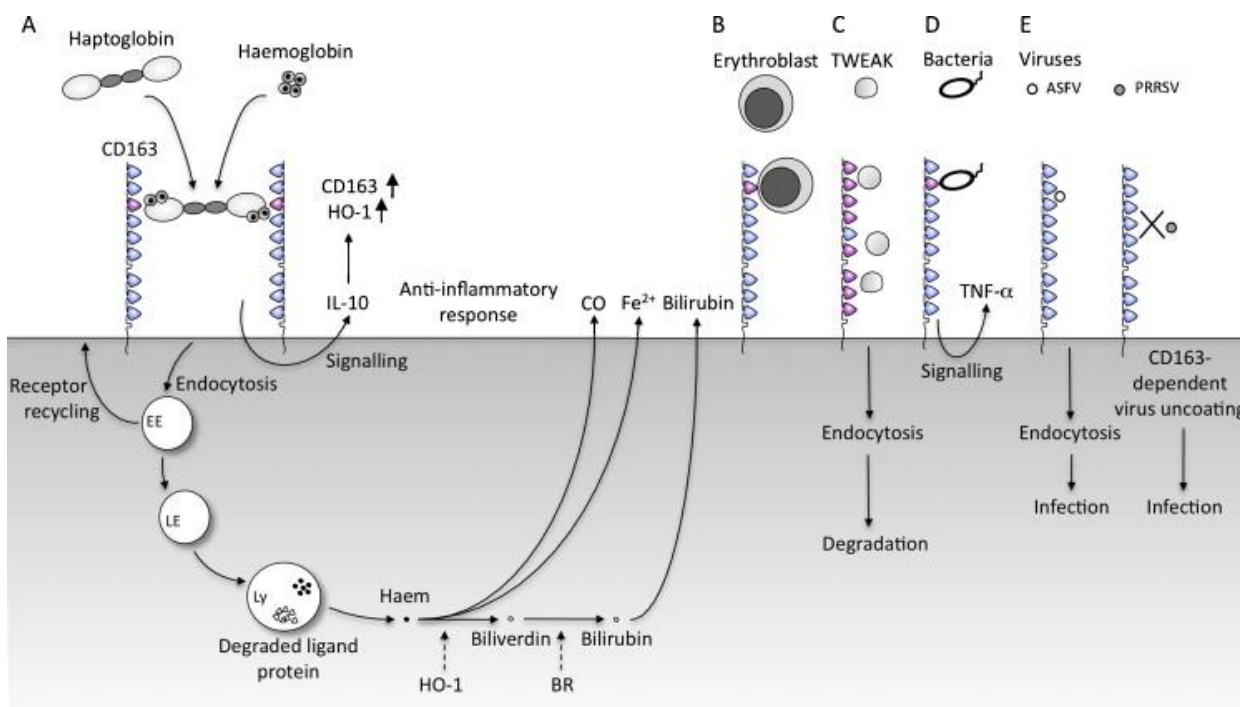
**Obr. 1: Základní rozdělení scavenger receptorů a zástupci jednotlivých skupin** (Plüddemann a kol., 2007). Skupina **A**: membránové glykoproteiny uskupené do trimerů; tvořeny cytoplazmatickým výběžkem, membránovým úsekem,  $\alpha$ -helixy uspořádanými do *coiled coil* struktury, kolagenní doménou a SRCR doménou. SR-AI a SR-AII (izoformy), MARCO (makrofágní receptor s kolagenní strukturou), SCARA-5, SRCL (scavenger receptor s lektinovou doménou typu C). Skupina **B**: CD36 a SR-BI- oba mohou tvořit dimery či multimery; jsou hojně glykosylovány či acetylovány. Skupina **C**: dSR-CI- SR u *Drosophily melanogaster*, exprimován v makrofázích a hemocytech během embryonálního vývoje. Skupina **D**: CD68- vyskytuje se především v pozdních endozomech a lysozomech u makrofágů. Skupina **E**: LOX-1- receptor pro oxidovaný LDL. Skupina **F**: SREC- pravděpodobně zapojen do buněčné signalizace, Skupina **G**: SR-PSOX- váže oxidovaný LDL a fosfatidylserin. Skupina **H**: FEEL-1- hojně exprimován v různých endotelálních buňkách.

Skupina A (SR-A) se vyznačuje přítomností tzv. SRCR (*cysteine-rich*) domény, evolučně konzervovaného proteinového motivu vyskytujícího se u řady proteinů s rozdílnou biologickou funkcí (Sarrias a kol., 2004). Nachází se u odlišných živočišných kmenů od houbovců (*Porifera*) (Blumbach a kol., 1998), přes členovce (*Arthropoda*) (Gorman a kol., 2000) až ke strunatcům (*Chordata*), savčí druhy nevyjímaje (Holm a kol., 2009). Zatímco genom mořské ježovky *Strongylocentrotus purpuratus* obsahuje SRCR doménu v1095 kopiích, kódovaných 218 geny, lidský genom čítá pouhých 81 kopií, zapsaných v 16 genech (Rast a kol., 2006). Hojné zastoupení SRCR domény v genomu ježovky vypovídá o její důležitosti u nižších živočichů, a to pravděpodobně ve vrozené imunitě (Ojala a kol., 2007).

SRCR doména je extracelulární doména tvořená ~100- 110 aminokyselinovými zbytky. Existují dva typy SRCR domén, lišící se množstvím cysteinových zbytků a počtem exonů, které SRCR doménu kódují. Podle typu SRCR domény pak rozlišujeme dvě SRCR proteinové rodiny (SRCR-SF, *superfamily*). Zatímco skupina A obsahuje SRCR doménu se šesti cysteinovými zbytky a kódovanou dvěma exony, skupina B obsahuje SRCR doménu s obvykle osmi cysteiny a kódovanou pouze jedním exonem. Zástupci skupiny A jsou většinou mnohodoménové proteiny s jedinou SRCR doménou spojenou s dalšími funkčními doménami, jako například doménami proteáz či kolagenními doménami. Zástupci SRCR-SF B se skládají z tandemu několika opakujících se SRCR domén, který může být dále spojen například s CUB nebo ZP (*zona pellucida*) doménou, nikdy však s doménou proteáz (Sarrias a kol., 2004).

Významným zástupcem SRCR-SF rodiny je savčí scavenger receptor CD163 (Law a kol., 1993). CD163 je exprimován pouze v buňkách linie monocytů/makrofágů a jeho exprese je regulována protizánětlivými (zvýšení exprese CD163) a prozánětlivými (snížení exprese CD163) signály (Van Gorp a kol., 2010). CD163 obsahuje devět SRCR domén, následovaných transmembránovou doménou a krátkým cytoplazmatickým úsekem, jenž podléhá alternativnímu sestřihu (Law a kol., 1993; Ritter a kol., 1999). CD163 zastává několik důležitých funkcí (viz Obr. 2). Slouží jednak jako receptor hemoglobinu vázaného v komplexu s haptoglobinem (Hb-Hp komplex) (Kristiansen a kol., 2001), dále jako adhezni receptor červených krvinek (Fabriek a kol., 2007), receptor pro TWEAK- faktor nádorové nekrózy (TNF) (Moreno a kol., 2009) a v neposlední řadě jako receptor různých patogenů (Fabriek a kol., 2009; Van Gorp, 2009). Navázání ligandu na CD163 receptor může vyvolat endocytózu zprostředkovanou receptorem (RME) či spustit signalizační kaskádu vedoucí

k sekreci signalizačních molekul. Jako imunomodulátor slouží CD163 jak ve formě membránového proteinu, tak ve formě rozpustné, jejíž hladina v patologických podmínkách významně narůstá (Van Gorp a kol., 2010).



**Obr. 2: Schématické znázornění různých funkcí scavenger receptoru CD136** (Van Gorp a kol., 2010). **A:** CD163 jako receptor pro Hb-Hp komplex. Hemoglobin se po hemolýze červených krvinek váže na haptoglobin, čímž vznikne nový epitop interagující s třetí SRCR doménou CD163. Touto interakcí dochází za prvé k signalizaci spouštějící produkci interleukinu IL-10, a následnou zvýšenou upregulací hemoxigenázy 1 (HO-1) a CD163, a za druhé k endocytóze Hb-Hp komplexu prostřednictvím klatrinových váčků (nejsou na obrázku znázorněny). Hb-Hp putuje přes endozomy do lysozomů, kde proteinové složky hemoglobinu degradují a hemové skupiny jsou rozloženy enzymem HO-1 na protizánětlivé molekuly (biliverdin, Fe<sup>2+</sup> a CO). **B:** CD163 jako adhezivní receptor červených krvinek. Interakcí s erytroblasty přispívá k jejich růstu a přežívání během erythropoézy. **C:** CD163 jako receptor pro TWEAK (*tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis*). TWEAK je nádory nekrotizující faktor, který indukuje apoptózu prostřednictvím interakce s TNF receptorem **D a E:** CD163 jako receptor pro patogeny. Navázáním bakterie na CD163 dochází k indukci produkce prozánětlivých cytokinů. Virus ASFV (*African Swine Fever virus*) je po navázání na CD163 endocytován makrofágy, zatímco virus PRRSV (*porcine reproductive and respiratory syndrome virus*) s CD163 interaguje pouze vnitrobuněčně- v časných endocytech, kde CD163 zajišťuje odpláštění viru.

## 1.2. Scavenger receptory u parazitů

Ačkoliv bylo v souvislosti s parazity zkoumáno pouze několik scavenger receptorů, ukazuje se, že zastávají podstatné role v jejich životních cyklech. Parazité ve svých strategiích využívají nejen vlastní, ale i hostitelské SR. SR mohou zásobovat parazity potřebnými lipoproteiny, plnit funkci ve vývoji parazitů, pomáhat patogenům uniknout před hostitelskou imunitní odpovědí, nebo naopak imunitní reakce vyvolávat u parazitů přenášejících původce

onemocnění. Příkladem scavenger receptoru patrně zodpovědného za příjem hostitelských mastných kyselin a sterolů je CD36 u krevničky *Schistosoma mansoni* (Smith a kol., 1970). Tento SR sehrává pravděpodobně roli nejen v příjmu hostitelských lipoproteinů, nutných pro tvorbu membrán, růst a vývoj (Rigotti a kol., 1995), ale též při maskování motolice před imunitním systémem navázáním hostitelských LDL molekul na jejím povrchu (Furlong a kol., 1992, Dinguirard a Yoshino, 2006). Scavenger receptor PxSR v oocytech *Plasmodia berghei*, je nezbytný pro vývoj sporozoitů. Jedná se o unikátní mnohodoménový protein, složený z kombinace odlišných proteinových modulů, včetně SRCR domény (Claudianos a kol., 2002). SR Sp22D, exprimovaný v hemocytech, tukových těliscích a střevních epiteliálních buňkách komára *Anopheles gambiae*, přenašeče původce malárie *P. falcipara*, plní pravděpodobně úlohu v imunitě. Tento mnohodoménový receptor je tvořen dvěma doménami vázícími chitin, mucinovou doménou, dvěma LDL receptory a dvěma SRCR doménami (Danielli a kol., 2000, Gorman a kol., 2000).

Mezi hostitelské scavenger receptory, potřebné pro parazitické strategie, patří například SR-BI nebo CD36. První zmíněný, SR-BI, využívají některé druhy *Plasmodia*, jmenovitě *P. falciparum*, *P. yoelii* a *P. berghei* (Acton a kol., 1996) jak při samotné nákaze sporozoity, tak ve vývoji parazita uvnitř jaterních buněk (Rodrigues a kol., 2008). SR-BI je vysoce glykosylovaný membránový protein na povrchu hepatocytů (Acton a kol., 1996), prostřednictvím něhož dochází ke zvyšování obsahu cholesterolu v plazmatické membráně. Pozměněné vlastnosti membrány usnadní seskupování tetraspaninu CD81 do membránových mikrodomén (Silvie a kol., 2006) a membrána se tak stává kompatibilnější k proniknutí sporozoitů dovnitř buňky. SR-BI se pravděpodobně také nepřímo podílí na následném přísunu mastných kyselin a cholesterolu do parazitoformní vakuoly (Mikolajczak a kol. 2007). Druhý zmíněný SR, CD36, je epiteliální buněčný receptor, který váže červené krvinky napadené *P. falciparum*. Infikované erytrocyty se tak přilnou k cévnímu endotelu a nemohou být fagocytovány a splaveny do sleziny (Franke-Fayard a kol., 2005).

### 1.3. Klíšťata a jejich scavenger receptory

Klíšťata představují významné krevsající ektoparazity, neboť přenáší řadu patogenů, jakými jsou arboviry, rickettsie, spirochéty a prvoci. Taxonomicky se řadí do kmene členovců (*Arthropoda*), třídy pavoukoců (*Arachnida*), řádu roztočů (*Acari*) a podřádu klíšťatoců



(*Ixodida*), zahrnujícího čeledi *Argasidae* (tzv. *soft ticks*, měkká klíšťata) a *Ixodidae* (tzv. *hard ticks*, tvrdá klíšťata) (Nava a kol., 2009). Zatímco *Argasidae* sají na hostiteli řádově minuty až hodiny několikrát za své životní stádium, *Ixodidae* sají po dobu několika dní jen jednou za své životní stádium.

Evropské klíště obecné, *I. ricinus*, zástupce čeledi *Ixodidae*, je přenašečem původců onemocnění, zahrnující lymeskou boreliózu, encefalitidu či babeziózu (Jongejan a Uilenberg, 2004). *I. ricinus* prochází třemi vývojovými stádii (larva, nymfa, dospělec), z nichž všechna sají na hostiteli, vyjímaje samce, kteří krev nepřijímají. Ke kopulaci dochází na hostiteli před dokončením sání samic. Samice umírají několik dní po vykladení vajíček (Coons a Alberti, 1999). Šestinohá larva saje na drobných hlodavcích a ptácích, osminohá nymfa na větších obratlovcích a samice nejčastěji na lesní zvěři nebo jiných větších savcích, přičemž člověk může být hostitelem všech tří stádií. Celý životní cyklus trvá dva až tři roky (Parola a Raoult, 2001). Důležitou roli pro úspěšné dokončení sání klíštěte plní směs antikoagulačních, protizánětlivých a imunosupresivních proteinů a bioaktivních látek, která je vpravená ze slinných žláz do krve hostitele (Sauer a kol., 2000).

Scavenger receptory u klíšťat nejsou dosud příliš prozkoumány. Analýzou dostupných dat genomové a EST (*expressed sequence tags*) databáze lze identifikovat nejméně tři scavenger receptory klíštěte *I. scapularis*: Is-SRP- špatně anotovaný jako *Ixodes scapularis trypsin, putative mRNA* (GenBank XM 002434342), Is-SCRC receptor 2 (NCBI GenBank EST transcript ISCW010239) a Is-SRP-2-lysyl oxidáza EW898064.1 (NCBI GenBank EST transcript ISCW010239). Mezi popsané klíštěcí SR patří HISRB u klíštěte *Haemaphysalis longicornis*. HISRB vykazuje 30% shodu se savčími a hmyzími SR-B receptory. Jeho exprese byla prokázána ve střevě, slinných žlázách, vaječnicích, tukových těliscích a hemocytech částečně nasátých samic. Na základě sérií pokusů s jednou nebo dvojitou aplikací dsRNA pro HISRB (dsSRB), vitellogenin-1 (dsV-1) a receptor vitellogeninu (dsVR) klíšťatům v různých kombinacích a posloupnostech, byla prokázána klíčová role HISRB pro indukci RNA interference. Pokud byla klíšťatům aplikována pouze dsSRB, *knock-down* (utlumení exprese genu) vedl k značnému poklesu tělesné váhy nasátých samic. V případě, že byla nejprve nainjikována dsV-1 či dsVR a za následujících 96 hod dsSRB, došlo k výrazné změně fenotypů následkem umlčení obou genů (vliv na sání a úmrtnost); *knock-down* byl též ověřen na proteinové úrovni pomocí imunolokalizace. V obráceném pořadí injikací byl *knock-down* prokázán pouze u HISRB, nikoli však u vitellogeninu či receptoru pro vitellogenin. Z toho

vyplývá, že umlčením genu pro H1SRB nemohla být do buněk dopravena dsRNA pro další geny a nedošlo tak k jejich *knock-downu* (Aung a kol., 2011).

