

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Izolace a charakterizace nového antimikrobiálního peptidu (defenzinu)
exprimovaného v klíštěti obecném *Ixodes ricinus*.**

Diplomová práce

Bc. Nelly Keplová

Školitelka: Maryna Golovchenko, MSc

Vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD

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

České Budějovice 2016

Keplová N., 2016: Izolace a charakterizace nového antimikrobiálního peptidu (defenzinu) exprimovaného v klíštěti obecném *Ixodes ricinus*. [Isolation and characterisation of novel antimicrobial peptide (defensin) expressed in *Ixodes ricinus* tick. Mgr. Thesis, in Czech.] – 72.p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Ticks are important blood feeding arthropod vectors of different pathogens. Control of tick-borne pathogens is complicated due to a lack of vaccines. Development of the novel methods of tick control and search of the new vaccine candidates are required for suppression of tick populations and for control of tick-borne infectious diseases. Among possible candidates, defensins are especially interesting. In this study, a novel anionic *Ixodes ricinus* defensin named AnIrDef is described, and its antimicrobial activity in vitro is confirmed. Due to the similarity with defensins from other ticks, it is assumed that *I. ricinus* AnIrDef is involved in the defence against microbes from bloodmeals.

Diplomová práce byla financována z grantů FP7 EC projekt ANTIGONE, projektové číslo – 278976 a Studentskou grantovou agenturou (SGA) PřF JU.

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

V Českých Budějovicích, 18. 4. 2016

.....

Nelly Keplová

Ráda bych poděkovala svým školitelkám Natalii Rudenko, Ph.D. a Maryně Golovchenko, MSc. za podporu, trpělivost a veškerou pomoc během experimentů a tvorby diplomové práce. Poděkování patří i Prof. RNDr. Liboru Grubhofferovi, CSc., který mi umožnil pracovat v Laboratoři molekulární biologie vektorů a patogenů. Také bych ráda poděkovala za ochotu vždy zodpovědět veškeré mé dotazy a pomoci mi RNDr. Jánů Štěrbovi, PhD. a RNDr. Pavlíně Věchtové, PhD. Mé díky patří i Ing. Gabriele Loosové, která mi pomohla při pitvání klíšťat a Janu Erhartovi za ochotu při poskytování klíšťat.

V neposlední řadě děkuji své nejbližší rodině za velkou podporu.

Obsah

1. Úvod	4
1.1. Antimikrobiální peptidy (AMPs).....	4
1.1.1. Dělení AMPs	5
1.1.2. Mechanismus účinku.....	7
1.1.3. Rezistence G- bakterií na AMPs	8
1.1.4. Antimikrobiální peptidy bezobratlých.....	10
1.2. Defenziny.....	11
1.2.1. Klasifikace defenzinů	11
1.2.2. Mechanismus účinku defenzinů	14
1.2.3. Syntéza defenzinů.....	14
1.2.4. Záporně nabité defenziny	14
1.3. Imunita klíšťat.....	15
1.3.1. Defenziny klíšťat	16
1.4. Klinické využití AMPs	17
2. Cíle práce	21
3. Materiál a metody	22
3.1. Materiál.....	22
3.2. Metody	24
3.2.1. Klíšťata <i>Ixodes ricinus</i>	24
3.2.2. Příprava klíšťat	24
3.2.3. Izolace RNA	24
3.2.4. Syntéza cDNA	25
3.2.5. Měření koncentrace	25
3.2.6. Izolace plazmidové DNA	25
3.2.7. Izolace genomové DNA	25
3.2.8. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	25
3.2.9. 3'RACE PCR.....	27
3.2.10. RT PCR.....	29
3.2.11. Gelová elektroforéza.....	30
3.2.12. Purifikace PCR produktu z gelu	30
3.2.13. Klonování PCR produktu do vektoru a transformace kompetentních One Shot TOP10 <i>E. coli</i> buněk	30
3.2.14. Purifikace plazmidové DNA.....	30

3.2.15.	Screening rekombinantů pro přítomnost inzertu.....	30
3.2.16.	Analýza sekvence	31
3.2.17.	Klonování PCR produktů do expresního vektoru Champion™ pET101/D-TOPO® a exprese rekombinantního proteinu.....	31
3.2.18.	Western blot.....	32
3.2.19.	Purifikace rekombinantního proteinu při nativních podmínkách	32
3.2.20.	Analýza vzorků pomocí SDS – page elektroforézy.....	33
3.2.21.	Antimikrobiální aktivita rekombinantního proteinu - pilotní pokus.....	33
4.	Výsledky	35
4.1.	Izolace RNA, DNA a syntéza cDNA.....	35
4.2.	Izolace fragmentu defenzinu.....	36
4.3.	3'RACE PCR.....	37
4.4.	<i>In silico</i> charakterizace proteinu	40
4.5.	Produkce rekombinantního proteinu.....	47
4.6.	Antimikrobiální aktivita rekombinantního proteinu - pilotní pokus.....	50
4.7.	Expese genu kódujícího AnIrDef v různých tkáních a vývojových stádiích <i>I. ricinus</i>	52
4.8.	Analýza genomové struktury genu kódujícího AnIrDef.....	54
5.	Diskuze.....	56
6.	Závěr	60
7.	Použité zkratky	61
8.	Literatura	62

Studie je věnována novému antimikrobiálnímu peptidu (AMP) z klíštěte obecného - *Ixodes ricinus*. Potřeba studií nových látek s antimikrobiálními účinky plyne z klesající účinnosti doposud známých antibiotik (ATB), která je následkem podávání těchto léků v nadměrném množství. Výsledkem je, že bakterie si během let vyvinuly mechanismy rezistence, a navíc jsou schopny tyto rezistence šířit i mezidruhově. Došlo tak, například, k vývoji methicilin-rezistentního zlatého stafylokoka (MRSA, z angl. methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Rezistence se obvykle vyvíjejí na několik druhů léčiv zároveň a dochází tak ke zvyšování úmrtí lidí i jiných živočichů v důsledku neúčinnosti ATB. Další příčinou zvyšující se rezistence patogenu je použití ATB i v hospodářství. Z těchto důvodů je nutné vytvořit novou generaci léků proti bakteriím. Jako vhodnou alternativou antibiotik se jeví AMPs. Výhodou AMPs je odlišný mechanismus působení na bakterie než v případě antibiotik. Studie antimikrobiálních peptidů jsou prováděny především u bezobratlých (včetně klíšťat), jelikož tyto peptidy jsou velmi důležitou součástí jejich přirozeného imunitního systému, tudíž musejí být i velmi účinné (Li et al., 2012). Navíc nám nové poznatky o AMPs prozradí více o imunitním mechanismu klíštěte.

1. Úvod

1.1. Antimikrobiální peptidy (AMPs)

V posledních letech dochází k neustálému objevování nových látek s antimikrobiálními účinky. Antimikrobiální peptidy (AMP) představují jednu z nejstarších složek humorální přirozené imunity různých organismů. Antibakteriální účinnost AMPs závisí na vlastnostech, jako je náboj, konformace, polarita, amfipaticita a hydrofobicita (Yeaman et al., 2003). AMPs se obvykle začínají syntetizovat po rozpoznání mikroba imunitním systémem hostitele, popřípadě mohou být rozmístěny předběžně v místech s velkou pravděpodobností styku s mikrobem jako je kůže, gastrointestinální trakt nebo respirační trakt (Epanand et al., 1999, Hiemstra et al., 2013). Peptidy jsou tvořeny nejčastěji v tukovém tělísku nebo v hemocytech, odkud se vylučují do hemolymfy (Nakajima et al., 2002). AMPs jsou ochranou před mikroby, viry a buněčnými parazity, jsou vhodným doplňkem k adaptivní imunitě, která je velmi účinná, ale poměrně pomalá, a také jsou základem pro rychlou odpověď (Hiemstra et al., 2013).

Tab. I: Příklad nejčastěji se vyskytujících AMPs v přírodě (Ganz, 2003).

Struktura	Reprezentující peptid	Druh a tkáň	Antimikrobiální aktivita
4-disulfidické můstky, α-helix, β-sheet	rostlinné defenziny, drosomycin	rostliny, hemolymfa bezobratlých	houby
3-disulfidické můstky, β-sheet	α , β -defenziny	neutrofily savců	bakterie, houby, viry
3-disulfidické můstky, α-helix, β-sheet	hmyzí defenziny	hemolymfa bezobratlých	G+ bakterie
3-disulfidické můstky, 2x α-helix, β-sheet	γ -thioniny	rostliny	bakterie, savčí buňky, houby
2-disulfidické můstky, β-sheet	protegriny, tachyplesiny, polyphemusiny	neutrofila prasat, hemocyty krabů	bakterie, houby, viry
1-cyklický disulfid	bactenecin-1, cyklický dodekapeptid ranalexin, brevinin	leukocyty přežvýkavců, kůže obojživelníků	bakterie
α-helix	cecropiny, magainin, PGLa, LL 37	hemolymfa hmyzu, leukocyty savců, kůže obojživelníků	bakterie
lineární s opakujícími se motivy	bacteneciny-5 a 7, PR-39, indolicin, diptericin, apidaecin	leukocyty savců, hemolymfa hmyzu	bakterie

1.1.1. Dělení AMPs

- Náboj

Nejčastěji u defenzinů je náboj kladný s neutrálním pH. Kladný náboj je důležitý pro usnadnění vaznosti AMPs na záporně nabitě struktury mikrobiální stěny. Nejmenší kladný náboj pro vaznost na membránu je +2, normálně se pohybuje od +2 až +10. Náboj je daný aminokyselinami (AMK), které se ve struktuře vyskytují (Yeaman et al., 2003).