#### 1.4. Vnitrobuněčné trávení a přenos patogenů u klíšťat

Pro klíšťata je hostitelská krev jediným zdrojem energie a živin. Trávení krevních proteinů je přitom klíčovým fyziologickým procesem zajišťujícím klíšťatům aminokyseliny pro veškeré proteosyntetické procesy, zejména pro tvorbu vaječné snůšky. Dospělá klíšťata z čeledi *Ixodidae* sají po delší dobu několik dní a samotné trávení probíhá v kyselém prostředí uvnitř buněk střevního epitelu. Střevní lumen, na rozdíl od krevsajícího hmyzu, zřejmě slouží jen k dlouhodobějšímu uskladnění nasáté krve a její ochraně před aktivními trávicími proteázami (Grandjean a kol., 1973; 1975; Sonenshine, 1991). Procesy sání a trávení hostitelské krve zároveň představují důležitou fyziologickou bránu pro vstup klíšťaty přenášených patogenů do klíštěcího přenašeče.

Jak bylo popsáno u primární kultury střevních buněk klíštěte *Boophilus microplus* (Lara a kol., 2005), příjem dvou hlavních krevních proteinů, hemoglobinu a albuminu (až 80% proteinového obsahu krve), trávicími buňkami může probíhat dvěma způsoby. Zatímco je albumin endocytován nespecificky pinocytózou a posléze směřován do populace malých kyselých váčků, hemoglobin je pravděpodobně rozpoznáván specifickým receptorem na povrchu trávicích buněk a směřován do mnohem větších endozomů. V trávicích vezikulách je hemoglobin postupně odbouráván multienzymovou kaskádou, zahrnující cysteinové a aspartové proteázy, na oligopeptidy, dipeptidy až volné aminokyseliny, uvolněné do cytoplazmy (Sojka a kol., 2013). Nепroteinové složky hemoglobinu, hemové skupiny, se shlukují ve speciálních organelách, hemozomech, čímž je buňka pravděpodobně chráněna před jejich toxicitou (Graca-Souza a kol. 2006). Receptorem zprostředkovaná endocytóza a postupná dráha zpracování hemoglobinu vznikla pravděpodobně z důvodu kontroly a ochrany před těmito hemovými skupinami, uvolněnými během trávení hemoglobinu (Lara a kol., 2003). Ačkoliv jsou již od 80. let minulého století v trávicích buňkách sajících samic klíštěte popisovány klatrinové váčky, konkrétní receptor pro hemoglobin (analogický savčímu CD163) nebyl dosud identifikován (Sojka a kol., 2013).

Klíšťata v roli přenašečů původců onemocnění se před patogeny potřebují sami chránit různými obrannými mechanismy, zahrnující jak buněčnou, tak humorální imunitní odpověď (Kopáček a kol., 2010). Přenášené patogeny musí čelit těmto imunitním mechanismům a být schopny v klíštěti přežít dlouhé období mezi dvěma sáními. Nejvhodnějším místem pro jejich perzistenci a množení je střešní lumen, v němž nejsou vystaveny působení trávicího enzymatického aparátu klíštěte (Hajdušek a kol., 2013, Sojka a kol., 2013). Aby se patogeny mohly přenést na nového hostitele, musejí být schopny proniknout střešní stěnou do hemolymfy a z ní do periferních tkání- slinných žláz, eventuálně vaječníků (v případě transovariálního přenosu), přičemž přechod mezi těmito kompartmenty by mohl být alespoň zčásti zprostředkován makromolekulárními receptory (Pal a kol., 2004).

## 2. Cíle práce

1. Získání celé mRNA/cDNA sekvence scavenger receptoru IrSRP-1 z klíštěte *Ixodes ricinus*, jehož fragment byl identifikován z genomu příbuzného klíštěte *Ixodes scapularis* na základě homologie se savčím hemoglobinovým receptorem CD163.
2. qRT-PCR profily transkripce *IrSRP-1* genu.
3. Klonování, exprese, purifikace a biochemická charakterizace rekombinantního fúzního proteinu- trypsinové peptidázy IrSRP-1.
4. Příprava polyklonálních protilátek imunizací králíka rekombinantním IrSRP-1; izolace IgG frakce králíčího séra a její afinitní purifikace. Western-blot profil exprese a imunolokalizace IrSRP-1 v různých tkáních *I. ricinus*.
5. RNAi- příprava dvouvláknové RNA z fragmentu *IrSRP-1* genu, její aplikace klíšťatům a vyhodnocení IrSRP-1 RNAi fenotypů- vliv na hmotnost, přežívání, vykladení a líhnutí larev *I. ricinus*.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Chov klíšťat *I. ricinus*

Klíšťata byla sbírána vlnkováním v okolí Českých Budějovic. Uchovávána byla ve skleněných nádobkách v boxech se stálou teplotou vzduchu 25-26 °C, relativní vlhkostí vzduchu ~ 90 % a fotoperiodou L:D 12:12 v laboratorním chovu Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích. Klíšťata sála na laboratorních morčatech uvnitř pryžového kloboučku shora uzavřeného síťovinou.

#### 3.2. Příprava vzorků: pitva klíšťat, izolace RNA, syntéza cDNA, vzorky pro SDS-PAGE elektroforézu a Western blot

Nejprve byla klíšťatům po odstřížení části končetiny odebrána hemolymfa. Jednotlivé tkáně byly pitvány pod binokulárním stereomikroskopem (Stemi DV4, Zeiss). Tkáně byly promyty v PBS a dále zpracovány pro Western blot či syntézu cDNA, nebo byly uchovány v -80 °C.

Z vypitvaných tkání byla izolována celková RNA pomocí sady NucleoSpin® RNA II kit (MACHEREY-NAGEL), která sloužila jako templát pro syntézu cDNA (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche).

cDNA sady byly připraveny pro následující qRT-PCR profily:

- Tkáňový profil: střevo, slinné žlázy, vaječníky, hemolymfa, tracheje, malpighické trubice a zbytek; mRNA byla izolována z polonasátých samic (6 dnů sání).
- Profil transkripce u stádií se zohledněnou dynamikou sání- vajíčka, ne/nasáté larvy, ne/nasáté nymfy, nenasáté samice, samice po 6 dnech sání, plně nasáté samice.
- Profil transkripce během umělého membránového sání na krvi vs. krevním séru: nenasáté samice, 3 dny sání, 5 dnů sání, plně nasáté, 2 dny po sání, 6 dnů po sání. Klíšťata sála *in vitro* přes silikonové membrány podle postupu popsání Kröberem a Guerinem (2007). Samice byly odděleně krmeny kompletní kravskou krví nebo samotným krevním sérem.
- Profil transkripce v reakci na patogeny: *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Borrelia afzelii*; kontrola: injekce PBS a žádná injekce; nenasáté samice byly injikovány dávkou 10 000 patogenů a po 12 hodinách se z nich izolovala mRNA.

Každá cDNA sada byla připravena z 5 klíš'at. U všech profilů, vyjímaje profil transkripce dynamiky sání na krvi vs. krevním séru (nedostatek biologického materiálu), byly použity biologické triplikáty.

Tkáně určené pro SDS-PAGE elektroforézu a Western blot byly homogenizovány v mikrozkuhavce plastovým homogenizátorem a 10 min povařeny ve vzorkovém pufru (2x Laemmlí Sample Buffer, BioRad) ve 100 °C. Standardně se používalo ředění odpovídající zhruba 1/5 střeva a 2/3 vaječníků, trachejí nebo malpighických trubic z 1 samice na jednu jamku.

### 3.3. PCR reakce

V Tab. I jsou uvedeny použité primery.

Tab. I: Seznam použitých PCR primerů.

<b>3' RACE PCR</b>	
<b>GSP1:</b>	5'- CAG CCG CAC GGA ACG CTC C -3'
<b>GSP2:</b>	5'- GAC GAG TGC CGC ACC CAG C -3'
<b>CDS III/3' PCR</b>	5'- ATT CTA GAG GCC GAG GCG GCC GAC ATG- d(T) -3'
<b>5' RACE PCR</b>	
<b>1.</b>	
<b>GSP1:</b>	5'- CAGAGTCCGTGCCTTCT -3'
<b>GSP2:</b>	5'- TTC TTA TCT CCA GCC TTC CG -3'
<b>GSP3:</b>	5'- CGA GTC GCT CGT CCG ACC CG -3'
<b>2.</b>	
<b>GSP1:</b>	5'- TTC TTA TCT CCA GCC TTC CG -3'
<b>GSP2:</b>	5'- CGG AGA GCG AGT GGG GTC CC -3'
<b>GSP3:</b>	5'- TTG CAC AGC AGG TAG AAG G -3'
<b>qRT PCR</b>	
<b>Fwd qRT</b>	5'- GAC GAC TTC GGA CAT ATG GAA -3'
<b>Rev qRT</b>	5'- GCT TTG TGC GGG CTA CTG -3'
<b>Rekombinantní protein</b>	
<b>Fwd pET100</b>	5'- <u>CAC</u> CAT TGT GGA CGG CGT GCC C-3'
<b>Rev pET100</b>	5'- GCA GTA TTT TAA TAC TGG CTC AGG AGT TCC AC-3'
Podtržená je přidaná sekvence pro směrové pET klonování.	
<b>dsRNA pro RNAi</b>	
<b>Fwd RNAi</b>	5'-ATG <u>GGC CCG</u> GTC CTA TCT GGC TGG ACA A -3'
<b>Rev RNAi</b>	5'-CAT <u>CTA GAT</u> GAT CCA TCT GTG GCT GGT A -3'
Podtržená jsou restriční místa pro ApaI a XbaI.	

PCR reakce byly standardně prováděny s Taq DNA polymerázou (TopBio) a cDNA templátem ze střev plně nasátých samic; teplota nasedání primerů byla určována experimentálně použitím gradientové PCR. PCR reakce probíhaly ve 30 nebo 35 cyklech.

PCR produkty byly separovány prostřednictvím elektroforézy v agarózovém gelu (1% agaróza v TAE pufru; ethidium bromid 0,5 µg/ml) probíhající při konstantním napětí 100V cca 30 min. PCR produkty byly zviditelněny UV zářením v UV transiluminátoru.

*Pro rapid amplification of cDNA ends (RACE)*, neboli metodu umožňující amplifikaci 5' a 3' konců cDNA o neznámé sekvenci, byla jako vstupní templát použita mRNA z plně nasátých samic *I. ricinus*. Sekvence 3' konce byla získána pomocí 3' RACE PCR modifikací protokolu pro SMART<sup>TM</sup> cDNA Library Construction Kit (Clontech, Takara) s použitím CDS III/3' PCR primeru jako *anchor* (kotevního) primeru pro přípravu prvního vlákna (fs)-cDNA reverzní transkripcí a genově specifických primerů GSP1 a GSP2 jako *reverse* primeru v prvním a druhém kole *nested* PCR. 5' RACE PCR byla provedena pomocí 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Lifetechnologies) dle pokynů výrobce. Pro PCR *dC-tailed* cDNA (cDNA s připojeným polyC) byla použita Phusion® High-Fidelity DNA polymeráza (New England BioLabs) a pro *nested* PCR Taq-Purple DNA polymeráza (TopBio). Použité primery jsou uvedeny v Tab. I.

Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) byla provedena pro relativní kvantifikaci mRNA. Navržené primery (sekvence v Tab. I) byly před samotnou qRT-PCR testovány na specifčnost. Reakce byly provedeny v technických triplikátech. Reakční směsi byly namíchaný s použitím reakčního mixu LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) a PCR reakce (50 cyklů, teplota nasedání primerů: 60 °C) probíhaly v přístroji LightCycler® 480 System (Roche). Průběh reakce a výsledné Ct hodnoty byly získány pomocí programu LightCycler® 480 Software release 1.5.0 SP4 (Roche) a data byla vyhodnocena metodou dle Pfaffla (Pfaffl, 2001). Relativní hladina *IrSRP-1* byla normalizována relativní hladinou referenčního (tzv. *housekeeping*) genu, elongačního faktoru 1 (EF1).

### 3.4. Klonování a sekvenování PCR produktů

PCR produkt o dané velikosti byl vyříznut z gelu a přečištěn pomocí Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche). S použitím TA Cloning® Kit for Sequencing (Lifetechnologies) byl přečištěný PCR produkt ligován do vektoru pCR<sup>TM</sup>4-TOPO®. Plazmid byl teplotním šokem (42 °C) transformován do kompetentních buněk One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Lifetechnologies) a buňky byly po kultivaci (220 RPM, 1 hod při 37 °C) v S.O.C. médiu (Lifetechnologies) vysety na selektivní agarovou půdu (1,5 % bacto-agar v LB médiu,

ampicilin 100 µg/ml) a inkubovány přes noc ve 37 °C. Jednotlivé kolonie bakterií byly rozpuštěny ve 30 µl sterilní vody a 1 µl těchto alikvotů byl použit jako templát do 10 µl PCR reakcí s identickými primery o 25-30 cyklech. PCR reakcí ověřené pozitivní klony byly z příslušných alikvotů inokulovány do 4 ml LB/*amp* média (LB médium: 1 % trypton, 0,5 % kvasnicový extrakt, 0,5 % NaCl, pH 7.0; ampicilin- *amp*: 100 µg/ml) a inkubovány přes noc (220 RPM, 37 °C). Plazmidová DNA byla po izolaci z buněk pomocí High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) sekvenována příslušnými sekvenačními primery v Laboratoři genomiky Biologického centra AV ČR.

### 3.5. Příprava rekombinantního fúzního proteinu

Pro expresi domény trypsinové proteázy IrSRP-1 jako rekombinantního fúzního proteinu s N-terminálním 6x(His)-značením (rIrSRP-1) byl amplifikován 767 bp velký úsek *IrSRP-1* s použitím cDNA templátu ze střev plně nasátých samic *I. ricinus* a primerů (Tab. I) pro směrové klonování do expresního vektoru pET100/D- TOPO® pomocí Champion pET directional expression kit (Lifetechnologies). Plazmid transformovaný nejprve do buněk *E. coli* TOP10 (Lifetechnologies) byl po ověření PCR reakcí a sekvenováním (kapitola 3.4.) transformován do kompetentních buněk *E. coli* One Shot® BL21 Star™ (DE3) (Lifetechnologies). Transformované buňky byly kultivovány v 10 ml LB média s ampicilinem (*amp*, 100 µg/ml) při 37 °C přes noc. Tímto inokulem bylo naočkováno 400 ml LB/*amp* média obsahujícího 20mM D-glukózu (Sigma-Aldrich). Po kultivaci (180 RPM, 4 hod při 37 °C) ve 2 litrových inkubačních lahvích v rotačním inkubátoru Innova 4010 R (New Brunswick) a dosažení optické hustoty OD<sub>600</sub>= 0,6-0,8 byly buňky sedimentovány centrifugací (3000x g, 10 min) a znovu rozpuštěny ve stejném objemu LB média, avšak bez antibiotika, s přidáním IPTG (isopropyl β-D-galactopyranoside, Lifetechnologies; konečná koncentrace 0,5 mM) a inkubovány přes noc (180 RPM, 30 °C). Následující den byly centrifugací sedimentované buňky (3500x g, 10 min) rozpuštěny v lyzačním pufru (20mM Tris/HCl, pH 8.0; 4 ml pufru na 100 ml původní bakteriální kultury), sonifikovány (3x 30 s, střední amplituda) a centrifugovány (10000x g, 10 min při 4 °C). Supernatant (cytosolová frakce) byl odebrán a pelet byl rozpuštěn ve stejném objemu izolačního pufru (2M močovina, 20mM Tris/HCl, 0,5M NaCl, 10mM imidazol, 2% Triton X-100), sonifikován a centrifugován (10000x g, 10min při 4 °C). Krok zahrnující rozpouštění, sonifikaci a centrifugaci v izolačním pufru byl celkem třikrát opakován. Získaný pelet byl označen jako membránová frakce a výsledný pelet jako izolovaná inkluzní tělíska. Pelet byl rozpouštěn po