Záporný náboj u antimikrobiálních látek byl objeven v 80. letech 20. století a od té doby je uznávanou nedílnou součástí vrozeného imunitního systému rostlin, bezobratlých a obratlovců. Antimikrobiální peptidy jsou aktivní proti bakteriím, houbám, virům a škůdcům jako je hmyz. Zdá se, že u některých AAMPs (anionic antimicrobial peptides) není nejdůležitější biologickou funkcí antimikrobiální aktivita, ale jiné biologické aktivity (Harris et al. 2016). AAMPs mohou být i podpůrnými peptidy pro funkčnost kladně nabitých AMPs (Wang Z. et al, 2003). Pro AAMPs je charakteristický náboj -1 až -7, délka peptidu je od 5 po 70 AMK a pro většinu je typická posttranslační modifikace, která je esenciální pro antimikrobiální aktivitu. Membránové interakce se zdají být klíčové pro funkčnost AAMPs. Nejčastěji využívají amfipatické struktury (Harris et al., 2016).

- Konformace

AMPs mají strukturu složenou z α helixu a β sheetu (Yeaman et al., 2003). Na základě konformace jsou AMPs rozdělené do 4 skupin: α -helix, β -sheet, $\alpha\beta$ -struktury, non- $\alpha\beta$ -struktury (Wang G. Et al., 2010). U všech AMPs dochází k tvorbě disulfidických můstků, které jsou nezbytné pro správnou sekundární strukturu. Může dojít také ke glykosylaci nebo amidaci peptidu (Tossi et al., 2002, Brogden, 2005).

- Polární úhel

Polární úhel se u antimikrobiálních peptidů vytváří díky uspořádání hydrofobních a hydrofilních AMK (Yeaman et al., 2003). Zvýšený podíl hydrofobních AMK vede ke snížení polárního úhlu. Polární úhel je důležitý pro celkovou stabilitu vytvořených pórů v membráně cílové buňky (Lee et al., 2004). Menší polární úhel (a tedy vyšší hydrofobní povrch) je spojený se zvýšenou schopností AMPs permeabilizovat buněčné membrány. Nižší polární úhel má také spojitost s vyšší odolností pórů tvořených v membránách (Uematsu et al., 2000).

- Hydrofobicita

Hydrofobicita je vlastnost důležitá pro schopnost peptidu navázat se na patogenní buňku (Yeaman et al., 2003). Je definována jako podíl hydrofobních AMK v peptidu (v případě AMPs přibližně 50%). I když hydrofobicita je nutná pro účinnou permeabilizaci membrány, nadměrné zvýšení hydrofobicity vede k destrukci živočišných buněk a ke ztrátě antimikrobiální specifity (Saido et al., 2004, Yin et al., 2012). Proto je většina antimikrobiálních peptidů mírně hydrofobních.

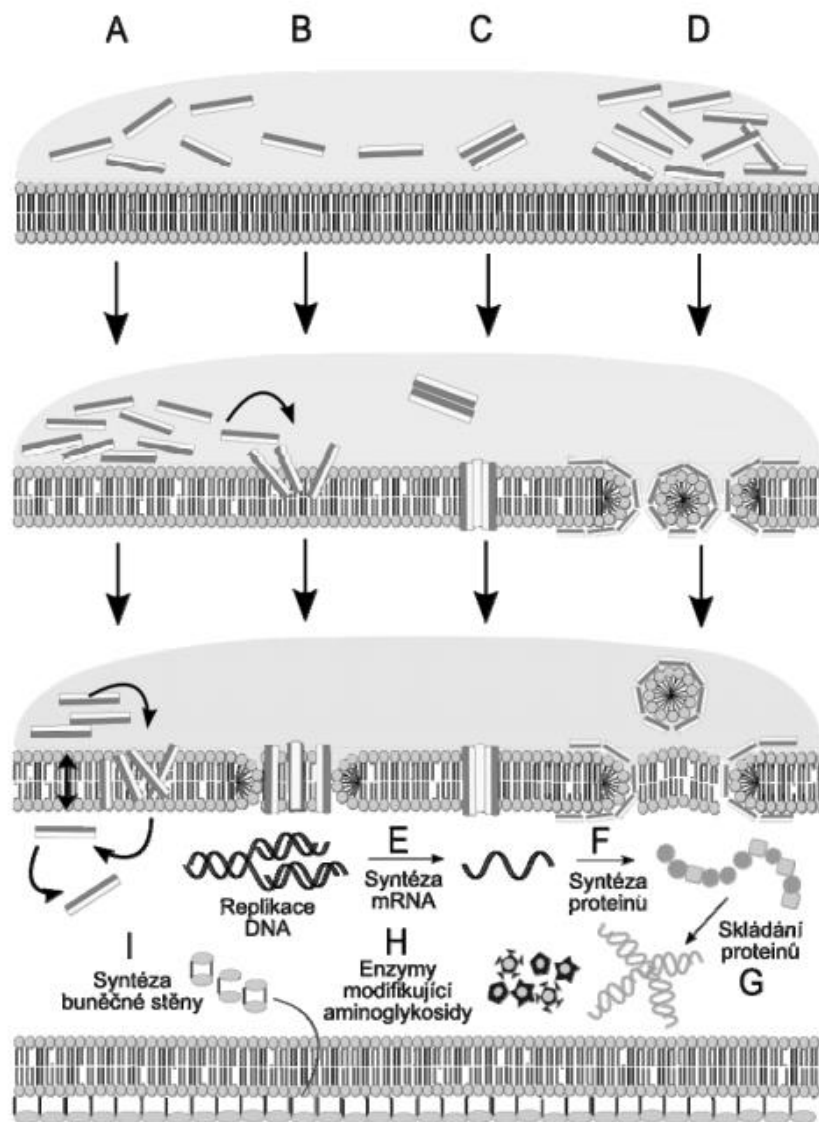
- Amfipaticita

Amfipaticita je nezbytná vlastnost pro snazší vázání antimikrobiálních peptidů na membránu cílové buňky. Nejčastější u AMPs bývá amfipatická struktura α helixů. Amfipacita peptidu je popsána hydrofobním momentem, který je vypočítáný z vektorové sumy hydrofobicity jednotlivých AMK. Zvyšující se hodnota hydrofobního momentu koreluje se zvyšující se schopností AMP integrovat se do membrány cílové buňky (Tossi et al., 2002).

1.1.2. Mechanismus účinku

K rozpoznání cizích organismů v těle dochází pomocí odlišných znaků v buněčné membráně a stěně patogenů. Specificita je dána rozpoznáním amfipatických vzorů, které zrcadlí fosfolipidy mikroba. Pro vyšší organismy je typické, že mají jiné složení membrány buněk než prokaryotické buňky. Mají ve svém složení cholesterol, sfingomyelin, fosfatidylcholin apod. Tyto látky nemají žádný náboj. K negativnímu náboji u mikrobů přispívají glykolipidy, lipoproteiny nebo lipopolysacharidy (Yeaman et al., 2003). AMPs mají schopnost integrovat se do buňky, kde jsou schopné porušit bakteriální membránu, či inhibovat syntézu proteinů, DNA nebo RNA (Bahar et al., 2013). Dalším mechanismem AMPs jsou intracelulární cíle jako je inhibice syntézy DNA, proteinů a enzymové aktivity, inhibice funkcí podílejících se na sestavování proteinů, inhibice syntézy buněčné stěny a cytoplazmatické membrány, vyvolání apoptózy nebo nekrózy buněk zvýšením počtů molekul ROS, nebo zvýšením koncentrace K^+ a Ca^{2+} (Yeaman et al., 2003). Obecně platí, že antimikrobiální aktivita je nejsilnější v prostředí s nízkou koncentrací iontů, naopak vysoká koncentrace např. Ca^{2+} iontů inhibuje aktivitu, stejně tak teplota pod $17^{\circ}C$ (Kagan et al., 1994).

Důležitou vlastností AMPs je rychlost reakce na bakterie. Některé peptidy jsou schopné zlikvidovat bakterii za několik sekund po prvotním setkání s ní (Bahar et al., 2013).



Obr. 1: Mechanismus účinku antimikrobiálních peptidů na buňku (Neubauerová et al., 2009).

Tento mechanismus platí pro většinu AMPs, které mají pozitivní náboj.

Mechanismus účinku u záporně nabitých AMPs není zcela prozkoumaný a u většiny AMP není zřejmý vůbec. U některých důležitou roli hrají kovové ionty, které vytvářejí přemostění mezi záporně nabitou molekulou AMPs a záporně nabitou cytoplazmatickou membránou (Harris et al., 2009).