dobu 1 hod v 10 ml solubilizačního pufru (6M guanidin hydrochlorid, 100mM Tris/HCl, 0,5M NaCl, 10mM imidazol, 2mM  $\beta$ - merkaptoetanol, pH 8.0) při laboratorní teplotě na magnetické míchačce. Nerozpuštěný sediment byl odstraněn po centrifugaci (16000x g, 5 min) a supernatant byl dále filtrován pomocí 0,45 $\mu$ m PVDF membránového filtru nasazeného na injekční stříkačku (Millipore). Rekombinantní protein byl z takto připraveného vzorku přečištěn chelatační chromatografií, založené na afinitě kobaltnatých iontů k 6x(His) značenému rIrSRP-1, pomocí přístroje ÄKTA FPLC (GE Healthcare). Kolona (Hi-Trap™ IMAC FF, GE Healthcare) byla po nabití 50mM CoCl<sub>2</sub> a promytí sterilní vodou ekvilibrována puftrem (20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5M NaCl, 8M močovina, pH 8.0). Nanesená frakce inkluzních tělísek byla promyta 50 ml promývacího pufru (20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5M NaCl, 8M močovina, 20mM imidazol, pH 8.0) a rekombinantní protein byl z kolony uvolňován elučním puftrem (20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5M NaCl, 8M močovina, pH 8.0) v probíhajícím lineárním gradientu 0,01-0,5M imidazolu. Odebrané 1ml frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy (kapitola 3.7). Frakce obsahující rIrSRP-1 byly použity pro renaturaci (refolding) nebo byly uskladněny ve 4 °C. Refolding rekombinantního proteinu probíhal ve 4 °C po 12 hod během 5 dnů v renaturačním pufru (50mM Tris/HCl, 150mM NaCl, 2mM  $\beta$ -merkaptoetanol a různě koncentrovaná močovina). Každý následný den byla skokově snížena koncentrace močoviny v dialyzačním pufru (4M, 2M, 1M a 0,5 M) a poslední den probíhala dialýza v renaturačním pufru bez močoviny a pouze s 1mM  $\beta$ -merkaptoetanolem. Dialyzovaná směs byla centrifugována (16000x g, 5 min) a rekombinantní protein byl koncentrován (20x) na 15 ml centrifugačních filtrech (MW cut-off 10 kDa; Amicon, Millipore). Refoldovaný a koncentrovaný rIrSRP-1 byl přečištěn (ÄKTA FPLC, GE Healthcare) gelovou filtrací na koloně Superdex 75 (GE Healthcare) v pufru (20mM Tris/HCl, 150mM NaCl, 2mM  $\beta$ - merkaptoetanol), přičemž frakce vykazující absorpci při UV 280 nm byly analyzovány SDS-PAGE elektroforézou. Pozitivní frakce byly použity pro imunizaci králíka nebo byly testovány na trypsinovou aktivitu pomocí univerzálního substrátu proteáz, barevně (resorufin) značeného mléčného kaseinu (Universal Protease Substrate, Roche) při 574 nm absorpční a 584 nm emisní optické vlnové délce na mikrodestičkovém fluorimetru Infinite 200 M (Tecan).

### 3.6. Příprava a afinitní čištění IrSRP-1 protilátky

Laboratorní králík byl imunizován čtyřmi dávkami rekombinantního proteinu IrSRP-1 smíchaného s nekompletním Freudovým adjuvans v poměru 1:1 ve 14 denním intervalu. Krev z imunizovaného králíka se ponechala srážet nejprve 2 hod při laboratorní teplotě a pak přes noc ve 4 °C. Po centrifugaci krve (860x g, 15 min při 4 °C) bylo odebráno sérum, z něhož byla izolována IgG frakce následující procedurou: Sérum bylo smícháno s 50mM Na acetátovým pufrem (pH 4.0) v poměru 1:2 a za stálého míchání byla postupně přidávána kyselina kaprylová (75 µl po 3 min do konečné koncentrace 25 µl kyseliny kaprylové/ ml směsi). Srážení probíhalo dalších 90 min při laboratorní teplotě. Směs byla centrifugována (5000x g, 10 min), supernatant přefiltrován přes filtrační papír a přes noc dialyzován ve 2 litrech 5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> při 4 °C. Takto získaná IgG frakce byla uchována v -20 °C nebo ve 4 °C (s přidáním 0,02% azidem) k následné spotřebě.

Protilátka byla z IgG frakce izolována afinitní chromatografií následujícím postupem: 0,5 g lyofilizované CNbr.- aktivované sefározy 4B (Amersham Pharmacia Biotech AB) bylo nabobtnáno ve 20 ml 1mM HCl. Po 30 min míchání byla sefároza na skleněné fritě promyta 500 ml 1mM HCl a následně vazebným roztokem B2 (0,5M NaCl, 100mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.3). Sefároza v 6 ml vazebného roztoku byla odebrána a 2 hod inkubována spolu s rekombinantním proteinem, rozpuštěným v 6 ml B2 pufru (200 µg/ml) po předchozí 2 hod dialýze, na rotačním inkubátoru při laboratorní teplotě. Směs byla centrifugována (40x g, 5 min) a sefároza s navázaným rekombinantním proteinem byla blokována v blokovacím médiu (0,2M glycin, pH 8.0) přes noc ve 4 °C. Následující den byla směs centrifugována (40x g, 5 min) a pelet promíchán ve 30 ml B2 pufru. Následovalo opakované promývání pufrů B2 a B3 (0,5M NaCl, 0,1M octan amonný, pH4), které bylo provedeno celkem pětkrát. Přečištěný pelet byl promíchán ve 20 ml sterilního PBS a nanesen na kolonu (Poly-Prep Chromatography Columns, BioRad). V chladové místnosti (4 °C) byla směs promyta dalšími 50 ml PBS. Po promytí byla postupně přidávána IgG frakce (273 µg/ml, celkem 7 ml)- cca 1ml/min. Z kolony byly nejprve vymyty nenavázané protilátky 50 ml PBS a pak byly 8 ml elučního pufru (0,15M NaCl, 0,2M glycin, pH 2.2) vymývány protilátky vázané na rekombinantní protein, přičemž byly odchyťvány 1ml frakce, okamžitě neutralizované 65 µl 1M Tris base (pH 9.5). Frakce byly vyhodnoceny spektrofotometricky Bradfordovou metodou a frakce s naměřenou optickou hustotou OD<sub>595</sub> > 0,1 byly po přidání 0,02% azidu uchovány ve 4 °C.

IgG frakce a přečištěná protilátka byly testovány pomocí metody dot-blot. Rekombinantní protein (rIrSRP-1 v 8M močovinně přečištěný chelatační chromatografií) ředěný 1:5 v každém následujícím vzorku byl nanesen po kapkách (1  $\mu$ l) na nitrocelulóзовou membránu (Whatman). Po zaschnutí byla membrána půl hodiny blokována (5 % sušené mléko v PBS-0,05% Tween), hodinu inkubována s primární protilátkou a po promytí v PBS- 0,05 % Tween (5 krát po 5 min) inkubována 1 hod se sekundární protilátkou s konjugovanou křenovou peroxidázou (SwAR/Px, Sevapharma a.s.). Po promytí byly protilátky vázané na rekombinantní protein detekovány buď kolorimetricky DAB substrátovým roztokem (0,035% 3,3'- diaminobenzidinu v 0,1M Tris/HCl, pH 7.5 s přidáním 1 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/1 ml roztoku) nebo chemiluminiscenčně ECL substrátem (BioRad) v ChemiDoc™ MP imager (BioRad).

### 3.7. SDS-PAGE elektroforéza a Western blot

Denaturované tkáňové hemogenáty (kapitola 3.2) byly elektroforeticky separovány v gradientovém gelu 4-15% Criterion™ TGX Stain-Free™ Precast gel (BioRad) a Tris/Glycine SDS pufru (BioRad) při konstantním napětí 300 V po dobu 20 min. Tyto gely obsahují trihalové složky, které po ozáření UV zářením reagují s tryptofanovými zbytky, čímž je umožněna fluorescenční detekce proteinů. K vizualizaci byl použit ChemiDoc™ MP imager (BioRad). Western blot byl prováděn s blotovací sadou Trans-Blot Turbo™ Midi Nitocellulose Transfer Pack (BioRad) a probíhal v přístroji Trans-Blot® Turbo™ Blotting system (BioRad) při napětí 25 V, proudu 1,3 A po dobu 7 min. Přenesené proteiny byly vizualizovány stejným principem jako u výše zmíněných gelů v ChemiDoc™ MP imager (BioRad). Membrána byla nejprve půl hodiny blokována v blokovacím pufru (5 % sušené mléko v PBS- 0,05 % Tween) a poté 2 hod inkubována s primární protilátkou proti IrSRP-1 (ředění 1:100, počáteční koncentrace: 80  $\mu$ g/ml) a 1 hod se sekundární protilátkou (ředění: 1:2000; SwAR/Px, Sevapharma a.s.). Obě protilátky byly ředěny v blokovacím roztoku a po jejich vázání byla membrána vždy řádně promyta v PBS- 0,05 % Tween (5 krát po 5 min). Proteiny s navázanými protilátkami byly chemiluminiscenčně detekovány ECL substrátem (BioRad) v ChemiDoc™ MP imager (BioRad) a vyhodnoceny pomocí Image Lab™ software (BioRad).

Pro kontrolní SDS-PAGE (např. pro analýzu frakcí po chromatografii- kap. 3.5) byly použity gradientové pre-cast Bis-Tris gely NuPAGE® 4-12% (Lifetechnologies) a elektroforéza

probíhala v NuPAGE® MES SDS Running buffer (Lifetechnologies) při konstantním proudu 150 V po dobu 45 min. Gely byly po elektroforéze barveny (0,05 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % metanol, 10 % kys. octová ve vodě) a následně odbarvovány (25 % metanol, 10 % kys. octová ve vodě).

### 3.8. Imunohistochemie

Pro imunolokalizaci ve střevech byly připraveny bločky, z nichž se krájely poloténkové řezy. Vypitvaná střeva z plně nasátých samic (na jeden bloček vzorek ze střev tří samic) byla fixována fixačním roztokem (4% formaldehyd, 0,1% glutaraldehyd v 0,1M Na-fosfátovém pufru, pH 7.2- 7.4). Vzorky byly střídavě 30 s zahřívány v mikrovlnné troubě v režimu rozmrazování a 4 min třepány na ledě (celkem 5 krát) a přes noc inkubovány ve 4 °C. Stejný den byl připraven roztok LR White (LRW) pryskyřice (5 % benzoyl peroxid v LRW; London Resin Company Ltd.), který se do následujícího dne rozpouštěl při teplotě 4 °C. Druhý den byly tkáně 3 krát promyty po 10 min promývacím pufrům (0,1M fosfátový pufr, 0,28M glukóza, pH 7.2), přičemž po každých 10 minutách byly na 30 s vystaveny mikrovlnám. Během promývání se vzorky třepaly na ledě. Tkáně byly odvodňovány na základě postupného promývání (po 15 min) etanolovou řadou (30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % a 95 % EtOH), přičemž byly každých 5 min vystaveny mikrovlnám. Po odvodnění následovalo čtyřstupňové prosycování pryskyřicí, při němž byly tkáně vždy po dobu 90 min inkubovány se směsí LRW pryskyřice s 95 % etanolem po sobě v těchto poměrech: 1:2, 1:1 a 2:1 a každých 18 min byly vystaveny mikrovlnám. Přes noc byla střeva prosycována 100 % LRW v lednici ve zkumavce s otevřeným víčkem. Další den byly tkáně přemístěny do želatinové kapsule následně naplněné čistou pryskyřicí (100 % LRW) a vzorky byly inkubovány v 50 °C do zpolymerizování pryskyřice (cca 24 hod). Bločky zbavené želatinové kapsule byly nakrájeny na ultramikrotomu (Leica Ultracut UCT) na poloténkové řezy (400 nm).

Řezy byly nejprve 6 hod inkubovány v PBS- 1 % tritonu (PBS-1Tr) ve vlhké komůrce při 4 °C za účelem zpřístupnění membrán pro případné navázání protilátek a pak přes noc blokovány v blokovacím médiu s 1% BSA (hovězí sérový albumin, Sigma-Aldrich) a 10% sušeným mlékem v PBS-1Tr ve 4 °C. Následující den byly řezy dvakrát po 5 min promyty v PBS-1Tr. 3 hod byla vázána afinitně přečištěná protilátka proti IrSRP-1 (ředění 1:40, počáteční koncentrace 80 µl/ml) a po promytí (4 krát 5 min, PBS-1Tr) 1 hod sekundární protilátka (Alexa Fluor 488, Sigma-Aldrich, ředění 1:500). Po promývání (4 krát 5 min) bylo

pro zviditelnění buněčných jader 10 min vázáno DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid, Sigma-Aldrich, 1 µg/ml) a po promytí (3 krát 5 min) a vysušení byly řezy zalaty 2,5% DABCO (1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan; Sigma-Aldrich) v glycerolu.

Pro značení hemocytů byla odebrána hemolymfa ze čtyř samic *I. ricinus* na podložní sklíčko do L15 média (L15+ 10% FBS, pH 6.8; GE Health Care, PAA, Biotech). Vzorky se 20 min třepaly ve vlhké komůrce. Hemocyty byly fixovány 15 min 4% paraformaldehydem a po promytí (3 krát po 5 min v PBS) byly hodinu blokovány v blokovacím médiu s 1 % BSA (Sigma Aldrich) a 10 % kozím sérem (Sigma-Aldrich) v PBS-0,1 % tritonu. Po promytí (3 krát po 10 min v PBS-01Tr) byla 1,5 hod vázána afinitně přečištěná protilátka proti IrSRP-1 (ředění 1:40, počáteční koncentrace 80 µl/ml). Následovalo další promývání (3 krát 10 min) a hodinové vázání sekundární protilátky (Alexa Fluor 594, Sigma-Aldrich, ředění 1:500). Po promývání (3 krát 10 min) bylo 10 min vázáno DAPI (Sigma-Aldrich, 1 µg/ml). Po promytí (2 krát 5 min, PBS) a vysušení byly preparáty zalaty 2,5% DABCO (Sigma-Aldrich) v glycerolu.

Pro imunolokalizaci na totálních preparátech trachejí a slinných žláz byly vypitvané tkáně ze samic po 6 dnech sání fixovány 2 hod 4% paraformaldehydem, 3 krát po 10 min promyty PBS a přes noc blokovány v blokovacím médiu (1% BSA, PBS-1% Triton X-100) při 4 °C. Afinitně přečištěná protilátka proti IrSRP-1 (ředění 1:40, počáteční koncentrace 80 µl/ml) byla vázána 2 hod a po promytí (3 krát 10 min v PBS-1TrX) byla vázána sekundární protilátka (Alexa Fluor 488, Sigma-Aldrich, ředění 1:500) 1 hod. Preparáty byly nejprve promývány PBS-1TrX 10 min a pak čistým PBS 10 min. Následovalo vázání DAPI (Sigma-Aldrich, 1 µg/ml) 10 min, promývání v PBS 10 min, vysušení a zalití do 2,5% DABCO (Sigma-Aldrich) v glycerolu.

Při práci byl zamezen přístup světla k fluoroforům. Během vázání protilátek a promývání se vzorky třepaly na třepače. Řezy a totální preparáty byly pozorovány pod konfokálním mikroskopem (Olympus FW1000) při různém zvětšení a vizuálně zpracovány pomocí softwaru Fluoview FV10-ASW (Olympus) a Photoshop (Adobe).