1.1.3. Rezistence G- bakterií na AMPs

Ačkoli rezistence bakterií na AMPs není obvyklá, některé bakterie byly schopné vytvořit účinné mechanismy pro svou ochranu (Guilhelmelli et al. 2013). Tyto mechanismy jsou: a) modifikace povrchu, b) exprese efluxních pump, c) sekrece proteáz a jiných enzymů.

a) Modifikace povrchu

AMPs jsou cílené především na G- bakterie, které mají na svém povrchu negativní náboj. Tudíž při snížení negativního náboje na povrchu bakterie dochází ke snížené účinnosti AMPs. Některé bakterie, například *P. aeruginosa* nebo *Salmonella Typhimurium*, jsou schopné přidávat kladně nabitě molekuly, aby došlo ke snížení záporného náboje jejich povrchové membrány. Těmito molekulami mohou být cukry s obsahem aminoskupin (Nizet, 2006, Moskowitz et al., 2004, Band et al., 2015). Jiné bakterie, jako například *F. tularensis* nebo *H. pyroli*, jsou schopné odstraňovat záporně nabitě zbytky tak, aby snížily svůj záporný náboj (Tran et al., 2006, Wang X. et al., 2007). Kromě změny u lipopolysacharidů může docházet i k úpravě fosfolipidů. Příkladem jsou bakterie *Salmonella Typhimurium* nebo *S. aureus*, (Dalebroux et al., 2014, Cox et al., 2014). Dalším mechanismem je produkce kapsuly, vrstvy na vnější membráně, která je tvořená opakujícími se sacharidy. Tato vrstva zabraňuje účinnosti AMPs. Tento mechanismus pozorujeme například u *K. pneumoniae* nebo *N. meningitidis* (Campos et al., 2004, Jones et al., 2009). Další modifikací povrchu bakterie je tvorba biofilmu (Jolivet-Gougeon et al., 2014). Například bakterie *P. aeruginosa* je během tvorby biofilmu schopná sekretovat polymer (alginát), který mění konformaci AMPs a zabraňuje tím jejich přichycení k bakteriální membráně (Chan et al. 2004).

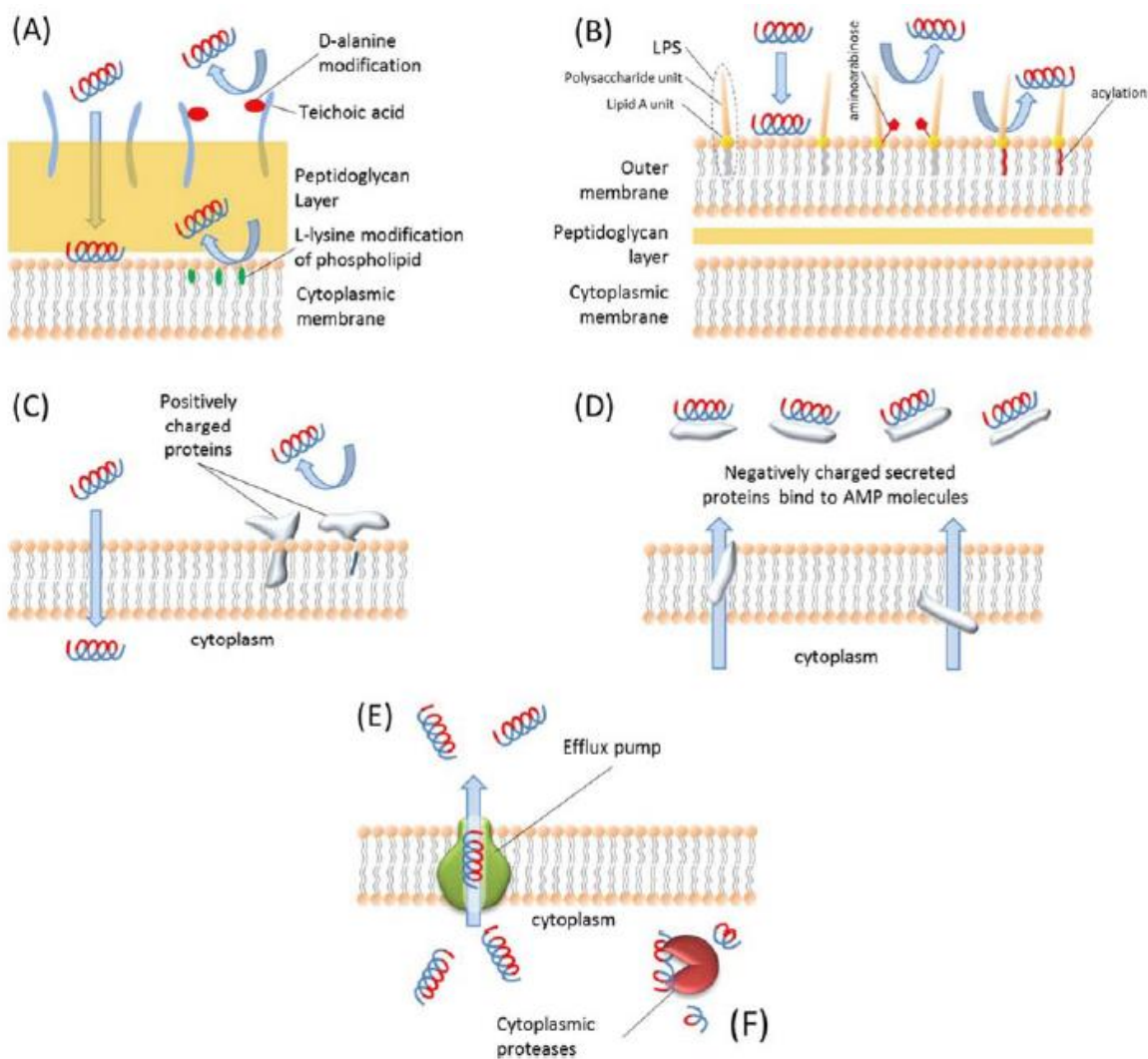
b) Exprese efluxních pump

Efluxní pumpy jsou transportní mechanismy, které jsou schopné vytlačovat toxické látky, včetně antibiotik, ven z bakterie. Tento mechanismus je jednou z možností, jak se bakterie brání účinku AMPs (Poole, 2007). Příkladem bakterie, která využívá tohoto systému je *Salmonella Typhimurium* nebo *E. cloacae* (Buckley et al., 2006, Pérez et al., 2012).

c) Sekrece proteáz a jiných enzymů

Některé bakterie jsou schopné vylučovat molekuly, které AMPs neutralizují a AMPs pak nejsou schopné se na povrch buňky navázat. Jedním z příkladů je SIC protein (streptococcal inhibitor of complement-mediated lysis), který je produkován bakterií *S. pyogenes* sérotypu M1. Tento protein je schopný blokovat AMPs v raném stádiu infekce *S. pyogenes* (Frick et al. 2003). Dalším příkladem je molekula SAC (staphylokináza) produkováná bakterií *S. aureus*, která má schopnost neutralizovat lidské α -defenziny HNP-1 (human neutrophil peptide) a HNP-2 tvořené v neutrofilech (Jin et al., 2004). Jedním

z mnoha mechanismů rezistence na AMPs je vyplavování záporně nabitých molekul, které vedou k neutralizaci AMPs. Bakterie, které využívají tento mechanismus, jsou například *P. aeruginosa*, *E. faecalis* nebo *S. pyogenes* (Schmidtchen et al., 2001). Přímá proteolytická degradace AMPs nebo modulace exprese jejich genů jsou dalšími mechanismy vyvinuté rezistence bakterií k AMPs (Guina et al., 2000).



Obr. 2: Schématické znázornění mechanismů rezistence bakterií na AMPs. A – modifikace disulfidické vrstvy u G+ bakterií, B – modifikace lipidové vrstvy A u G- bakterií, C – vmezeření kladně nabitých proteinů do vnější vrstvy bakterie, D – tvorba záporně nabitých molekul, které jsou schopné bakterie produkovat a vypouštět do prostředí, E – efluxní pumpa (Bahar et al., 2013).

1.1.4. Antimikrobiální peptidy bezobratlých

Antimikrobiální peptidy jsou velmi důležitou součástí imunitního systému bezobratlých, kteří nemají adaptivní imunitu, jako je tomu u vyšších živočichů. Množství objevených

AMPs bezobratlých roste každým dnem. AMPs bezobratlých jsou rozděleny do základních skupin podle AMK sekvence a antimikrobiální aktivity. Tyto skupiny jsou: cecropiny, lysozymy, hmyzí defenziny, peptidy bohaté na glycin a peptidy bohaté na prolin (Li et al., 2002). Peptidy se tvoří především v tukovém tělese bezobratlých a následně se uvolňují do hemolymfy (Hoffmann et al., 1999). Kromě hemolymfy se AMP také hojně vyskytují ve fagocytárních buňkách a to především v hemocytech (Ganz, 2003).