### 3.9. RNA interference

Dvouvláknová RNA (dsRNA), potřebná pro RNAi, byla připravena následujícím postupem: 225 bp úsek *IrSRP-1* byl amplifikován z cDNA ze střev plně nasátých samic *I. ricinus*. Navržené primery (Tab. I na str. 10) obsahovaly přidané sekvence restričních míst pro ApaI a XbaI. PCR produkt byl vložen do vektoru PLL10, obsahujícího dva T7 promotory s opačnou orientací. Nejprve byla provedena restrikce plazmidu a PCR produktu (enzymy ApaI a XbaI, 10x Tango Buffer, Thermo Scientific, 30 µl reakce) a po přečištění restričních reakcí (GenElute<sup>TM</sup> PCR Clean-Up Kit, Sigma) byl PCR produkt ligován do vektoru (T4 DNA ligáza, 2x Rapid Ligation Buffer, Promega, 10 µl reakce). Vektor byl transformován do kompetentních buněk TOP10 (Lifetechnologies) a po kultivaci buněk a izolaci plazmidové DNA (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche) byla ověřena sekvence pozitivních klonů. Přečištěný plazmid (10 µg) nesoucí sekvenci amplifikovaného fragmentu *IrSRP-1* byl linearizován ve dvou oddělených 50 µl restričních reakcích s enzymy ApaI nebo XbaI a následně přečištěn tímto postupem: K plazmidu bylo přidáno 25 µl proteinázy K (zásobní roztok: 20 µg proteinázy K v 150 µl 10mM Tris/HCl, pH 8.0 a 2mM CaCl<sub>2</sub>) a 3,75 µl 10 % SDS. Směs byla inkubována v 50 °C po dobu 30 min. Po přidání 80 µl fenol-chloroformu (Sigma), byla směs promíchána na vortexu a centrifugována 5 min při maximálních otáčkách. K vodní fázi bylo přidáno 80 µl chloroformu a stejným způsobem jako v předchozím kroku byla směs zamíchána a centrifugována. Po přidání 56 µl isopropanolu k odebrané vodní fázi byla směs 30 min inkubována v -20 °C a pak centrifugována (30 min, max. otáčky při 4 °C). Pelet byl rozpuštěn ve 20 µl DEPC vody. Takto přečištěný linearizovaný plazmid sloužil jako templát pro syntézu jednovláknové RNA (ssRNA) (1µg linearizovaného plazmidu do 20µl reakce), k níž byla použita sada MEGAscript® T7 High Yield Transcription kit (Ambion). Syntetizovaná ssRNA byla přečištěna tímto způsobem: Po přidání 1µl DNázy byla směs ssRNA 15 min inkubována ve 37 °C. K směsi bylo přidáno 115 µl H<sub>2</sub>O a 15 µl octanu amonného (vše součástí kitu), směs byla zamíchána a po přidání 150 µl fenol-chloroformu důkladně promíchána na vortexu. Po centrifugaci (max. otáčky, 5 min) byla odebrána vodní fáze, k níž bylo přidáno 150 µl chloroformu. Směs byla opět promíchána a centrifugována. K odebrané vodní fázi bylo přidáno 110 µl izopropanolu, směs byla zamíchána, 15 min inkubována v -20 °C a pak centrifugována (30 min, max. otáčky při 4 °C). Pelet byl vysušen a následně rozpuštěn v 10 µl DEPC vody. Komplementární vlákna RNA (3 µg/ml) byla společně hybridizována v poměru 1:1 přes noc v odměrném válci s vroucí vodou. Úspěšnost syntézy dsRNA byla ověřena elektroforézou v 1% agarózovém TAE gelu s použitím

nanášecího pufru Ambion loading dye (Ambion). Při práci s RNA se pracovalo v RNA boxu, aby nedošlo k její degradaci RNázami.

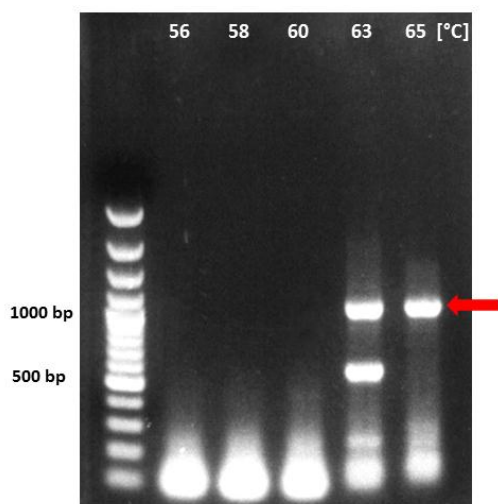
0,5  $\mu$ l dsRNA (3  $\mu$ g/ $\mu$ l) bylo injikováno do hemolymfy nenasátých samic klíštěte *I. ricinus* s použitím mikromanipulátoru (Narishige). Kontrolní klíšťata byla injikována stejným množstvím dsRNA pro GFP (*green fluorescent protein*). 24 hod po injikování byly samice aplikovány na morčata (1 morče  $\rightarrow$  25 samic) v přítomnosti samců, aby mohlo dojít k úplnému nasátí, které je možné jen u oplozených samic. V průběhu přeživacího pokusu byl sledován fenotypový projev KD (*knock-down*, utlumení) vs. kontrolních (GFP) klíšťat. Zaznamenávána byla následující data: počet nasátých samic, tělesná hmotnost samic po nasátí, schopnost vyklást snůšku, popř. velikost snůšky (ve třech stupních- malá, střední, velká) a schopnost líhnutí, popř. počet vylíhnutých larev (třemi stupni se vztažením na velikost vaječné snůšky).

## 4. Výsledky

### 4.1. Identifikace a struktura IrSRP-1

Tato práce je zaměřena na charakterizaci nově popsaného receptoru- modulární serinové peptidázy z klíštěte *I. ricinus*, označené jako *I. ricinus scavenger receptor peptidase 1* (IrSRP-1). Fragment anotovaný jako trypsinová peptidáza IsSRP-1 byl identifikován z genomové databáze blízce příbuzného klíštěte *I. scapularis* (projekt sekvenace genomu: Megy a kol., 2012) na základě homologie se savčím hemoglobinovým receptorem CD163 (prvotním záměrem bylo nalézt vhodného kandidáta pro hemoglobinový receptor na povrchu trávicích buněk klíštěte *I. ricinus*).

Pro získání kompletní sekvence IrSRP-1 byly provedeny 3' a 5' RACE PCR, prostřednictvím nichž se podařilo identifikovat pouze cDNA sekvenci 3' konce *IrSRP-1* (viz Obr. 3). Dosud ověřená sekvence čítá 1680 bp, které kódují 61 kDa velký protein o třech doménách, zahrnujících doménu trypsinové proteázy na C-konci, dvě SRCR domény a mezi nimi receptor pro nízkodenzitní lipoprotein (LDL) - viz Obr. 4.



**Obr. 3: 3' RACE PCR:** gradientová *nested* PCR; genově specifické primery jsou uvedeny v Tab. I na str.10. Izolovaný PCR produkt o velikosti ~1100 bp (šipka) je amplifikovaná sekvence 3' konce *IrSRP-1*.



```

1      gtggaagttcaagtgcacggccagtggggactcgtgtgacgacgaccactgggacatcgac
V·E·V·Q·V·H·G·Q·W·G·L·V·C·D·D·H·W·D·I·D·
61     gccgccaacgtcgtctgcagggagctgggcttcccgctaggagccttcaagctaccctc
A·A·N·V·V·C·R·E·L·G·F·P·L·G·A·F·E·A·T·L·
121    ggctctcagcacggggccggagcggacggggagtcctgcccattcttcatggacgacgtc
G·S·Q·H·G·A·G·A·D·G·E·S·L·P·I·F·M·D·D·V·
181    cagtgcacgggcaacgagacctcgtttccagtgcggttttccgggatggaagaagcac
Q·C·T·G·N·E·T·S·L·S·Q·C·G·F·P·G·W·K·K·H·
241    aactgcttcagcaaccagaccgcccggagttcgtgcaggaccaaagactgccaagcccta
N·C·F·S·N·Q·T·A·G·V·R·C·R·T·K·D·C·E·A·L·
301    ggattcagagtgtttggggacgtgcattcccttctacctgctgtgcaacgaccagccagac
G·F·E·C·L·G·T·C·I·P·F·Y·L·L·C·N·D·Q·P·D·
361    tggcgacagcagtcgctcgtccgaccggactgcaatgacgggctggacgctccgtctggtt
C·A·D·E·S·L·V·R·P·D·C·N·A·R·L·D·V·R·V·
421    gggggacccactcgtctccggaaggctggagataagaaggcacggactctggggaac
G·G·P·H·S·L·S·G·R·L·E·I·R·R·H·G·L·W·G·T·
481    gtctgcgacgacgacttcggacatatggaagccatggtggcctgcgccatgatgggcttc
V·C·D·D·D·F·G·H·M·E·A·M·V·A·C·A·M·M·G·F·
541    gaagggggcaacgccaccgtgcacagtagcccgacaaagctggcaagggtcctatctgg
E·G·G·N·A·T·V·H·S·S·P·H·K·A·G·K·G·P·I·W·
601    ctggacaaccttcggtgcagcggcaggaacgctccctggacgagtgccgacccagccc
L·D·N·L·R·C·S·G·T·E·R·S·L·D·E·C·R·T·Q·P·
661    tggggacagctcgtactgtgaccacagcggagatgtagccatgacgtgcattccgggaggc
W·G·Q·S·D·C·D·H·S·E·D·V·A·M·T·C·I·P·G·G·
721    agtgccacactaccggccagcatcgcggccttgaccacgacatgcccgaagtcccgaagtac
S·A·T·L·P·A·S·I·A·A·L·T·T·T·C·G·S·P·K·Y·
781    cagccacagatggatcaagggtcactaaacaaccatcatcgcttaccaggcacatgtgg
Q·P·Q·M·D·Q·G·S·L·N·N·H·H·R·F·T·R·H·M·W·
841    caacgaccaacttacgctcgagactggtttccaggcccggagcctcgacggcgccgcatc
Q·R·P·T·Y·A·R·D·W·F·P·G·P·E·P·R·R·R·I·
901    tcggggcgcatgtggacggcgtgcccgcgactacggcgcccaccggtggctcgtggac
S·G·R·I·V·D·G·V·P·A·H·Y·G·A·H·P·W·L·V·D·
961    atccggcttaggaccgactccggcgcaccatgcaactgggtgtgcccggggccgctcctgtcc
I·R·L·R·T·D·S·G·R·T·M·H·W·C·A·G·A·V·L·S·
1021   ccgaacctgggtgctcagtgccgcacactgcttcaagcactccccgaacgcgctcggagctg
P·N·L·V·L·S·A·A·G·C·F·K·H·S·P·N·A·S·E·L·
1081   gtcgtccgcatcggggagcaccggatgcagacacgcgacatctacgaggtggatttcgac
V·V·R·I·G·E·H·R·M·Q·T·R·D·I·Y·E·V·D·F·D·
1141   gtcgaggcattcaaggtgcaccagggattcgcagcagacactttcttcaatgacatcagc
V·E·A·F·K·V·H·Q·G·F·D·A·D·T·F·F·N·D·I·S·
1201   ctgctgaagcttcgaccatccgcaatcacggcatcttgttcaacgaccacgtgatgcc
L·L·K·L·R·P·I·R·N·H·G·I·L·F·N·D·H·V·M·P·
1261   gtgtgcctccccaccaagaggacgtctatgccccggaaacctcctgcgtcatcgccgga
V·C·L·P·T·K·E·D·V·Y·A·P·G·T·S·C·V·I·A·G·
1321   tggggaaagaccatcatcaacgtccaccaactgcaatcgtctgtgctgcagacggcagcg
W·G·K·T·I·I·N·V·H·Q·L·Q·S·S·V·L·Q·T·A·A·
1381   vtgcccctgtacgagcctggccagtgcgagcagccctgggtgtacggctacaggataaag
V·P·L·Y·E·P·G·Q·C·E·Q·P·W·V·Y·G·Y·R·I·K·
1441   cgtggcatgttctgcgcccggcacgtggacggcggcatggacgcctgccacggcgacagc
R·G·M·F·C·A·G·H·V·D·G·G·M·D·A·C·H·G·D·S·
1501   ggaggacctctcgtctgccgctccatcacaggcaactttgcagcttccggcataatcagc
G·G·P·L·V·C·R·S·I·T·G·N·F·A·V·F·G·I·I·S·
1561   tggggcgaagaatgtggcctccccaacagacctggtgtctacgtcaaggtacaagagtac
W·G·E·E·C·G·L·P·N·R·P·G·V·Y·V·K·V·Q·E·Y·
1621   ctcgactggattgccaacaccgaagtggaaactcctgagccagttataaaatactgctaaa
L·D·W·I·A·N·T·E·V·E·L·L·S·Q·Y·*·
1681   gcaaaaaaaaa

```

**Obr. 4: Ověřená sekvence IrSRP-1:** 2 SRCR domény typu A (značeny modře) ; LDL receptor typu A (značen zeleně); doména trypsinové proteázy (vyznačena červeně); zeleně zvýrazněné aminokyselinové zbytky tvořící aktivní místo proteázy, žlutě vazebné místo pro substrát a modře místo štěpení.

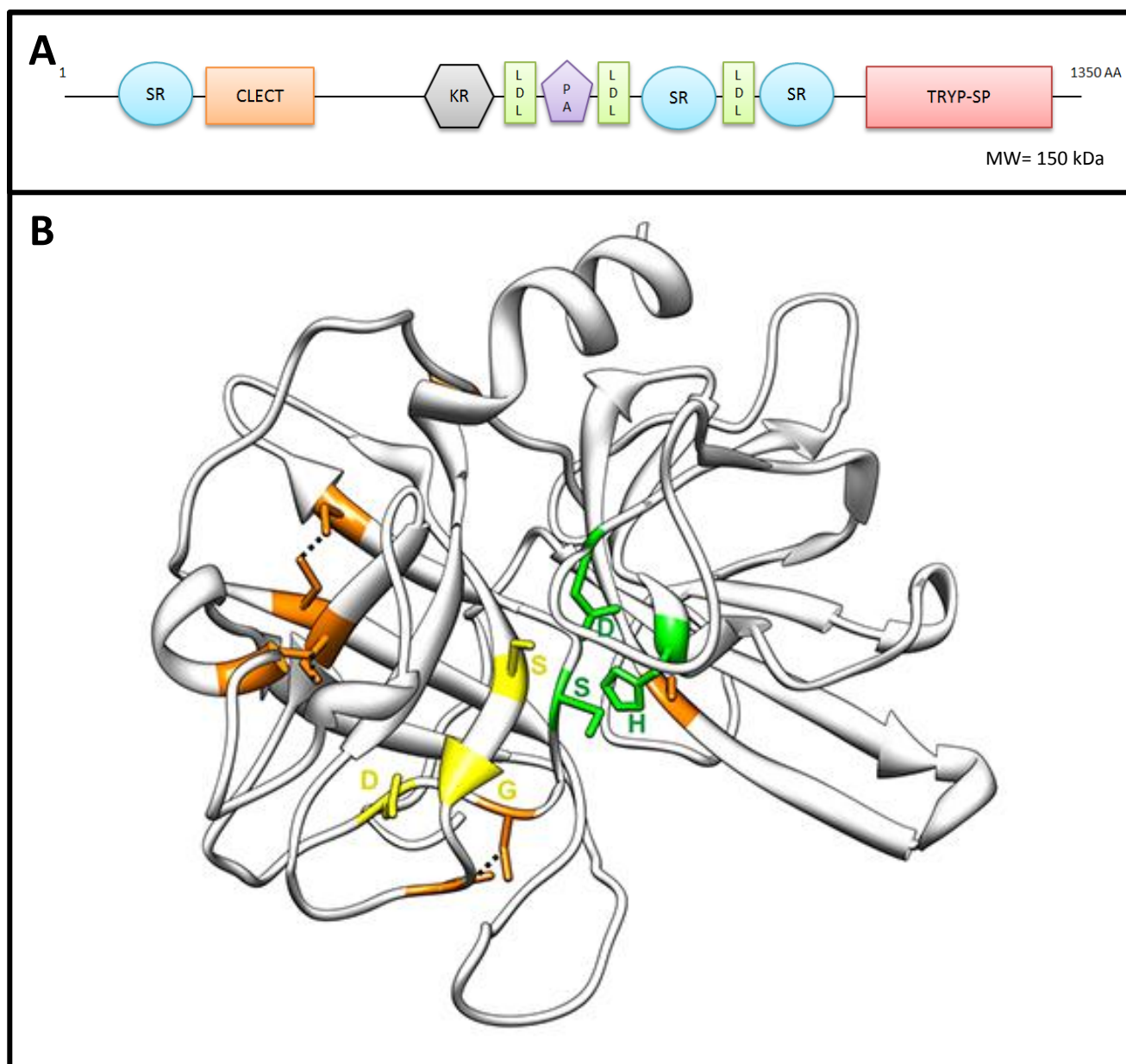
Ověřená sekvence IrSRP-1 vykazuje v rámci příbuznosti s ostatními proteiny v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) s použitím algoritmu blast P v programu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) nejvyšší (99 %) shodu s částečnou sekvencí „trypsin putative“ (GenBank XP\_002434387) z *I. scapularis*, dále 43 % identitu s proteinem DAPPUDRAFT (GenBank EFX82507) z perloočka *Daphnia pulex*, následuje serinová proteáza (GenBank XP\_001653721) z komára *Aedes aegypti* (41 %) či serinová proteáza 22D (GenBank AAD38337) z *Anopheles gambiae* (40 %); 39 % shoda byla nalezena u proteinu (GenBank XP\_002084219) z *Drosophila simulans*- viz Tab. II.