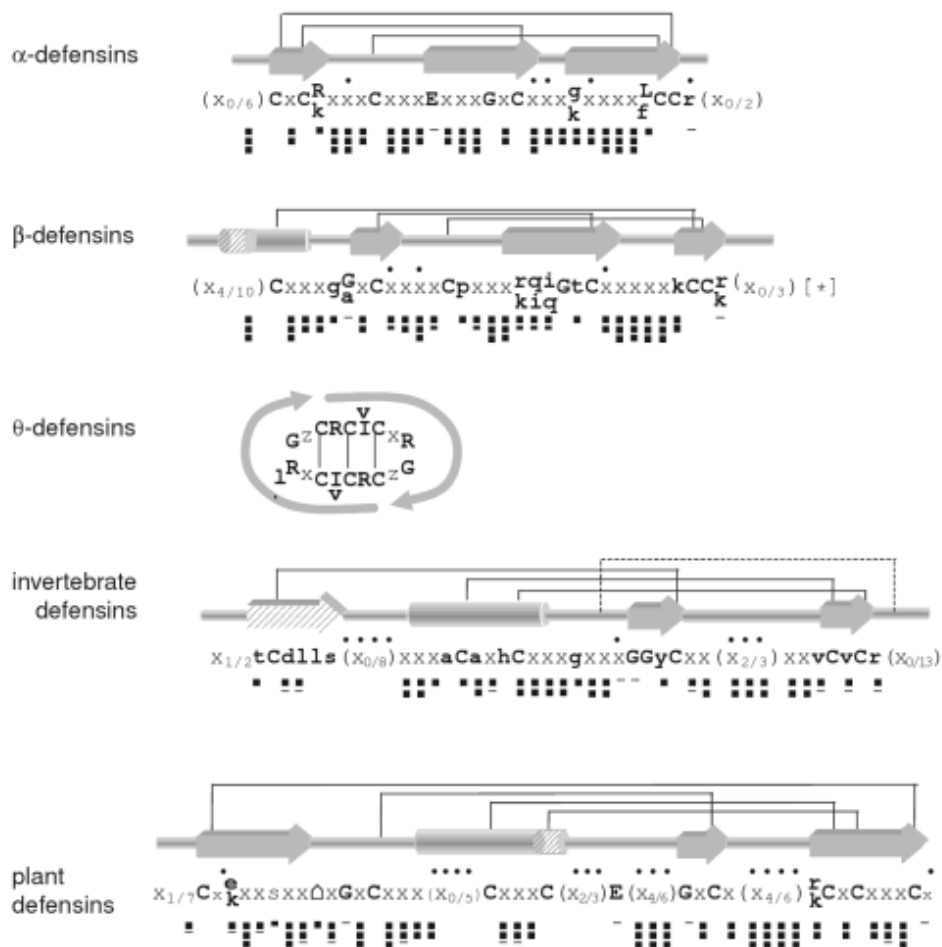
1.2. Defenziny

Defenziny byly prvotně popsány u savců v neutrofilech a makrofázích jako ochrana před viry a bakteriemi. Následně byly tyto molekuly nalezeny také u rostlin, hub, bezobratlých a ptáků. Typické tkáně, kde se defenziny produkují, jsou granulocyty obratlovců, fagocyty, lymfocyty, keratinocyty, panethové buňky a epitelální povrch. Antimikrobiální aktivita je pozorována především proti G⁺ i G⁻ bakteriím. Defenziny jsou malé molekuly o velikosti kolem 4kDa, většinou nesou kladný náboj a obsahují 6 cysteinů, které tvoří mezi sebou 3 disulfidické můstky. Mají 29 – 47 AMK. V každém defenzinu se nachází typický vzorec AMK: C-X (5–16) - C-X (3) - C-X (9–10) - C-X (4–7) - C-X (1)-C. Struktura defenzinů je velmi podobná toxinům škorpiónů (Lichtenstein., 1991, Beaty et al., 1996, Ganz, 2003, Seufi et al., 2011).

Kromě typické antimikrobiální aktivity mají defenziny i jiné biologické funkce. Příkladem je inhibice produkce glukokortikoidu blokováním ACTH (adrenokortikotropní hormon) (Fuse et al., 1993). Dalšími funkcemi defenzinů jsou degranulace žírných buněk, regulace aktivity komplementu, chemotaktická aktivita na vybrané leukocyty atd. (Oppenheim et al., 2003).

1.2.1. Klasifikace defenzinů

Podle primární struktury, homologie sekvencí, konservativního uspořádání cysteinů a disulfidických můstků jsou defenziny děleny na rostlinné, bezobratlých, α , β , and θ defenziny (Xiao et al., 2004). Všechny defenziny, které se vyskytují u bezobratlých, patří do skupiny bezobratlých defenzinů (White et al., 1995).



Obr. 3: Uspořádání disulfidických můstků u zástupců z každé skupiny defenzinů (Kastin, 2013).

- α defenziny

Tato skupina byla popsána jako první ze všech defenzinů. α defenziny se vyskytují u savců a jsou tvořené v savcích granulocytech, fagocytech a panethových buňkách. Tyto defenziny tvoří 5% všech proteinů v lidských granulocytech. Peptidy jsou vylučovány do fagocytárních vakuol pomocí fúze (Ganz et al., 1995). Tvorba disulfidických můstků je mezi cysteiny v pozici 1-6, 2-4, 3-5 (Ganz et al., 1985). Obsahují 29 – 35 AMK. Antimikrobiální aktivita je vyvíjena proti G⁺, G⁻ bakteriím, houbám, virům a protozoím (White et al., 1995).

- β defenziny

β-defenziny byly původně popsány v neutrofilech dobytka (koz a ovcí) jako 13 homologických peptidů, ve kterých byl disulfidický motiv a uspořádání peptidového

řetězce bylo výrazně odlišné od α -defenzinů (Selsted et al., 1993). Později byly β -defenziny objeveny také v kůži, pankreatu, ledvinách, slinných žlázách, prostatě, placentě, endocervixu, dýchacích cestách a v dásních obratlovců (Raj et al., 2002). Obsahují 38 – 42 AMK. Aktivitu vyvíjí proti G+, G- bakteriím a houbám (White et al., 1995).

- θ defenziny

Většina defenzinů má svou primární strukturu stabilizovanou 3 disulfidickými můstky. Nicméně nedávno došlo k objevení nové atypické skupiny defenzinů tzv. θ defenziny, které mají odlišnou strukturu. Dochází u nich k zacyklení peptidu díky disulfidickým vazbám. Tyto defenziny byly objevené v leukocytech primátů. Mají kolem 18 AMK a vyskytují se v granulocytech makrofágů a monocytů (Tang et al., 1999) Jsou fylogeneticky nejmladší skupinou po α a β defenzinech (Lehrer et al., 1999).

- Ovodefenziny

Ovodefenziny jsou novou skupinou patřící mezi defenziny. Svou strukturou jsou podobné β -defenzinům, přesto se dostatečně fylogeneticky liší, aby mohly tvořit samostatnou skupinu. K jejich objevu došlo ve vajíčku kachny (Gong et al., 2010). Dnes je členy této skupiny 35 defenzinů objevených většinou v ptácích a u některých plazů (Whenham et al., 2015).

- Hmyzí defenziny

První defenziny byly identifikované z mouchy *Sarcophaga peregrina* a nezávisle na ni z larvy *Phormia terranova* (Matsuyama et al., 1988, Lambert et al., 1989). Hmyzí defenziny mají anti-G+ účinky a jsou součástí silné antimikrobiální obrany hmyzu. Struktura hmyzích defenzinů se liší od ostatních defenzinů. Například od savčích defenzinů se především liší přítomností struktury α helixu (Cociancich et al., 1993). Hmyzí defenziny jsou nejčastěji kladně nabitě molekuly, mají 6 cysteinů, které vytvářejí charakteristické disulfidické můstky (Capinera, 2008). Hmyzí defenziny se nachází v hemolymfě, tukovém tělísku nebo ve střevech imunizovaných organismů. Také dochází k jejich nálezu ve slinách a slinných žlázách hmyzu (Wei et al., 2015). Objevují se po styku s infekcí nebo po mechanickém poškození v hemolymfě (Cociancich et al., 1993). Obvykle mají od 36 do 51 AMK (Ezekowitz et al., 2003).

1.2.2. Mechanismus účinku defenzinů

Interakce defenzinu s buňkou je na základě elektrostatického a hydrofobního charakteru a nemá žádný vliv na sekundární strukturu defenzinu (Fujii et al., 1993). Antimikrobiální mechanismus je podobný jako u ostatních AMPs: dochází ke tvorbě pórů v membráně mikroorganismu pomocí tvorby kanálků. Mechanismus byl popsán u hmyzího defenzinu A, který působil na bakterii *M. luteus* (Cociancich et al., 1993). Bylo prokázáno, že defenziny spolupracují i s různými ionty, například draslíku. Defenzin způsobuje ztrátu K^+ na cytoplazmatické membráně, depolarizaci, snižuje tvorbu cytoplazmatické ATP, a tak inhibuje respiraci. Trans membránový potenciál se tudíž zmenšuje z -200 mV na -110mV, což je důležitá hodnota pro aktivaci defenzinu. Díky poklesu K^+ dochází k elektrostatické interakci mezi defenzinem a buňkou a následně k nahromadění molekul defenzinů, které se spojují na membráně buňky v dimery. Na druhou stranu v případě příliš vysoké koncentrace draslíku v okolí může dojít i ke snížení efektivity antimikrobiální aktivity (Ganz et al., 1995, Lichtenstein, 1991, Ganz, 2003). Antimikrobiální aktivita je detekovatelná při koncentraci defenzinu 0,1-10 $\mu\text{g/ml}$ (Kabelitz et al, 2005).

1.2.3. Syntéza defenzinů

Všechny skupiny defenzinů jsou syntetizovány jako preprodefenziny. Tento peptid je složen z typické signální sekvence na N terminálním konci, která je nutná pro transport do endoplazmatického retikula, následně z propiece a samotného peptidu. Díky posttranslačním úpravám je peptid uveden do aktivního stavu, ale aby nedošlo k poškození vlastních buněk je část propiece záporně nabitá a váže se tak na aktivní místo peptidu, čímž dochází k jeho neutralizaci (Michaelson et al., 1992, Ganz et al., 1995).

1.2.4. Záporně nabitě defenziny

Skupina záporně nabitých defenzinů je, co do množství, zanedbatelná ve srovnání s kladně nabitými defenziny. V poslední době bylo ovšem popsáno několik peptidů, které mají záporný náboj. Takovými defenziny jsou například 2 defensin-like peptidy z klišťete *Amblyomma hebraeum* (Lai et al., 2004), BmdefA z červa *Bombyx mori* (Wen et al., 2010) nebo spliDef z červa *Spodoptera littoralis* (Seufi et al., 2011). Z obojživelníků (*Urodele amphibians*) byl izolován záporně nabitý defenzin PopuDef (Wei et al., 2015). Několik záporně nabitých defenzinů bylo popsáno i u lidí, například peptid HE2C (von Horsten et al., 2004).

Mechanismus účinku kladně nabitých peptidů je zřejmý (viz 2.2). Kladný náboj defenzinů jim umožňuje snadno se navázat na záporně nabitě struktury bakteriální membrány. Těmito

molekulami jsou lipopolysacharidy G- bakterií, polysacharidy u G+ bakterií a fosfolipidy (Raj et al., 2002). V případě záporně nabitých molekul tudíž není zcela jasné, jak dochází k jejich interakci se záporně nabitými složkami bakterie. Doposud neexistuje studie, která by přesně vysvětlovala tento mechanismus. Nicméně existují různé teorie. Například Lai a kolegové předpokládají, že v případě záporně nabitého defenzinu u klíštěte *A. hebraeum* by mohlo dojít k navázání defenzinu v oblasti C terminálního konce, kde je náboj kladný i přesto, že celkový náboj defenzinu je záporný (Lai et al., 2004). Další teorii nabízejí Wu a Bahar (Wu et al., 2003, Bahar et al., 2013), kteří vysvětlují možný mechanismus interakce, například stimulací autolytických enzymů, narušením syntézy bakteriální DNA, nebo proteinů, integrováním s intracelulárními cíli, stejnými mechanismy jako u kladně nabitých defenzinů.

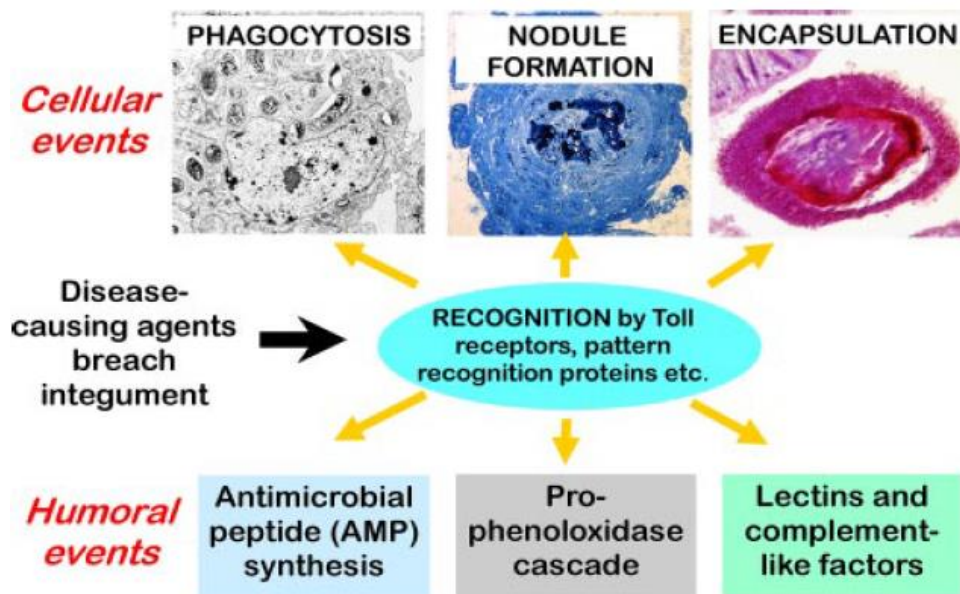
Výhodou záporně nabitých defenzinů se zdá být možnost navázání k záporně nabité molekule v případě vytváření uměle kladně nabité membrány v průběhu vzniku rezistenci některých bakterií k AMP (viz str. 6.).

Díky nedostačujícím informacím o záporně nabitých defenzinech je důležité, aby došlo k dalšímu zkoumání. Proto je každá informace velmi cenná. To se týká i nového defenzinu z *Ixodes ricinus*, který byl identifikován a částečně charakterizován v této práci. Kromě hlubšího porozumění defenzinům pomůže tento výzkum i k dalšímu scelení poznatků o imunitě klíšťat.

1.3. Imunita klíšťat

Klíšťata tvoří důležitou skupinu mezi organizmy, které přenáší nemoci. Po komárech jsou na druhém místě v přenosu nebezpečných mikroorganismů na člověka. Klíšťata jsou schopná přenosu patogenních bakterií, protozoí, virů a hub. Při sání může dojít k přenosu i smrtelných onemocnění člověka a zvířat (Jongejan et al., 2004). Navzdory této skutečnosti není příliš známo o imunitě klíšťat.

Imunitní systém klíšťat funguje na základě vrozené imunity a přirozených bariér. Složky imunity jsou humorální a celulární.



Obr. 4: Schématický obrázek imunitního systému bezobratlých (Rowley, 2007).

Efektorovou složku humorální imunity zahrnují antimikrobiální peptidy a antifungicidní peptidy (Beatty et al., 1996, Volf et al., 2007). Antimikrobiální peptidy se ve valné většině tvoří po napadení mikrobem či při zranění. U krevsajících klíšťat se AMPs vyskytují i volně ve střevě, protože dochází k vystavení velkému množství mikrobů z krve (Nakajima et al., 2002).

1.3.1. Defenziny klíšťat

V poslední době došlo k mnoha objevům defenzinů u těchto členovců. První známý defenzin byl popsán u klíštěte *Dermacentor variabilis* (Johns et al., 2001). Další známé defenziny jsou: defenziny A, B, C, D (*O. moubata*) (Nakajima et al., 2001), varisin (*D. variabilis*) (John et al., 2001), mircoplusin (*R. micropulus*) (Fogaca et al., 2004), Amblyomma defensin peptide 1 a 2 (*A. hebraeum*) (Lai et al., 2004), scapularisin (*I. scapularis*) (Hynes et al., 2005), def1 a def 2 (*I. ricinus*) (Rudenko et al., 2005; Rudenko et al., 2007), ixosin (*I. sinensis*) (Yu et al., 2006), Amercin (*A. americanum*) (Todd et al., 2007), Hlgut-defensin, Hlsal-defensin (*H. longicornis*) (Zhou et al., 2007), persulcatusin (*I. persulcatus*) (Saito et al., 2009), longicornsin (*H. longicornis*) (Lu et al., 2010), HIMS – defensin (*Haemaphysalis longicornis*) (Zheng et al., 2012), DefMT (*I. ricinus*) (Tonk et al., 2014), DS-defensin (*D. marginatus*) (Wang et al., 2015) a další.

Přesto, že je popsáno a charakterizováno mnoho defenzinů klíšťat, jen defenziny 1 a 2 z klíštěte *Amblyomma hebraeum* a Hlsal-defensin z *Haemaphysalis longicornis* jsou

záporně nabitě. Žadný záporně nabitý defenzin z klíštěte *Ixodes ricinus* doposud nebyl popsán.

1.4. Klinické využití AMPs

Vzrůstající počet výzkumů v oblasti nových antibiotik jasně naznačuje, že doposud známá antibiotika přestávají být dostačující, a je tedy nutné nalézt nové alternativy v boji proti rezistentním mikrobům. Výhodou antimikrobiálních peptidů je, že bakterie vyvíjejí rezistenci na antibiotika mnohem snadněji než na AMP. Například, několikaleté užívání AMPs, zejména tyrothricinu, nezpůsobuje rezistence na tento druh léčiv (Stauss-Grabo et al., 2014). Více než 100 nových defenzinů bylo zadáno do databáze AMPs během období 2000-2014. Roste tak počet nových potenciálních léčiv proti bakteriím (Wang et al., 2014).

Kromě antibakteriálních vlastností mají AMPs schopnosti být funkční i proti virům, protozoím a rakovinným buňkám (Hancock et al., 1996). Další jejich výhodou je, že posilují přirozenou imunitu a antiendotoxický efekt. Tyto poznatky vnášejí naději do AMPs jako léčiv budoucnosti. V dnešní době se již několik AMPs používá v klinické praxi (Marr et al., 2006). Některé z nich:

- Polymyxin B – dokáže účinně hubit G- bakterie (Hancock et al., 1999)
- Polymyxin E – používá se proti G- tyčce *Pseudomonas aeruginosa* (Jensen et al., 1987)
- Gramicidin S – proti G+ bakteriím a proti plísni *Candida albicans* (Kondejewski et al., 1996, Hancock et al., 1999)
- Daptomycin – patří mezi záporně nabitě lipoproteiny, účinný je proti G+ bakteriím včetně pneumokokových meningitid (Cottagnoud et al., 2004, Mar et al., 2006)
- Nisin – účinný proti *E. faecalis* (Yaduka et al., 2014).

Table 1 Anti-microbial peptides in clinical trials or in development			
Product	Description	Indication	Phase
Magainin peptide/ pexiganan acetate	22-amino-acid linear antimicrobial peptide, isolated from the skin of the African clawed frog (<i>Xenopus laevis</i>)	Diabetic foot ulcers	3
Omiganan	Synthetic cationic peptide derived from indolicidin	Rosacea	2
OP-145	Synthetic 24-mer peptide derived from LL-37 for binding to lipopolysaccharides or lipoteichoic acid	Chronic bacterial middle-ear infection	2
Novexatin	Cyclic cationic peptide, 1,093 daltons	Fungal infections of the toenail	1/2
Lytixar (LTX-109)	Synthetic, membrane-degrading peptide	Nasally colonized MRSA	1/2
NVB302	Class B lantibiotic	<i>C. difficile</i>	1
MU1140	Lantibiotic	Gram-positive bacteria (MRSA, <i>C. difficile</i>)	Preclinical
Arenicin	21 amino acids; rich in arginine and hydrophobic amino acids	Multiresistant Gram-positive bacteria	Preclinical
Avidocin and purocin	Modified R-type bacteriocins from <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Narrow spectrum antibiotic for human health and food safety	Preclinical
IMX924	Synthetic 5-amino-acid peptide innate defense regulator	Gram-negative and Gram-positive bacteria (improves survival and reduces tissue damage)	Preclinical

Obr. 5: Antimikrobiálními peptidy, které jsou v klinickém výzkumu (Fox, 2013).