**Tab. II:** Nejpříbuznější anotované proteiny ověřené peptidové sekvencí IrSRP-1.

Protein a taxonomické zařazení	GenBank CDS/ protein a. n.	Identita v primární struktúře	Délka homologie s IrSRP-1
trypsin putative, <i>Ixodes scapularis</i>	XP_002434387	99 %	52 %
DAPPUDRAFT_316225, <i>Daphnia pulex</i>	EFX82507	43 %	99%
serine protease, <i>Aedes aegypti</i>	XP_001653721	41 %	100 %
serine protease 22D, <i>Anopheles gambiae</i>	AAD38337	40 %	100 %
GD14152, <i>Drosophila simulans</i>	XP_002084219	39 %	100 %

Po několika neúspěšných opakováních 5' RACE PCR byla sestavena hybridní „mezidruhová“ molekula pomocí ostatních klíčících EST (*expressed sequence tag*) dat pro ucelení představy o molekulární hmotnosti a předpokládané doménové struktúře IrSRP-1 pomocí multi-alignmentů programu BLAST a EST dat v NCBI databázi, přičemž byly použity především algoritmy blast X (translatované nukleotidy částečné sekvence IrSRP-1 – translatované nukleotidy klíčících EST) a blast T (dosavadní protein IrSRP-1 – translatované nukleotidové sekvence klíčících EST). Hypotetická kompletní proteinová sekvence IrSRP-1 je tvořená deseti doménami: kromě trypsinové proteázy, dvou SRCR domén a LDL receptoru obsahuje navíc ještě jednu SRCR doménu, dva další LDL receptory, lektinovou doménu typu C (CLECT), Kringle doménu a PAN/APPLE doménu (viz Obr. 5A). Všechny tři SRCR domény obsahují po 6 cysteinových zbytcích, čímž se řadí do skupiny SRCR typu A (viz úvod). CLECT neboli lektinová doména typu C zastává roli při rozpoznávání a vázání molekul sacharidů (volných nebo vázaných v glykoproteinech či glykolipidech) Ca<sup>2+</sup> dependentním způsobem například při buněčné adhezi či ve vrozené imunitě (Drickamer, 1999). Kringle doména se nachází u proteinů podílejících se na srážení krve a štěpení fibrinu (např. u

plazminogenu či protrombinu). Její funkce spočívá pravděpodobně ve vázání mediátorů (peptidů, fosfolipidů a dalších) (Li a kol., 1994). LDL receptory váží a do buněk transportují LDL molekuly, čímž hrají klíčovou roli v metabolismu cholesterolu u savců. LDL receptor typu A se vyznačuje bohatým zastoupením cysteinových zbytků (6), jež tvoří disulfidické můstky (Goldstein a kol., 1985, Gent a Braakman, 2004). Nedávno popsaná PAN/APPLE doména se vyskytuje u plazminogenu, růstového faktoru hepatocytů a rozličných proteinů trojlistých (*Bilateria*), jako například u pijavice popsaného proteinu, který svoji vazbou na kolagen zabraňuje shlukování krevních destiček (Huizinga a kol., 2001). 3D strukturní model IrSRP-1 trypsinové proteázy je znázorněn na Obr. 5B; obsahuje přísně konzervovanou trojici aminokyselinových zbytků tvořících aktivní místo enzymu. Trypsinová proteáza bývá většinou syntetizována v neaktivní formě a teprve po svém odštěpení se stává aktivní (Polgár, 2005).



**Obr. 5: Hypotetická kompletní proteinová sekvence IrSRP-1 a terciární struktura trypsinové domény.**

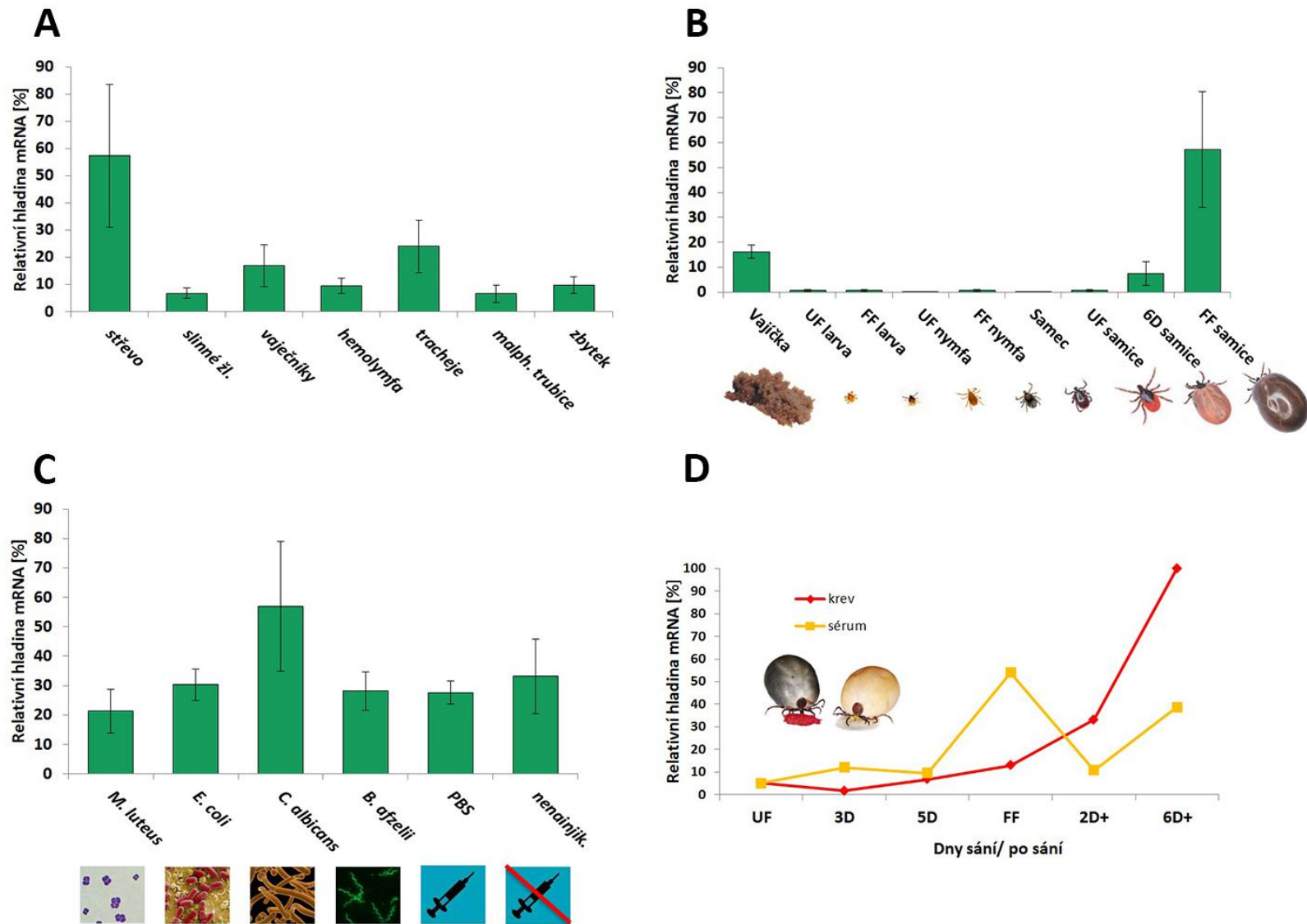
**A:** Schematické znázornění předpokládané proteinové sekvence mnohodoménového IrSRP-1. SR= Scavenger doména bohatá na cysteiny, CLECT= lektinová doména typu C, KR= Kringle doména, LDL= receptor pro LDL, PA= PAN/APPLE doména, TRYP-SP= trypsinová serinová proteáza. **B:** Terciární struktura trypsinové domény IrSRP-1. Navrženo podle tkáňového aktivátoru plazminogenu u netopýra *Desmodus rotundus* (PDB kód: 1a5i) prostřednictvím Phyre 2.0 serveru, vizualizace v programu UCSF Chimera. Zeleně jsou značeny aminokyselinové zbytky tvořící aktivní místo proteázy, žlutě vazebné místo pro substrát a oranžově cysteinové zbytky tvořící disulfidické můstky.

#### 4.2. qRT-PCR profily transkripce *IrSRP-1*

Prostřednictvím qRT-PCR byla porovnáвана hladina *IrSRP-1* mRNA v rámci vývojového cyklu, v průběhu sání a v různých tkáních klíštěte *I. ricinus* (Obr. 6). Z qRT-PCR profilu jednotlivých stádií vyplývá, že larvy, nenasáté nymfy, samci a nenasáté samice vykazují téměř nulovou transkripci *IrSRP-1*. Ve vajíčcích dosáhla relativní hladina 16 %. U plně nasátých samic byl zaznamenán dynamický nárůst *IrSRP-1* mRNA (ze 7 % u samic po 6 dnech sání na 57 % u plně nasátých samic)- viz Obr. 6B. Podobný trend ukazovala také křivka profilu transkripce v průběhu umělého membránového sání na krvi (Obr. 6D- červená křivka; tmavé klíště na obrázku), která navíc zahrnovala data o rapidním zvyšování hladiny *IrSRP-1* mRNA u samic několik dnů po sání. U samic uměle krmených pouze na krevním séru (Obr. 6D- žlutá křivka; bílé klíště na obrázku) nebyla prokázána závislost mezi dny sání (resp. po sání) a transkripcí *IrSRP-1*. Ze získaných qRT-PCR dat je patrná up-regulace *IrSRP-1* se sáním hostitelské krve.

Relativní exprese *IrSRP-1* genu v tkáních polonasátých samic (6 dní sání) byla největší ve střevech (57 %); v trachejích dosáhla hodnoty 24%, ve vaječnicích 17 %, v hemolymfě 10 % a ve slinných žlázách a malpighických trubicích necelých 7 % (Obr. 6A)

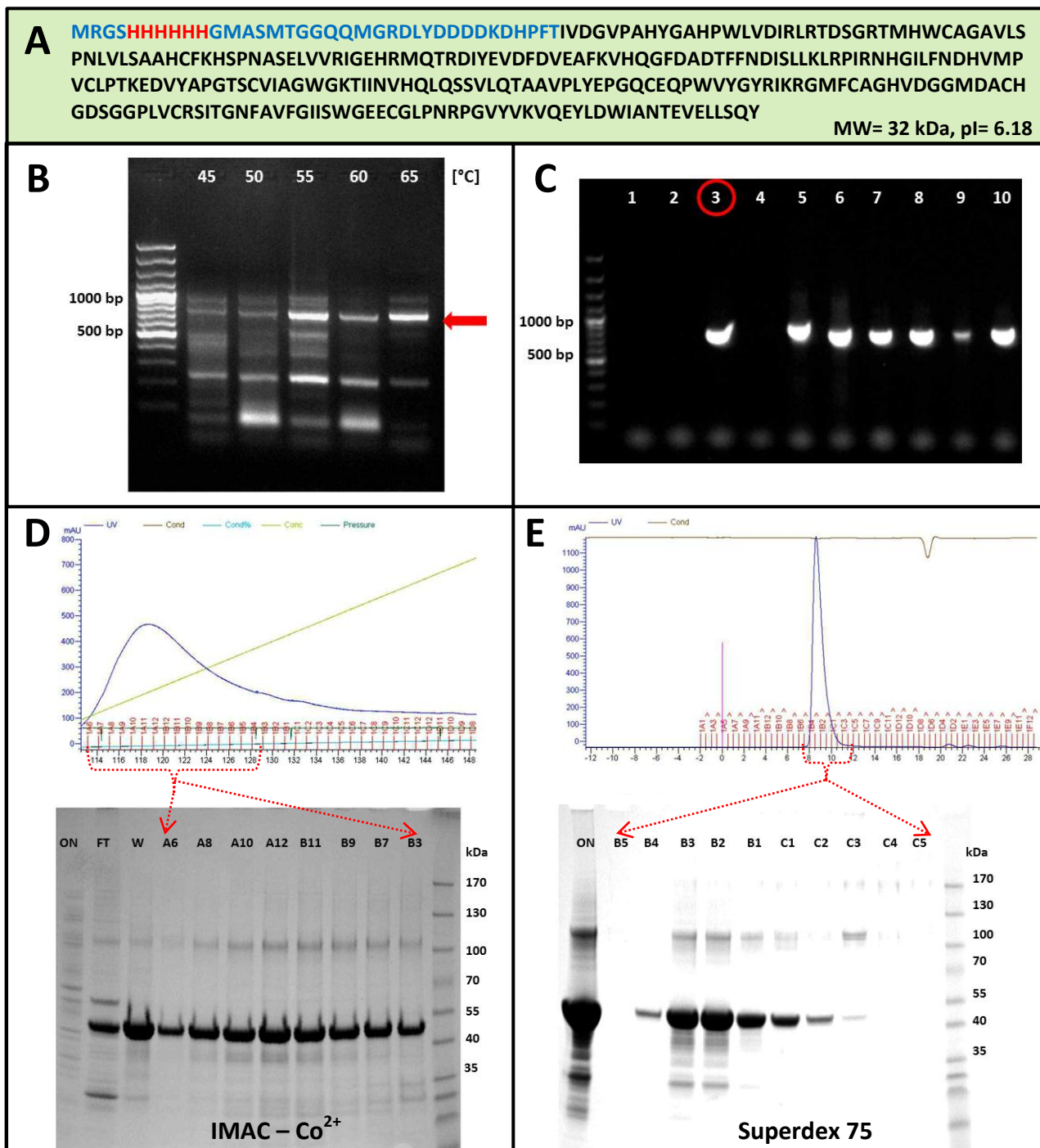
Kvůli potencionální roli ve vrozené imunitě klíštěte byl také testován vliv přítomnosti několika různých patogenů (kvasinky *Candida albicans*, grampozitivní bakterie *Micrococcus luteus*, gramnegativní bakterie *E. coli* a *Borrelie afzelii*) na transkripci *IrSRP-1*. Jak vyplývá z qRT-PCR profilu (Obr. 6C), hladina mRNA *IrSRP-1* se po injekci žádným z těchto patogenů nemění.



**Obr. 6: qRT-PCR profily transkripce *IrSRP-1* genu u *I. ricinus*:** **A:** Tkáňový profil. cDNA byla připravena z tkání polonasátých samic. **B:** Profil transkripce u stádií se zohledněnou dynamikou sání. **C:** Profil transkripce v reakci na patogeny. cDNA byla syntetizována z mRNA izolované z nenasátých samic injikovaných dávkou 10 000 patogenů. **D:** Profil transkripce během umělého membránového sání na krvi vs. krevním séru. UF= nenasátý, FF= plně nasátý, 3D, 5D= 3, 5 dní sání, 2D+, 6D+= 2, 6 dní po sání. Relativní hladina *IrSRP-1* byla normalizována relativní hladinou *housekeeping* genu kódujícího elongační faktor 1 (EF1). Chybové úsečky v grafech značí standardní chybu průměru.

### 4.3. Příprava rekombinantního proteinu- trypsinové proteázy rIrSRP-1

V bakteriálním systému *E. coli* byl exprimován rekombinantní protein trypsinové domény rIrSRP-1 (viz Obr. 7). Rekombinantní protein byl izolován z inkluzních tělísek chelatační chromatografií (Obr. 7D) na IMAC koloně. Z SDS-PAGE analýzy sbíraných frakcí vyplývá, že celkově byl rekombinantní protein v nadbytku a dobře se z kolony uvolňoval již v přítomnosti 20mM imidazolu. Po eluci rekombinantního proteinu, obsaženého ve frakcích A6-12 a B3-11, byl rIrSRP-1 refoldován, koncentrován a přečištěn gelovou filtrací na koloně Superdex 75 (Obr. 7E). Takto přečištěný byl rIrSRP-1 použit pro imunizaci králíka a pro testování trypsinové aktivity *in vitro* v přítomnosti makromolekulárního univerzálního proteázového substrátu- značeného kaseinu. Bohužel, aktivita enzymu nebyla pozorována, a to ani po optimalizaci pH, složení pufrů, včetně přidavku iontů ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ).