Existují jisté nedostatky, které znesnadňují běžné použití AMPs v klinické praxi a těmi jsou vysoká cena tvorby AMPs, náchylnost na degradaci proteázami, snížená účinnost v přítomnosti solí v séru, atd. Dalším znesnadněním je neznámý dopad systematického užívání AMPs pro léčbu infekcí, není totiž jasné, jaké odpovědi mohou tyto AMPs v organismu vyvolat. V poslední řadě, AMPs jsou přirozeně využité v síti interakcí různých komponent imunitního systému. Nelze tedy očekávat, že AMPs budou samostatně fungovat jako u přirozené imunity (Scorpiacino et al., 2012). A proto se v dnešní době využívá úpravy AMPs pro získání výhodnějších vlastností. Dochází ke zvyšování stability peptidu vkládáním nepřirozených AMK, úpravě terciární struktury, multimerizaci peptidu apod. Může také docházet k modifikaci náboje, amfipacity nebo hydrofobicity (Ong et al., 2014). Genové inženýrství využívá přírodních předloh genů v tvorbě účinných léčiv. Pro jejich tvorbu jsou využívány různé expresní systémy. Například rekombinantní antimikrobiální peptid LL-37 je účinný při hojení poškození pokožky a je tvořen expresním adenovirovým systémem (Ramos et al., 2011). Dalším příkladem je tvorba lidského rekombinantního β -defenzinu v adenovirovém vektoru. Tento defenzin je účinný proti bakterii *Haemophilus influenza*, která způsobuje zánět středního ucha (Woo et al., 2014).

Dalším peptidem patřícím do této kategorie je cathelicidin, který se využívá pro léčbu zánětlivých onemocnění střev (Leake, 2015).

Novou a progresivní metodou, která se zabývá tvorbou léčiv na bázi AMP je takzvaná „*de novo*“ syntéza peptidů a vývoj syntetických molekul, které napodobují vlastnosti a aktivity AMPs. Tyto nově syntetizované peptidy se nazývají peptidomimetika. Například, vědecká skupina zabývající se mimetiky vedená D. Juretićem z univerzity Split v Chorvatsku využila možnosti vytvoření syntetického proteinu na základě databáze primárních a sekundárních struktur přírodních AMPs. Byly vybrány peptidy s antimikrobiální aktivitou a výhodnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. K vytvoření peptidu použily složité algoritmy a AMP designéry. Na základě výzkumu tato skupina vytvořila peptid bohatý na glycin, který dále podrobili testům antimikrobiální aktivity. Tento peptid byl nazván adaptin 1 (z „Automatically Designed Peptide ANTibiotic Number 1“) a je z méně než 50% podobný ostatním AMPs (Juretić et al., 2009). Další možnosti jsou uměle tvořené multimerické peptidy, které mají zesílené antimikrobiální schopnosti. Jedním z těchto peptidů je SB056, který vykazuje velmi silné antimikrobiální schopnosti proti G- bakteriím a omezené antimikrobiální schopnosti proti G+ bakteriím (Scorpiacino et al., 2012). Ještě jedním příkladem je výzkum vědců z Univerzity v Zürichu, kteří vytvořili antibiotika proti druhu *Pseudomonas* s novým způsobem účinku. Vyvinuli nový protein, u kterého využili faktu, že motivy v sekundární struktuře, jako jsou β -hairpiny a α -helixy, jsou obsaženy v rozpoznávajících proteinech (Obrecht et al., 2012). V podobném duchu se vedl i další výzkum, kde bylo vyvinuto epitopové mimetikum protegrin I, které je cílené proti *P. aeruginosa* na nano úrovni (Srinivas et al., 2010). β -hairpinové mimetikum POL7080 je v současné době v I. fázi klinického výzkumu a může se stát důležitým lékem pro léčbu chronického onemocnění plic způsobeného *P. aeruginosa* u cystické fibrózy (Scorpiacino et al., 2012).

Současné výzkumy se zabývají také kombinací AMPs a nanočástic. Například nanočástice chitosan v kombinaci s antimikrobiálním peptidem dermaseptinem tvoří účinnou látkou proti tumorovým buňkám (Medeiros, 2014).

Dalším novým využitím AMPs je jejich aplikace v boji proti biofilmu, který zabraňuje ničit mikroby ať už antibiotiky nebo přirozeně imunitním systémem. V roce 2015 byla publikována práce Luca a spol., kde byla zveřejněna databáze AMPs účinných proti biofilmu s volným přístupem (BaAMPs), kde jsou ke každému peptidu uvedené informace vztahující se k AMP sekvenci, chemické modifikace, spojení s cílovými organismy, a také

experimentální metody použité při stanovení koncentrace peptidu a procento inhibice/redukce biofilmu. Tato data jsou důležitá pro výzkum proti tvorbě biofilmů a jsou dostupná na <http://www.baamps.it> (Funkční ke dni 12. 1. 2016) (Luca et al., 2015).

Dalším využitím AMPs je klinická diagnostika. Dnes používané metodiky PCR nebo imunometody jsou časově a finančně náročné, proto se tato nová metoda (biosenzory), schopná rychle detekovat několik patogenů *in situ*, zdá být velkým přínosem. Příkladem může být mikrofluidní čip pro multiplexní detekci bakteriálních buněk, který využívá specifické antimikrobiální peptidy. AMPs jsou imobilizovány na elektrických mikrosenzorech (čipech). K přenosu signálu při zachycení bakteriálního agens pomocí AMPs na čip dochází díky interakci cysteinu se zlatem. Takovým způsobem lze detekovat patogeny do 25 minut při minimálních koncentracích. Integrovaním vysoce specifického schématu zachycení bakteriálních buněk s rychlou elektrickou detekcí tato metoda ukazuje, že má velký potenciál jako diagnostická platforma příští generace (Lillehoj et al., 2014).

Kromě využití v medicíně je možnost tyto peptidy aplikovat například v potravinářství (při konzervaci potravin) (Blanco-Padilla et al., 2014), nebo v biobezpečnosti, například k úpravě vody (Cloete et al., 2010), či při dezinfekci povrchů (Siedenbiedel et al., 2012).

2. Cíle práce

1. Literární studie k problematice antimikrobiálních peptidů.
2. Optimalizace technik pro detekci a izolaci genu kódujícího nový defenzin v klíštěti (např. RNA/DNA purifikace, cDNA syntéza, PCR, elektroforéza, klonování, sekvenování).
3. Izolace genu kódujícího nový antimikrobiální peptid (defenzin), analýza genomové struktury genu, prokázání profilu exprese genu v různých tkáních a vývojových stádiích klíštěte.
4. Predikce antimikrobiálních vlastností získaného peptidu na základě *in silico* analýzy.
5. Interpretace výsledků a zkušeností se zvolenými metodami s konečným cílem identifikace a izolace genu pro nový defenzin.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Tab. II: Chemikálie a kity a použité v této práci.

Metoda	Materiál	Složení
Příprava klíčů	Roztoky na promývání	70% ethanol, 95% ethanol, 10% roztok chloru (Savo)
Izolace RNA	Kit	RNeasy® Protect Mini Kit (50) (Qiagen)
Syntéza cDNA	Kit	Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche)
Izolace genomové DNA	Kit	DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen)
Izolace plazmidové DNA	Kit	QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen)
PCR	2x PCR premix	Taq DNA polymeráza 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP, 3mM MgCl ₂ (Promega)
	2x PCR BIO ultra mix	PCRBIO Ultra DNA Polymerase, 6mM MgCl ₂ , 2mM dNTPs, enhancer, stabilizátor (PCR biosystems)
RACE PCR	Kit	5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche)
Gelová elektroforéza	Agarózový gel	1x TAE pufr, 0.9 až 2.5% agarosa (Serva)
	50x TAE pufr	200 mM Tris - HCl, 50 mM EDTA
	Marker	100 bp Gene Ruler (Promega), 1 kb Gene Ruler (Promega)
	6x DNA Loading dye	0.03 % bromophenol blue, 0.03 % xylene cyanol, FF, 0.4 % orange G, 15 % Ficoll™ 400, 10 mM Tris - HCl (pH 7.5) a 50 mM EDTA (pH 8.0) (MBI Fermentas)
Purifikace PCR produktu	Kit	NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Machere-Nagel)
	Kolonky	Ultrafree-DA Centrifugal Filter Unit (Millipore)
Klonování	LB agar	1,5% bacto-agar v LB médium, pH 7.0
	LB médium	1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl, pH 7.0
	Antibiotika	Amplicilin (konečná koncentrace 50μg/mL)
	S.O.C médium	2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glukóza
	Kit	TOPO® TA Cloning® Kit (Invitrogen)
	Kit	Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits (Invitrogen)
Expresse genu	1 mM IPTG	Isopropylthio- β-galaktosid