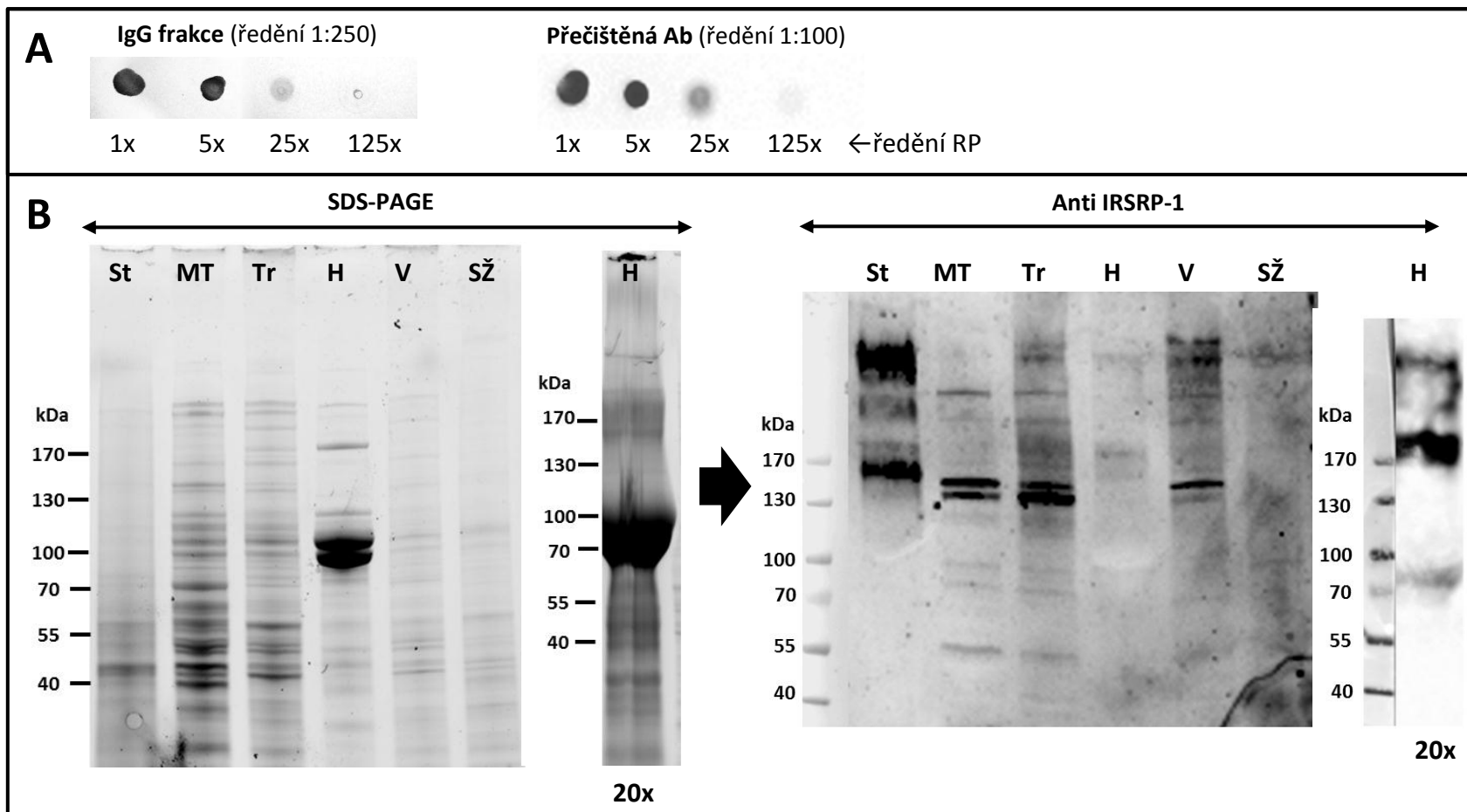
**Obr. 7: Příprava a přečištění rekombinantní trypsinové domény rIrSRP-1:** A: Proteinová sekvence a molekulární hmotnost rekombinantního proteinu; barevně vyznačeny aminokyselinové zbytky pocházející z expresního vektoru pET100, červeně zvýrazněn His<sub>6</sub>-tag. B: Gradientová PCR- amplifikace cDNA z oblasti trypsinové domény IrSRP-1. Šipka směřuje k PCR produktu, který byl izolován a ligován do expresního vektoru. C: Kontrolní PCR pro ověření přítomnosti plazmidu s vloženým PCR produktem v jednotlivých kloněch. Sekvenací ověřený plazmid byl izolován z klonu č. 3. D: Chelatační chromatografie na IMAC koloně s použitím Co<sup>2+</sup>. Chromatograf znázorňuje průběh eluční křivky (modře vyznačena absorpční křivka při UV 280 nm, zeleně lineární gradient imidazolu). SDS-PAGE analýza najímaných frakcí: ON= inkluzní tělíska v solubilizačním pufru, FT= *flow- through* (nezachycená frakce), W= *wash* (promývání 20mM imidazolem); A6, 8, 10, 12 a B11, 9, 7, 3= sbírané frakce při eluci rekombinantního proteinu v lineárním gradientu imidazolu (20-500 mM). E: Gelová filtrace na koloně Superdex 75. Chromatograf znázorňuje celkový průběh filtrace (modře vyznačena absorpční křivka při UV 280 nm, odpovídající koncentraci rekombinantního proteinu). SDS-PAGE analýza sbíraných frakcí: ON= nanašený koncentrovaný renaturovaný protein, B1-5, C1-5= sebrané frakce.



#### 4.4. Příprava polyklonálních protilátek proti rIrSRP-1, detekce a lokalizace IrSRP-1 v tkáních *I. ricinus*

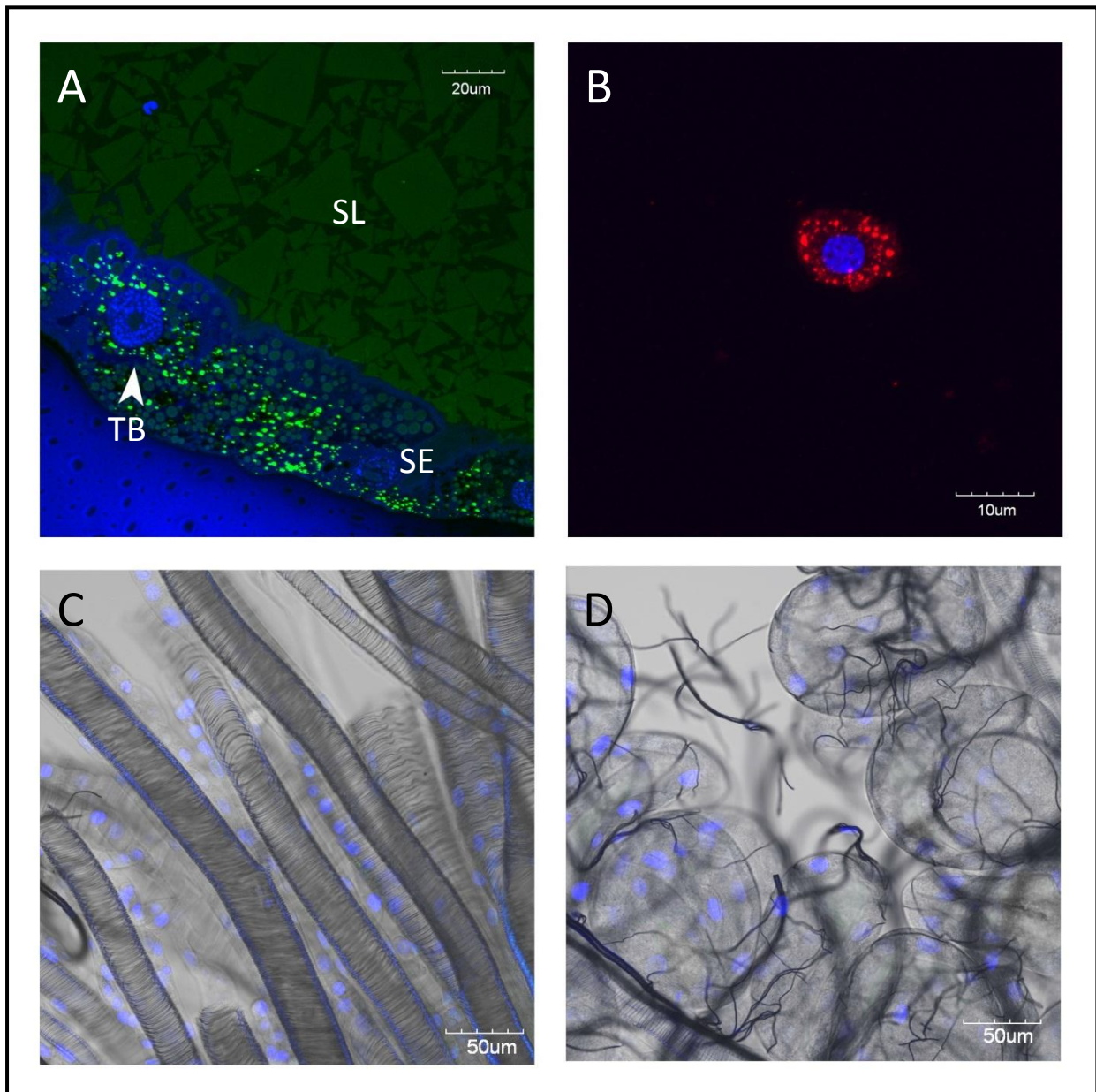
Po imunizaci králíka rekombinantním proteinem byla z krevního séra izolována IgG frakce a z ní afinitně přečištěná protilátka proti IrSRP-1. IgG frakce a afinitně přečištěná protilátka byly testovány pomocí metody dot-blot (Obr. 8A), kdy se protilátky inkubovaly s rekombinantním proteinem, naneseným v ředící řadě na nitrocelulózovou membránu. Protilátky se navázaly na rekombinantní protein, přičemž byl patrný pokles signálu v závislosti na zvyšujícím se ředění rekombinantního proteinu.

Afinitně přečištěná protilátka byla použita pro detekci IrSRP-1 v izolovaných tkáňových homogenátech polonasátých samic *I. ricinus* prostřednictvím Western blotu (viz Obr. 8B). Nejsilnější signál byl detekován jednoznačně ve střevech, zaznamenan byl ale také v malpighických tubicích, trachejích a vaječnicích; v hemolymfě byl signál velmi slabý a ve slinných žlázách nebyl detekován vůbec. V malpighických tubicích a trachejích je profil téměř identický- protilátky se vážaly na proteiny o velikosti ~150 a 130 kDa. Ve střevech se protilátky navázaly na protein o molekulární hmotnosti kolem 160 kDa a zároveň na proteinový komplex mimo rozlišení použitého SDS-PAGE gelu. Ve vaječnicích byl profil podobný jako v malpighických tubicích či trachejích, rozdílná byla pouze intenzita signálu u ~130kDa proteinu. V hemolymfě byl signál skoro nulový, avšak po výsledku z imunolokalizace, vykazujícího silnou specifickou vazbu protilátky v hemocytech (viz níže), byl Western blot proveden ještě jednou, ale s 20 krát koncentrovanější hemolymfou (viz Obr. 8B vpravo u každého bloku). Protilátky se navázaly na protein o velikosti nad 170 kDa.



**Obr. 8: Testování IrSRP-1 protilátky a detekce IrSRP-1 v tkáních klíštěte *I. ricinus*:** **A:** Dot-blot: test IgG frakce a přečištěné protilátky (Ab). Protilátky se vázaly na rekombinantní protein (RP) ředěný v následném sestupném poměru 1:5. **B:** Detekce IrSRP-1 v tkáních *I. ricinus*: Vlevo: Denurační SDS-PAGE elektroforéza (Criterio TGX Stain-Free, BioRad) denaturovaných tkáňových proteinů. St= střevo, MT= malpighické trubice, Tr= tracheje, H= hemolymfa, V= vaječníky, SŽ= slinné žlázy. Samostatný obrázek: 20x koncentrovanější hemolymfa. Vpravo: Western blot s afinitně přečištěnou protilátkou proti IrSRP-1 (ředění 1:100, počáteční koncentrace 80 µg/ml). Detekce byla provedena buď kolorimetricky diaminobenzidinem (metoda dot-blot s IgG frakcí), nebo chemiluminiscenčním ECL substrátem (dot-blot s afinitně přečištěnou protilátkou a Western blot).

Afinitně přečištěná protilátka proti IrSRP-1 byla použita pro imunohistochemické značení na polotenkých řezech a totálních preparátech tkání polonasátých či plně nasátých samic *I. ricinus* (Obr. 9). Protilátka vykazovala specifickou vazbu v trávicích buňkách střevního epitelu u plně nasátých samic (Obr. 9A) a zároveň ve vnitrobuněčných váčcích a při povrchu hemocytů (Obr. 9B). Žádný signál nebyl naopak detekován v totálních preparátech trachejí (Obr. 9C) a slinných žláz (Obr. 9D).

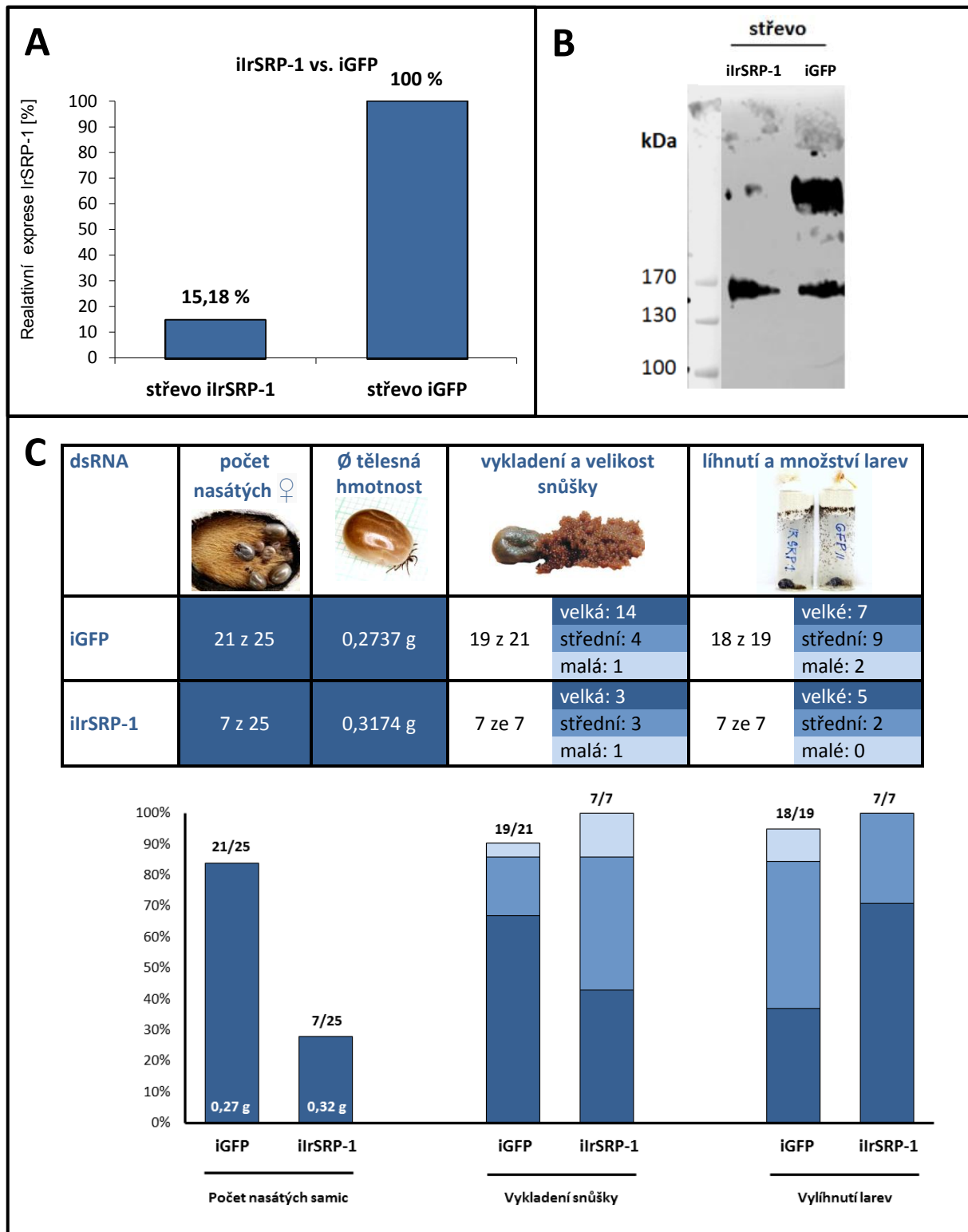


**Obr. 9: Imunolokalizace IrSRP-1 v tkáních a hemocytech klíštěte *I. ricinus*:** Ve všech preparátech jsou modře značená jádra (DAPI). Značené preparáty byly pozorovány pod konfokálním mikroskopem. **A:** Imunolokalizace ve střevích plně nasátých samic (polotenké řezy). Použitá sekundární protilátka: Alexa Fluor 488. SL= střevní lumen, SE= střevní epitel, TB= trávicí buňka. **B:** Imunolokalizace v hemocytech. Použitá sekundární protilátka: Alexa Fluor 594. **C:** Imunolokalizace v trachejích (totální preparát). Použitá sekundární protilátka: Alexa Fluor 488 (žádný signál). **D:** Imunolokalizace ve slinných žlázách (totální preparát). Použitá sekundární protilátka: Alexa Fluor 488 (žádný signál).