	Ni-NTA agaróza	Qiagen
Nativní purifikace rekombinantního proteinu	Lyzační pufr	10 mM imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8
	Promývací pufr	20 mM imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8
	Eluční pufr	250 mM imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8
	1x PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM NaH ₂ PO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , do 1 L ddH ₂ O, pH 7,4
	Vzorkový pufr	4x Laemmli Sample Buffer (BioRad)
	Redukční činidlo	355 mM β-mercaptoethanol
	Marker	Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder (Thermo scientific)
SDS – page elektroforéza	10x anodový pufr	1M Tris, 0,225M HCl pH 8,9
	10x katodový pufr	1M Tris, 1M Tricine, 1% SDS, pH 8,9
	Zaostřovací gel	40% Akrylamid/Bis-Akrylamid, 3 M Tris-HCl pH 8,45, 0,3% SDS, ddH ₂ O, TEMED (N, N', N', N'-Tetramethylethylenediamine), 10% Amonium persulfát
	Rozdělovací gel	40% Akrylamid/Bis-Akrylamid, 3 M Tris-HCl pH 8,45, 0,3% SDS, ddH ₂ O, TEMED (N, N', N', N'-Tetramethylethylenediamine), 10% Amonium persulfát
	Barvení gelu	PageBlue™ Protein Staining Solution (MBI Fermentas)
	Transferový pufr	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% methanol
	TBS pufr	10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5
Western blot	TBS-Tween pufr	20 mM Tris, 500mM NaCl, 0,05% Tween, pH 7,5
	3% BSA v TBS	3% BSA v pufru TBS
	HRP	9% NaCl v 1 M Tris-HCl, pH 8, 4-chloro-1-naphthol, 100% methanol, 30% hydrogen peroxid
RT PCR	Kit	Enhanced Avian HS RT-PCR Kit (Sigma)
Antimikrobiální pokus	LB agar	1,5% bacto-agar v LB médium, pH 7.0
	LB médium	1.0% tryptone, 0.5% yeast extract, 1.0% NaCl, pH 7.0

3.2. Metody

3.2.1. Klíšťata *Ixodes ricinus*

V experimentech byli použité nasáté a nenasáté larvy, nymfy, samice a samci klíšťat *I. ricinus* z experimentálního chovu na Parazitologickém ústavu AV ČR v Českých Budějovicích.

3.2.2. Příprava klíšťat

- Promývání klíšťat

Povrch klíšťat byl před dalším zpracováním dezinfikován. Postup promývání:

4 min	70% ethanol
4 min	10% roztok chloru (SAVO)
1 min	95% ethanol
2 min	vysušení na sterilním papíru

- Homogenizace klíšťat

Homogenizace klíšťat se prováděla za pomoci kovových kuliček na mechanickém homogenizátoru od firmy Qiagen.

Takto zpracovaná klíšťata byla po homogenizaci použita pro izolaci RNA a genomové DNA.

- Pitva klíšťat

Jednotlivé orgány - střeva, malpigické trubice, vaječníky, hemolymfa a slinné žlázy – byly pitvány z 50 samic klíšťat *I. ricinus*. Jednotlivé orgány byly sbírané do roztoku RNA Later a zmražené na -80°C do dalšího zpracování.

3.2.3. Izolace RNA

RNA z celých klíšťat a z jednotlivých orgánů byla izolována pomocí kitu RNeasy® Protect Mini Kit (50) (Qiagen) podle protokolu od výrobce. RNA byla eluovaná z kolon ddH₂O, koncentrace RNA byla změřena a RNA byla ihned použita k dalším účelům nebo uskladněna na -80 °C.

3.2.4. Syntéza cDNA

cDNA byla syntetizována pomocí kitu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) podle protokolu od výrobce.

3.2.5. Měření koncentrace

Koncentrace RNA a DNA byla měřena na přístroji NanoPhotometr při vlnové délce 260/280 nm.

3.2.6. Izolace plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla izolována pomocí kitu QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen), přesně podle protokolu od výrobce.

3.2.7. Izolace genomové DNA

Genomová DNA byla izolována z celých klíšťat kitem DNeasy[®] Blood & Tissue Kit, (Qiagen) podle protokolu od výrobce.

3.2.8. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro amplifikaci cílového genu byla aplikována metoda PCR, kde byla jednovláknová cDNA použita jako templát. Pro amplifikaci specifického úseku byly použity speciálně navržené primery. V PCR reakcích byla použita jak běžně využívaná Taq polymeráza (Promega) tak i PCRBIO Ultra polymeráza (PCR biosystems), která byla nutná pro získání vyšší specificity. PCR reakce proběhla v 0,2 ml mikrozkrumkách v přístroji Mastercycler personal (Eppendorf).

a) PCR reakce s Taq polymerázou (Promega)

- Reakční směs (totální objem reakce 20 µl):

2x PCR Master Mix (Promega)	10 µl
Primer reverse (1 mM)	1 µl
Primer forward (1 mM)	1 µl
Templát (DNA)	<250 ng
H ₂ O	odvozeno od množství DNA

- Podmínky amplifikační reakce:

Počáteční denaturace	5 min	96 °C	
Denaturace	30 s	95 °C	} Opakováno 30x – 35x
Nasedání primerů	30 s	podle primeru	
Elongace	30 s	72°C	
Konečná elongace	5 – 15 min	72 °C	

b) PCRBIO Ultra polymeráza (PCR biosystems) - použitá pro zvýšení citlivosti PCR reakcí v prvních experimentech při použití cDNA jako templátu

- Složení reakční směsi s PCRBIO Ultra polymerázou (totální objem reakce 25 µl) :

2x PCRBIO Ultra Mix	12, 5 µl
Primer reverse (1 mM)	1,25 µl
Primer forward (1 mM)	1,25 µl
Templát (DNA)	<100 ng
H ₂ O	odvozeno od množství DNA

- Podmínky amplifikační reakce:

Počáteční denaturace	2 min	95 °C	
Denaturace	15 s	98 °C	} Opakováno 40x
Nasedání primerů	10 s	podle primeru	
Elongace	30 s	72°C	
Konečná elongace	10 min	72 °C	

V případě PCRBIO Ultra Polymerázy teploty nasedání primerů byly vyšší než v případě Taq polymerázy (Promega) (u experimentů v této práci o 5 °C).

Tab. III: Přehled všech použitých PCR primerů.

Primer pro:	Sekvence	Teplota nasedání (°C)	Reference
<i>Actin</i>	F CGTCTGGATCGGCGGCTCTAT	55	Chrudimská et al. 2011
	R CGCGCACTCTTTTCCACAATCTC		
<i>Defensin</i>	F1 ATGTCGGCTTTGAGATTCTCGC	55	Tato práce
	R1 CATTCGTTTGCACATGCAAGTA AG		
<i>Defensin (mature peptid)</i>	F1M CACCATGAGAGTTCACGTTGAC CA	50	Tato práce
	R1M TCGTTTGCACATGCAAGTAGAA TGA		
<i>M13 plazmid</i>	M13F GTAAAACGACGGCCA	50	TOPO [®] TA Cloning [®] Kit (Invitrogen)
	M13R CAGGAAACAGCTATAC		
<i>T7 promotor</i>	T7F TAATACGACTCACTATAGGG	50	Champion [™] pET Directional TOPO [®] Expression Kits (Invitrogen)

Primery pro defenzin byly navrženy na základě známé sekvence defenzinu z GenBank (accession number JAC94130). Tato částečná sekvence byla objevena v Laboratoři imunologie vektorů (vedoucí RNDr. Kopáček, CSc.) v hemocytové knihovně klíštěte *I. ricinus*.

3.2.9. 3'RACE PCR

Pro ověření konce genu bylo využito metody 3'RACE PCR, která využívá poly-A konce a forward primeru pro příslušný gen. Reakce se prováděla pomocí kitu 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche) podle protokolu. Pro tuto reakci byla syntetizována cDNA se speciální kotvou na 3'konci podle protokolu z kitu. Byla využita senzitivnější PCRBIO Ultra Polymeráza.

- Složení reakční směsi (totální objem reakce 50 μ l)

10x reakční pufr	5 μ l
PCRBIO Ultra Polymeráza	0,5 μ l
dNTPs (10 mM)	1 μ l
Primer forward F1 (1 mM)	1 μ l
PCR anchor primer (1mM)	1 μ l
Templát (cDNA)	1 μ l *
ddH ₂ O	40,5 μ l

* cDNA byla syntetizována z 0.5 to 2 μ g RNA.

- Podmínky amplifikační reakce pro RACE PCR

Počáteční denaturace	5 min	96 °C	
Denaturace	30 s	95 °C	} Opakováno 35x
Nasedání primerů	30 s	60 °C	
Elongace	30 s	72°C	
Konečná elongace	5 – 15 min	72 °	

3.2.10. RT PCR

U všech sledovaných RNA byla měřená koncentrace a došlo k vyrovnání koncentrací na jednotnou hodnotu.

- Složení reakční směsi (na 50 μ l reakce):

10x PCR pufr	5 μ l
1x 25 mM MgCl ₂	3 μ l
dNTPs	1 μ l
RNase	1 μ l
RNA	20 ng/ μ l
eAMV-RT	1 μ l
primer F	1 μ l
primer R	1 μ l
JumpStart AccuTaq LA DNA polymerase	1 μ l
Voda	závislá na množství RNA

- Podmínky amplifikační reakce a zároveň syntézy cDNA

Syntéza sDNA	50 min	47°C	
Počáteční denaturace	2 min	94 °C	
Denaturace	15 sec	94 °C	} Opakováno v cyklech 35x
Nasedání primerů	30 sec	50 °C	
Elongace	1 min	68 °C	
Konečná elongace	5 min	68 °C	

3.2.11. Gelová elektroforéza

Amplifikovaný vzorek byl kontrolován pomocí elektroforézy v agarózovém gelu a 1x TAE pufru. Koncentrace agarózového gelu se odvíjela v závislosti na velikosti produktu (0,8% - 2,5%). Ke vzorkům byl přidán 6x koncentrovaný vzorkový pufr (loading dye) (Promega) s barvou SYBR GreenER™ (Invitrogen, USA). Pro porovnání velikostí byl přidán marker 100 bp nebo 1kb Gene Ruler (MBI Fermentas). Výsledky byly zaznamenány přístrojem MiniLumi (Dnr Bio Imaging Systems).