#### 4.5. RNA interference IrSRP-1

Pro RNAi pokusy a sledování fenotypů bylo 25 nenasátých samic *I. ricinus* injikováno IrSRP-1 dsRNA (iIrSRP-1) a stejné množství v kontrolní skupině bylo injikováno kontrolní GFP dsRNA (iGFP). Jak je vidět z qRT-PCR analýzy mRNA ze střev iIrSRP-1 a iGFP polonasátých samic (Obr. 10A), RNA interferencí se podařilo snížit hladinu *IrSRP-1* mRNA na pouhých 15 % oproti GFP dsRNA injikované kontrolní skupině. Účinek RNAi byl ověřován také na proteinové úrovni Western blotem (Obr. 10B) na SDS-PAGE separátech střevních homogenátů z iIrSRP-1 a iGFP polonasátých samic. Pokud uvažíme, že horní proužek je nedenaturovaný proteinový komplex a porovnáme společně intenzitu obou proužků (horní a spodního), je v porovnání s iGFP kontrolou patrné i částečné snížení obsahu samotného IrSRP-1 proteinu v iIrSRP-1.

Rozdílný fenotyp byl pozorován jen při samotném sání, kdy pouze 28% iIrSRP-1 samic úspěšně dokončilo sání. Všechny přeživší iIrSRP-1 samice vykladly vajíčka a ze všech vaječných snůšek se vylíhly larvy (Obr. 10C).



**Obr. 10: RNA interference:** A: qRT-PCR ověření účinku RNAi na transkripční úrovni. mRNA byla izolována ze střev 14 iIrSRP-1 a 14 iGFP samic po 6 dnech sání. Relativní hladina *IrSRP-1* mRNA byla normalizována *housekeeping* genem (aktinem). B: Ověření účinku RNAi na proteinové úrovni. Vzorky pro Western-blot byly připraveny ze střev 14 iIrSRP-1 a 14 iGFP samic po 6 dnech sání. C: Přeživací pokus: injikováno bylo celkem 25 iIrSRP-1 a 25 iGFP samic. V tabulce je uveden počet nasátých samic, průměrná tělesná hmotnost plně nasátých samic, počet samic schopných vyklást snůšku a velikosti (velká, střední, malá) těchto snůšek, počet samic, z jejichž snůšky se vykládly larvy a množství (hodně, středně, málo) těchto larev se vztahem na velikost snůšky. V grafu pod tabulkou jsou znázorněny relativní hodnoty v jednotlivých stupních přeživacího pokusu. Z důvodu nedostatku klíšťat nebyl pokus proveden v biologickém triplicátu, ale pouze jednou.

## 5. Diskuze

Tato práce je věnována studii nově popsaného makromolekulární receptoru- serinové peptidázy IrSRP-1 z klíštěte *I. ricinus*. Dosud ověřená mRNA sekvence (1680 bp) kóduje doménu serinové proteázy na C- konci a dvě SRCR domény, mezi nimiž se nachází receptor pro LDL. Pomocí EST dat z několika druhů klíšťat (*Ixodes scapularis*, *Ixodes pacificus*, *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma americanum*) byla sestavena hybridní molekula, predikující kompletní proteinovou sekvenci IrSRP-1 (150 kDa). Všechny SRCR domény obsahují po šesti cysteinových zbytcích, čímž se řadí do skupiny SRCR-A. Tento typ domény se vyskytuje většinou u mnohodoménových proteinů s jedinou SRCR doménou spojenou s dalšími rozličnými doménami. IrSRP-1 obsahuje v ověřeném úseku dvě a v predikované sekvenci celkem tři SRCR-A, čímž se liší od obecného popisu scavenger receptorů s tímto typem SRCR domény. SRCR doména je velice starobylý proteinový motiv (Sarrias a kol., 2004), který u nižších živočichů zastává patrně důležitou roli ve vrozené imunitě (Olaja a kol., 2007). Scavenger receptory často plní mnoho rozdílných funkcí. Typickým příkladem je savčí CD163, který kromě funkce hemoglobinového receptoru v makrofázích zastává roli při fagocytóze patogenů nebo spouští řadu signalizačních kaskád (Van Gorp a kol., 2010).

C-terminální IrSRP-1 doména serinové proteázy má charakter trypsinu s aktivním místem, tvořeným serinem, histidinem a asparagovou kyselinou a lze ji tudíž přisoudit proteolytickou funkci (Rawlings a Salvesen, 2013). Bohužel se během této práce nepodařilo získat aktivní rekombinantní protein pro biochemickou charakterizaci a ověření substrátové specifity pomocí moderních knihoven peptidylových substrátů (Sojka a kol., 2012; O'Donoghue a kol., 2012). Protokol pro expresi solubilního aktivního proteinu je možné dále optimalizovat použitím speciálních buněk *E. coli* (např. T7 Shuffle, New England Biolabs) pro zvýšenou expresi solubilních proteinů nebo eukaryotického expresního systému běžně používaného v naší laboratoři (kvasinky *Pichia pastoris* či *Kuyveromyces lactis*, hmyzí buněčné kultury infikované bakuloviry). Aktivní protein by mohl být dále získán modifikací protokolu renaturace (refoldingu) rekombinantní trypsinové domény IrSRP-1 získané z inkluzních tělísek bakterií.

Obecně serinové proteázy zastávají důležité role při normálních či patologických fyziologických procesech, jakými jsou zánětlivé reakce, srážení krve, trávení, přestavba tkání, apoptóza či nádorové bujení (Lin a kol., 1999). Výskyt SRCR domény spolu s doménou trypsinové proteázy byl popsán například u lidského hepsinu či epitheliasinu (TMPRSS2).

Hepsin se pravděpodobně podílí na buněčném růstu, buněčné morfogenezi a krevním srážením (Kazama a kol., 1995). Jeho zesílená exprese byla prokázána v mnoha rakovinných buňkách (Zacharski a kol. 1998, Tanimoto a kol., 1997, Ernst a kol., 2002). Epitheliasin se patrně také účastní karcinogenních procesů (Lin a kol., 1999) a navíc se podílí na infekci a rozšíření chřipkového viru proteolytickou aktivací jeho povrchového glykoproteinu hemaglutininu (HA), nutnou pro fúzi obalu viru s plazmatickou membránou buňky (Garten a kol., 2004, Friebertshäuser a kol., 2010).

Strukturně velmi podobná proteáza Sp22D z komára *Anopheles gambiae* (40 % identita s IrSRP-1 v primární struktuře a 100 % pokrytí homologie) se skládá ze dvou domén vázících chitin, mucinové domény, dvou LDL receptorů, dvou SRCR domén a z domény trypsinové proteázy. Stejně jako u IrSRP-1 se na C-konci Sp22D nachází trypsinová doména, již následují dvě SRCR domény a mezi nimi receptor pro LDL. Sp22D je exprimován v různých částech těla a vývojových stádiích komára, nejhojněji se však vyskytuje v hemocytech, z nichž je vyměšován do hemolymfy. V hemolymfě se pravděpodobně účastní imunitních reakcí a detekcí presence chitinu v hemolymfě může signalizovat mechanické poranění nebo identifikovat parazitické houby (*Fungi*) či hlístice (*Nematoda*). Při rozpoznávání patogenů je též zvažovaná funkce domény LDL receptoru (Danielli a kol., 2000, Gorman a kol., 2000).

Predikovaná primární struktura IrSRP-1 obsahuje celkem 10 domén, což vypovídá o komplexnosti a mnohofunkčnosti proteinu. Spojení serinové proteázy, LDL receptorů, SRCR domény, PAN/APPLE domény, Kringle domény a lektinové domény typu C bylo popsáno také u serinové proteázy SP23 u včely medonosné (*Apis mellifera*). Totožné je dokonce pořadí domén. Rozdílný je pouze počet SRCR domén (3 d. u IrSRP-1, 1 d. u SP23) a výskyt tří domén vázící chitin u SP23, které se také vyskytují u Sp22D z komára *A. gambiae*. Funkce SP23 je nejasná; zvažována je role ve vrozené imunitě nebo v embryonálním vývoji (Zou a kol., 2006).

Z výsledků qRT-PCR tkáňového profilu *IrSRP-1* vyplývá, že nejvyšší relativní exprese *IrSRP-1* je ve střevech (57 %), avšak rozdíl oproti ostatním tkáním (24 % v trachejích, 17 % ve vaječnicích a necelých 10 % ve zbylých tkáních) není příliš signifikantní, obzvláště pokud zohledníme standartní chybu průměru (+/- 26 %). Tato nižší hladina mRNA ve střevech je patrně zapříčiněna použitím cDNA z tkání polonasátých samic. Pokud přihlídneme k profilům dynamiky sání, je zřejmé, že relativní exprese *IrSRP-1* genu je up-regulována sáním a hladina mRNA výrazně narůstá u metabolicky aktivních samic. U larev, nenasátých nymf,

samců (nesají krev) a nenasátých samic je hladina mRNA téměř nulová. Naopak dynamicky narůstá u plně nasátých samic a rapidně stoupá ještě několik dnů po sání. Nejhojnější zastoupení IrSPR-1 ve střevech je zároveň potvrzeno Western blotem, provedeném se vzorky střev z plně nasátých samic, kde byl signál po navázání protilátky proti IrSRP-1 ve srovnání s ostatními tkáněmi viditelně nejsilnější. Zajímavá je relativní exprese genu *IrSRP-1* ve vajíčkách (16 %), která by mohla vypovídat o funkci IrSRP-1 při zásobování zárodku potřebnými živinami či embryonálním vývoji. Po injekci několika různých patogenů (Gram<sup>+</sup> a Gram<sup>-</sup> bakterií a kvasinek) byla hladina mRNA vyšší pouze u klíšťat injikovaných kvasinkou *C. albicans*, avšak se započtením standartní chyby průměru není tento nárůst prokazatelný.

Profil Western blotu z jednotlivých tkání prokazuje nejvyšší hladinu IrSRP-1 ve střevech; značí také proteiny o jiné velikosti v malpighických trubicích, vaječnicích a trachejích (možnost alternativního sestřihu). Ve slinných žlázách není IrSRP-1 exprimován. Potvrzují to získaná data z Western blotu, imunohistochemie i qRT-PCR (hladina mRNA nebyla nulová, ale velmi nízká). V hemolymfě byl signál po vázání protilátek proti IrSRP-1 nejprve velice slabý, ale po výsledku z imunolokalizace, prokazujícího specifickou vazbu IrSRP-1 v hemocytech, byl Western blot zopakován s 20 x koncentrovanější hemolymfou. Metodický rozdíl mezi imunolokalizací a Western blotem hemolymfy spočívá v tom, že k imunolokalizaci byly použity pouze hemocyty, fixované na podložní sklíčko, zatímco u Western blotu všechny proteiny hemolymfy (hemocyty + složky plazmy), proto bylo nutné pro detekci IrSRP-1 navýšit koncentraci hemolymfy. Ve střevě se protilátky proti IrSRP-1 navázaly na protein o velikosti zhruba 160 kDa a zároveň na proteinový komplex mimo rozlišení použitého SDS-PAGE gelu (pravděpodobně nerozvařený komplex IrSRP-1 s membránovými fosfolipidy). V malpighických trubicích, trachejích a vaječnicích se protilátky navázaly na proteiny o velikosti cca 150 a 130 kDa, což odpovídá velikosti predikovaného proteinu IrSRP-1 (150 kDa), popřípadě velikosti proteinu s odštěpenou 28kDa trypsinovou proteázou. Je možné se domnívat, že trypsinová doména se autokatalyticky aktivuje odštěpením (štěpení peptidické vazby mezi argininem a izoleucinem), avšak se zbytkem proteinu zůstává kovalentně spojena hypotetickým disulfidickým můstkem, protože struktura aktivní peptidázy IrSRP-1 obsahuje jeden nepárový cystein (Obr. 5B na str. 24). Aktivní peptidázu se však nepodařilo spolehlivě detekovat na Western blotu z jednotlivých tkání polonasátých samic.



Z výsledků imunohistochemického značení byla jasně prokázána přítomnosti IrSRP-1 v trávicích buňkách střevního epitelu plně nasátých samic a ve vnitrobuněčných váčcích a na povrchu hemocytů. Signál nebyl detekován v totálních preparátech slinných žláz, stejně jako u Western blotu a qRT-PCR profilu, z čehož lze dedukovat, že se IrSRP-1 ve slinných žlázách s nejvyšší pravděpodobností nevyskytuje. U trachejí, vykazujících signál na Western blotu, se nepodařilo IrSRP-1 lokalizovat na totálním preparátu, což může být zapříčiněno rozdíly citlivostí chemiluminiscenčního a fluorescenčního značení.

Podle dosavadních výsledků přeživacích pokusů po RNAi s dsRNA (*iIrSRP-1*) se zdá, že IrSRP-1 má vliv na sání samic (pouze 28 % *iIrSRP-1* samic bylo schopných se nasát). Naopak umlčení *IrSRP-1* genu neovlivnilo vykladení snůšky a líhnutí larev (100 % z přežitých *iIrSRP-1* samic bylo schopno vyklást snůšku a ze všech snůšek se vylíhly larvy). Pro vyvození spolehlivých závěrů bude ale nutné pokus zopakovat nejméně v biologickém triplikátu.

Ze současných získaných dat lze vyvozovat, že IrSRP-1 je mnohodoménový protein, exprimovaný v různých tkání, nejvíce však ve střevě sajících samic. Jeho exprese je up-regulována sáním a zvyšuje se ještě několik dnů po sání. Při umlčení *IrSRP-1* genu nejsou samice schopny se plně nasát, takže se zdá, že IrSRP-1 zastává nějakou důležitou roli během sání. Vzhledem k tomu, že patří do skupiny scavenger receptorů, stejně jako savčí CD163, mohl by například sloužit jako hemoglobinový receptor a zprostředkovávat tak jeho endocytózu do trávicích buněk střevního epitelu. Pro svoji komplexnost a předpokládané posttranslační modifikace (3 NetNGlyc 1.0 Server predikovaná N-glykosylační místa v dosavadní ověřené sekvenci) je však vysoce pravděpodobné, že IrSRP-1 plní mnoho různých funkcí, které se patrně liší v závislosti na typu tkáně. IrSRP-1 by mohl v hemocytech zastávat roli ve vrozené imunitě klíštěte. Mohl by se například účastnit imunitních reakcí v roli tzv. PRR receptoru (*pattern recognition receptor*, receptor rozpoznávající cizorodé agens) nebo se podílet na srážení hemolymfy. Tomu všemu by nasvědčovala jeho doménová struktura. Lektinová doména typu C by mohla rozpoznávat peptidoglykany či lipopolysacharidy na povrchu  $G^+$  a  $G^-$  bakterií, Kringle doména se účastnit koagulace hemolymfy, SRCR doména by mohla vázat patogeny a zahajovat jejich fagocytózu hemocyty, nemluvě o významu trypsinové domény, která se účastní řady proteolytických procesů podílejících se na zánětlivých reakcích, koagulaci aj. Vzhledem k relativně vyšší hladině mRNA ve vajíčcích by se IrSRP-1 mohl také podílet na embryonálním vývoji klíštěte. Obecně však

nelze přepokládat funkci IrSRP-1 ve vývoji klíštěte, neboť ve všech ostatních stádiích (larvách, nymfách, popř. samcích a nenasátých samicích) je relativní exprese *IrSRP-1* genu téměř nulová. Tuto hypotézu navíc potvrzují data z přeživacího pokusu, která dokazují, že po umlčení *IrSRP-1* genu jsou samice schopné vyklást snůšku a z vajíček se mohou lítnout larvy.

## 6. Závěr

Byla identifikována částečná sekvence (1680 bp) nově popsaného scavenger receptoru-trypsinové proteázy IrSRP-1 z klíštěte *I. ricinus*, kódující dvě SRCR domény, LDL receptor a doménu tryptsinové proteázy. Na základě EST dat z několika druhů klíšťat byla predikována kompletní proteinová sekvence IrSRP-1 (150 kDa), navíc zahrnující ještě jednu SRCR doménu, dva další LDL receptory, lektinovou doménu typu C (CLECT), Kringle doménu a PAN/APPLE doménu.

Z výsledků qRT-PCR profilů byla prokázána up-regulace IrSRP-1 sáním. Naopak nebyl prokázán vliv přítomnosti několika různých patogenů (Gram<sup>+</sup>/ Gram<sup>-</sup> bakterie a kvasinky) na relativní expresi IrSRP-1. Nejvyšší hladina mRNA v rámci tkáňového profilu byla detekována ve střevech sajících samic *I. ricinus*. V larvách, nenasátých nymfách, nenasátých samicích a u samců je hladina *IrSRP-1* mRNA nulová.

V bakteriálním systému *E. coli* byl exprimován rekombinantní protein tryptsinové domény rIrSRP-1, který byl přečištěn a renaturován. Nepodařilo se však získat aktivní rekombinantní protein pro biochemickou charakterizaci a ověření substrátové specifity.

Byly připraveny a afinitně přečištěny protilátky proti rIrSRP-1, s nimiž byl proveden Western blot a imunohistochemické značení IrSRP-1 v různých tkáních klíštěte *I. ricinus*. Prostřednictvím Western blotu byl detekován nejsilnější signál ve střevech plně nasátých samic a dále v malpighických trubicích, vaječnicích a hemolymfě. Signál nebyl detekován ve slinných žlázách. Na základě imunolokalizace byla prokázána přítomnost IrSRP-1 pouze v trávicích buňkách ve střevech plně nasátých samic a v hemocytech.

Z dosavadních výsledků RNA interference byl pozorován vliv IrSRP-1 na sání samic *I. ricinus*, nikoliv na kladení a líhnutí larev.

## 7. Seznam použité literatury

Acton S., Rigotti A., Landschulz K.T., Xu S., Hobbs H. H., Krieger M. (1996) *Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor*. Science 271: 518-520.

Aung K.M., Boldbaatar D., Umemiya-Shirafuji R., Liao M., Xuenan X., Suzuki H., Galay R.L., Tanaka T., Fujisaki K. (2011) *Scavenger receptor mediates systematic RNA interference in ticks*. PLoS ONE 6: e28407.

Blumbach B., Pancer Z., Diehl-Seifert B., Steffen R., Muniner R., Muller I., Muller W.E. (1998) *The putative sponge aggregation receptor. Isolation and characterization of a molecule composed of scavenger receptor cysteine-rich domains and short consensus repeats*. J. Cell Sci. 111: 2635-2644.

Claudianos C., Dessens J.T., Trueman H.E., Arai M., Mendoza J., Butcher G.A., Crompton T., Sinden R.E. (2002) *A malaria scavenger receptor-like protein essential for parasite development*. Mol. Microbiol. 45: 1473-1484.

Coons L.B., Alberti G. (1999) *The Acari ticks*. In *Microscopis Anatomy of Invertebrates* (Harrison F.W., Foelix R.), 267-514.

Danielli A., Loukeris T.G., Lagueux M., Müller H.M., Richman A., Kafatos F.C. (2000) *A modular chitin-binding protease associated with hemocytes and hemolymph in the mosquito Anopheles gambiae*. PNAS 97: 7136-7141.

Dinguirard N., Yoshino T.P. (2006) *Potential role of a CD36-like class B scavenger receptor in the binding of modified low-density lipoprotein (acLDL) to the tegumental surface of Schistosoma mansoni sporocysts*. Molecular and Biochemical Parasitology 146: 219-230.

Drickamer K. (1999) *C-type lectin-like domains*. Curr. Opin. Struct. Biol. 9: 585-590.

Ernst T., Hergenahn M., Kenzelmann M., Cohen C.D., Bonrouhi M., Weninger A., Klaren R., Grone E.F. a kol. (2002) *Decrease and gain of gene expression are equally discriminatory markers for prostate carcinoma gene expression analysis on total and microdissected prostate tissue*. Am. J. Pathol. 160: 2169–2180.

Fabrick B.O., Polfliet M.M., Vloet R.P., van der Schors R.C., Ligtenberg A.J., Weaver L.K., Geest C., Matsuno K., Moestrup S.K., Dijkstra C.D., van der Berg T.K. (2007) *The*

*macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor.* Blood 109: 5223-5229.

Fabriek B.O., van Bruggen R., Deng D.M., Ligtenberg A.J., Nazmi K., Schornagel K., Vloet R.P., Dijkstra C.D., van den Berg T.K. (2009) *The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria.* Blood 113: 887-892.

Franke-Fayard B., Janse C.J., Cunha-Rodrigues M., Ramesar J., Büscher P. a kol. (2005) *Murine malaria parasite sequestration: CD36 is the major receptor, but cerebral pathology is unlinked to sequestration.* Proc Natl Acad Sci U S A 102: 11468-11473.

Friebertshäuser B.E., Freuer C., Sielaff F., Schmidt S., Eickmann M., Uhlenhoff J., Steinmetzer T., Klenk H.D., Garten W. (2010) *Cleavage of Influenza Virus Hemagglutinin by Airway Proteases TMPRSS2 and HAT Differs in Subcellular Localization and Susceptibility to Protease Inhibitors.* J. Virol. 84: 5605-5614.

Furlong S.T., Thibault K.S., Rogers R.A (1992) *Fluorescent phospholipids preferentially accumulate in sub-tegmental cells of schistosomula of Schistosoma mansoni.* J. Cell Sci 103: 823–830.

Garten W., Matrosovich M., Matrosovich T., Eickmann M., Vahhabzadeh A. (2004) *Cleavage of influenza virus hemagglutinin by host cell proteases.* Internat. Congress Series 1263: 218-221.

Gent J., Braakman I. (2004) *Low-density lipoprotein receptor structure and folding.* CMLS 61: 2461-2470.

Goldstein J.L., Ho Y.K., Basu S.K., Brown M.S. (1979) *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition.* PNAS 76: 333-337.

Goldstein J.L., Brown M.S., Anderson R.G.W., Russell D.W., Schneider W.J. (1985) *Receptor-Mediated Endocytosis: Concepts Emerging from the LDL Receptor System.* Ann. Rev. Cell Biol. 1: 1-39.

Gorman M.J., Andreeva O.V., Paskewitz S.M. (2000) *Sp22D: a multidomain serine protease with a putative role in insect immunity.* Gene 251: 9-17.

- Graca-Souza A. V., Maya-Monteiro C., Paiva-Silva G. O., Braz G. R., Paes M. C., Sorgine M. H., Oliveira M.F., Oliveria P.L. (2006) *Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods*. Insect Biochem. Mol. Biol. 36: 322–335.
- Grandjean O., Aeschlimann A. (1973) *Contribution to the study of digestion in ticks: histology and fine structure of the midgut epithelium of Ornithodoros moubata, Murray (Ixodoidea, Argasidae)*. Acta Trop. 30: 193–212.
- Hajdušek O., Šíma R., Nieves A., Jalovecká M., Perner J., Fuente J., Kopáček P. (2013) *Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens*. Front Cell Infect Microbiol. 3: 1-15.
- Holm D., Fink D.R., Gronlund J., Hansen S., Holmskov U. (2009) *Cloning and characterization of SCART1, a novel scavenger receptor cysteine-rich type I transmembrane molecule*. Mol. Immunol. 46: 1663-1672.
- Huizinga E.G., Schouten A., Connolly T.M., Kroon J., Sixma J.J., Gros P. (2001) *The structure of leech anti-platelet protein, an inhibitor of haemostasis*. Acta Cryst. 57: 1071-1078.
- Jongejan F., Uilenberg G. (2004) *The global importance of ticks*. Parasitology 129: S3–14.
- Kazama Y., Hamamoto T., Foster D.C., Kisiel W. (1995) *Hepsin, a putative membrane-associated serine protease, activates human factor VII and initiates a pathway of blood coagulation on the cell surface leading to a thrombin formation*. J. Biol. Chem. 270: 66-72.
- Kopáček P., Hajdušek O., Burešová V., Daffre S (2010) *Tick innate immunity*. Adv Exp Med Biol. 708: 137-162.
- Krieger M. (1997) *The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense*. Curr. Opin. Lipidol. 8: 275-280.
- Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C., Sonne O., Hoffman H.J., Law S.K., Moestrup S.K. (2001) *Identification of the haemoglobin scavenger receptor*. Nature 409: 198-201.
- Kröber T., Guerin P.M. (2007) *In vitro feeding assay for hard ticks*. Trends in Parasitology 23: 445-449.

- Lara F.A., Lins U., Paiva-Silva G., Almeida I.C., Braga C.M., Miguens F.C. a kol. (2003) *A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick Boophilus microplus: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome*. J. Exp. Biol. 206: 1707–1715.
- Lara F.A., Lins U., Bechara G.H., Oliveira P.L. (2005) *Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick Boophilus microplus*. J. Exp. Biol. 208: 3093–3101.
- Law S.K., Micklem K.J., Shaw J.M., Zhang X.P., Dong Y., Willis A.C., Mason D.Y. (1993) *A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily*. Eur. J. Immunol. 23: 2320-2352.
- Li X., Bokman A.M., Llinás M., Smith R.A.G., Dobson C.M. (1994) *Solution Structure of the Kringle Domain form Urokinase-type Plasminogen Activator*. Journal of Molecular Biology 235: 1548-1559.
- Lin B., Ferguson C., White J.T., Wang S., Vessella R., True L.D., Hood L., Nelson P.S. (1999) *Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS21*. Cancer Res. 59: 4180-4184.
- Megy K., Emrich S.J., Lawson D., Campbell D., Dialynas E., Hughes D.S.T., Koscielny G., Louis C., MacCallum R.M. a kol. (2012) *VectorBase: improvements to a bioinformatics resource for invertebrate vector genomics*. Nucleic Acids Res. 40: D729-D734.
- Mikolajczak S.A., Jacobs-Lorena V., MacKellar D.C., Camargo N., Kappe S.H. (2007) *L-FABP is a critical host factor for successful malaria liver stage development*. Int. J. Parasitol. 37: 483–489.
- Moreno J.A., Munoz-Garcia B., Martin-Vantura J.L., Madrigal-Matute J., Orbe J., Paramo J.A., Ortega L., Egidio J., Blanco-Colio L.M. (2009) *The CD163- expressing macrophages recognize and internalize TWEAK potential consequences in atherosclerosis*. Atherosclerosis 207: 103-110.
- Murphy J.E., Tedbury P.R., Homer-Vanniasinkam S., Walker J.H., Ponnambalam S. (2005) *Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors*. Atherosclerosis 182: 1-15.

- Nava S., Guglielmo A.A., Mangold A.J (2009) *An overview of systematics and evolution of ticks*. Front Biosci. 14: 2857-2877.
- O'Donoghue A.J., Eroy-Reveles A.A., Knudsen G.M., Ingram J., Zhou M., Statnekov J.B. a kol. (2012) *Global identification of peptidase specificity by multiplex substrate profiling*. Nat Methods 9: 1095-10100.
- Ojala J.R.M., Pikkarainen T., Tuuttila A., Sandalova T., Tryggvason K. (2007) *Crystal Structure of the cysteine-rich domain of scavenger receptor MARCO reveals the presence of a basic and an acidic cluster that both contribute to ligand recognition*. J. Biol. Chem. 282: 16654-16666.
- Pal U., Li X., Wang T., Montgomery R.R., Ramamoorthi N., Desilva A.M., Bao F., Yang X., Pypaert M., Pradhan D., Kantor F.S., Telford S., Anderson J.F., Fikrig E. (2004) *TROSPA, an Ixodes scapularis receptor for Borrelia burgdorferi*. Cell 119: 457-68.
- Parola P., Raoult D. (2001) *Tick and tickborne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat*. Clin. Infect Dis. 32: 897-928.
- Pfaffl M.W. (2001) *A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR*. Nucl. Acids Res. 29: e45.
- Plüddemann A., Neyen C., Gordon S. (2007) *Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands*. Methods 43: 207-217.
- Polgár L. (2005) *The catalytic triad of serine peptidases*. Cell. Mol. Life Sci. 62: 2161–72.
- Rast J.P., Smith L.C., Loza-Coll M., Hibino T., Litman G.W. (2006) *Genomic Insights into the Immune System of the Sea Urchin*. Science 314: 952-956.
- Rawlings N.D., Salvesen G.S., editors, *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Oxford: Academic Press, 2013.
- Rigotti A., Acton S.L., Krieger M. (1995) *The class B scavenger receptors SRBI and CD36 are receptors for anionic phospholipids*. J. Biol. Chem. 270: 16221–16224.



Ritter M., Buechler C., Langman T., Schmitz G. (1999) *Genomic organization and chromosomal localization of the human CD163 (M130) gene: a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 260: 466-474.

Rodrigues C.D., Hannus M., Prudêncio M., Martin C., Gonçalves L.A., Portugal S., Epiphânio S a kol. (2008) *Host Scavenger Receptor SR-BI Plays a Dual Role in the Establishment of Malaria Parasite Liver Infection*. Cell Host & Microbe 4: 271-282.

Sarrias M.R., Gronlund J., Padilla O., Madsen J., Holmskov U., Lozano F. (2004) *The scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain: an ancient and highly conserved protein module of the innate immune system*. Crit. Rev. Immunol. 24: 1-37.

Sauer J. R., Essenberg R. C., Bowman A. S. (2000) *Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion*. J. Insect Physiol. 46: 1069-1078.

Silvie O., Charrin S., Billard M., Franetich J.F., Clark K.L., van Gemert G.J., Sauerwein R.W., Dautry F., Boucheix C., Mazier D., Rubinstein E. (2006) *Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites*. J. Cell Sci. 119: 1992–2002.

Smith T.N., Brooks T.J., Lockard V.G (1970) *In vitro studies on cholesterol metabolism in the blood fluke Schistosoma mansoni*. Lipids 5: 854–856.

Sojka D., Franta Z., Frantová H., Bartošová P., Horn M., Váchová J., O'Donoghue A.J., Eroy-Reveles A.A., Craik C.S., Knudsen G.M., Caffrey C.R. a kol. (2012) *Characterization of Gut-associated Cathepsin D Hemoglobinase from Tick Ixodes ricinus (IrCD1)*. J. Biol. Chem. 287: 21152-21163.

Sojka D., Franta Z., Horn M., Caffrey C.R., Mareš M., Kopáček P. (2013) *New insight into the machinery of blood digestion by ticks*. Trends in Parasitology 29: 276-285.

Sonenshine D.E. (1991) *Biology of Ticks*, Oxford University Press.

Tanimoto H., Yan Y., Clarke J., Korourian S., Shigemasa K., Parmley T.H., Parham G.P., O'Brien T.J. (1997) *Hepsin, a cell surface serine protease identified in hepatoma cells, is overexpressed in ovarian cancer*. Cancer Res., 57: 2884–2887.

Van Gorp H., Van Breedam W., Delputte P.L., Nauwynck H.J. (2009) *The porcine reproductive and respiratory syndrome virus requires trafficking through CD163 positive early endosomes, but not late endosomes, for productive infection*. Arch. Virol. 154: 1939-1943.

Van Gorp H., Delputte P.L., Nauwynck H.J. (2010) *Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy*. Mol. Immunol. 47: 1650-1660.

Zacharski L.R., Ornstein D.L., Memoli V.A., Rousseau S.M., Kisiel W. (1998) *Expression of the factor VII activating protease, hepsin, in situ in renal cell carcinoma*. Thromb. Haemost. 79: 876–877.

Zou Z., Lopez D.L., Kanost M.R., Evans J.D., Jiang H. (2006) *Comparative analysis of serine protease-related genes in the honey bee genome: possible involvement in embryonic development and innate immunity*. Insect Mol Biol. 15: 603-14.