3.2.12. Purifikace PCR produktu z gelu

PCR produkty z více než 1% gelu byly purifikovány pomocí QIAquick® Gel Extraction kitu (Qiagen) a PCR produkty z méně než 1% gelu byly purifikovány pomocí kolon Ultrafree®-DA (Millipore). Purifikace probíhala přesně podle protokolů.

3.2.13. Klonování PCR produktu do vektoru a transformace kompetentních One Shot TOP10 *E. coli* buněk

Purifikovaný PCR produkt byl podle protokolu zaklonován do pCR® 4-TOPO vektoru. Reakce byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě. Z reakční směsi byly 2 µl přidány k *E. coli* One Shot® TOP10 kompetentním buňkám. Reakce byla inkubovaná 25 minut na ledu. Po inkubaci byly buňky přesunuty do vodní lázně na 42 °C po dobu 30 s a znovu byla reakce přemístěna na led. K buňkám bylo přidáno 250µl S.O.C. média. Reakce byla inkubovaná další hodinu při 37 °C v třepačce. Transformační reakce byla rovnoměrně rozetřena na LB agaru, který obsahoval amplicilin o koncentraci 50µg/ml. Petriho misky byly umístěny do inkubátoru na 37 °C a inkubace proběhla přes noc. Další den byly jednotlivé kolonie přeočkovány do 1,5 ml LB média s amplicilinem o koncentraci 50 µg/ml. Kolonie v mikrozkušavkách byly opět inkubovány přes noc při 37 °C v třepačce. Následující den došlo ke stočení kolonií v centrifuze při maximálních otáčkách po dobu 10 minut. Zbylé médium bylo odstraněno a buňky byly použity pro purifikaci plazmidové DNA.

3.2.14. Purifikace plazmidové DNA

Plazmidové DNA byla purifikována pomocí kitu QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen). Plazmidová DNA byla eluována 30 µL ddH₂O.

3.2.15. Screening rekombinantů pro přítomnost inzertu

Pro ověření přítomnosti genu zaklonovaného v plazmidu byla použita metoda PCR se specifickými primery a primery pro plazmid (M13 F/R). Plazmidy, v nichž došlo

k potvrzení přítomnosti inzertu, byly osekvenovány v sekvenační servisní laboratoři společnosti BIOGEN PRAHA s.r.o.

3.2.16. Analýza sekvence

Sekvence genu byla ověřena v GenBank a následně porovnána pomocí programu MegAlign (DNA Star) s defenziny z ostatních druhů klíšťat. Dále byla predikována sekundární struktura, 3D struktura, rozložení disulfidických můstků, signální sekvence a předpokládaný náboj molekuly pomocí volně dostupných programů online. Byla navržena i předběžná biologická funkce proteinu. Všechny programy byly funkční ke dni 10.12.2015.

Použité odkazy:

- Sekundární struktura - <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/image/?imageid=33573772>
- 3D modelace - <http://swissmodel.expasy.org>
- Disulfidické můstky - <http://disulfind.dsi.unifi.it/>
- Signální sekvence - <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
- Kalkulace náboje - <http://protcalc.sourceforge.net/cgi-bin/protcalc>
- Motiv peptidů - http://www.genome.jp/tools-bin/search_motif_lib
- Predikce biologické funkce - <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~mwass/comfunc/>

3.2.17. Klonování PCR produktů do expresního vektoru ChampionTM pET101/D-TOPO[®] a exprese rekombinantního proteinu

PCR metodou byl získán gen bez signální sekvence z plazmidu, který obsahoval tížený inzert. PCR produkt byl purifikován a klonován do expresního vektoru ChampionTM pET101/D-TOPO[®] (Invitrogen) podle protokolu od výrobce. Po následné transformaci kompetentních buněk *E. coli* One Shot TOP10 byl proveden screening na přítomnost inzertu. Byla použita metoda PCR. Sekvenováním plazmidu obsahujícího správný inzert s T7 promotor primerem byl ověřen správný čtecí rámeček. V případě přítomnosti inzertu ve správném směru byly kompetentní buňky BL21 start (DE3) One Shot[®] transformovány rekombinantním expresním plazmidem. Postupy byly následovány podle protokolu.

Transformované buňky BL21 StarTM (DE3) One Shot[®] byly přeočkovány do 10 ml LB média, které obsahovalo amplicilin (50 µg/ml). Vzorky byly přes noc inkubovány v třepačce na 37 °C. Další den došlo k přesazení 500 µl buněk do 10 ml nového LB média se stejným obsahem amplicilinu jako v předešlém kroku a takto přesazené buňky byly

třepány v 37 °C po dobu 2 hodin. Narostlé buňky byly rozdělené do dvou zkumavek po 5 ml. Do jedné ze zkumavek byl přidán IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside - cílová koncentrace 1mM) pro indukci exprese rekombinantního proteinu. Ještě před přidáním IPTG do reakce, byl odebrán nultý (neindukovaný) vzorek. Zkumavky byly vráceny do třepačky. Každou hodinu po dobu 6 hodin byl odebírán vzorek z každé zkumavky. Odebrané vzorky byly stočeny a zbytek LB média byl odebrán. Buňky byly rozpuštěny ve 150 µl 1x PBS a sonikované pomocí sonikátoru (Bandelin Sonoplus). Sonikované vzorky byly stočeny po dobu 20 minut na maximálních otáčkách v centrifuze na 4 °C. Supernatant byl odebrán a uschován na -20 °C.

3.2.18. Western blot

Vzorky z pilotní exprese rekombinantního proteinu byly rozděleny pomocí SDS-page elektroforézy. Proteiny byly přeneseny na PVDF membránu (Millipore), která byla zaktivována 100% methanolem a následně promyta ve vodě a transferovém pufru. Přenos z gelu na membránu se uskutečnil v přístroji Idea Scientific Company (USA). Přenos trval 1,5 hodiny při 10 V. Po přenosu došlo k promývání membrány 2x po 10 minut v pufru TBS. Membrána po promývání byla blokována 1 hodinu v TBS pufru s 3%BSA a znovu 3x promyta po dobu 10 minut v pufru TBS-Tween. Promytá membrána byla následně hybridizována 1 hodinu v TBS-Tween pufru, který obsahoval Ni-NTA konjugát. Membrána byla znovu promyta 3x po 10 minutách v pufru TBS-Tween. Pro zviditelnění signálu na membráně byla použita HRP (horse raddish peroxidase, křenová peroxidáza).

3.2.19. Purifikace rekombinantního proteinu při nativních podmínkách

Transformované buňky BL21 Star™ (DE3) One Shot® byly přeočkovány do 10 ml LB média, které obsahovalo amplicilin (50 µg/ml). Vzorky byly přes noc inkubovány v třepačce na 37 °C. Následně došlo k přesazení 1 ml buněk rostoucích přes noc do 50 ml LB média s amplicilinem (50 µg/ml). Buňky rostly 2 hodinu v třepačce na 37 °C, po této době byl přidán IPTG (1 mM) a kultura byla inkubována další 4 hodiny. Následně došlo ke stočení buněk a pelet byl rozpuštěn v 5 ml lyzačního pufru. Do směsi byl přidán lysozym (1 mg/ml). Reakce byla inkubována na ledu 30 minut. Následovala sonikace 6x po 10 s při 20 kHz. Buňky byly stočeny a supernatant byl přenesen na kolonku s 1 ml Ni-NTA agarózy, která byla předem promyta dd H₂O a ekvilibrována lyzačním pufrům (30 min při 4°C). Ni-NTA agaróza s buněčným lyzátem byla inkubována při 4 °C přes noc na rotátoru. Před nanášením na kolonu ze supernatantu byl odebrán 1. vzorek pro další analýzu. Další den následovala purifikace rekombinantního peptidu. Kolonka byla promyta

(5x po 2 ml) promývacím pufrem a cílový protein byl eluován z kolonky elučním pufrem (5x po 0,5 ml). Všechny frakce byly uschovány pro další analýzu.

Pro vylepšení podmínek purifikace došlo k odebrání imidazolu z lyzačního pufru a ke snížení imidazolu v promývacím pufru.

3.2.20. Analýza vzorků pomocí SDS – page elektroforézy

14 μ l supernatantu bylo smícháno s 5 μ l vzorkového pufru a 1 μ l redukčního činidla. Vzorky byly denaturovány 10 minut na 99 °C a poté ihned zchlazeny na ledu. Vzorek byl nanesen na polyakrylamidový gel, který obsahoval zaostřovací gel (4%) a rozdělovací gel (16%). Elektroforéza probíhala v přístroji Hoefer SE 250 při 30 V na zaostřovacím gelu a následně při 150 V na rozřazovacím gelu v katodovém a anódovém pufru. Po skončení elektroforézy byl gel promyt 3x vodou po dobu 10 minut a následně byl přes noc barven v roztoku PageBlueTM (MBI Fermentas). Po promytí vodou (3x po 20 min) byl gel vyfocen na bílém světle.

3.2.21. Antimikrobiální aktivita rekombinantního proteinu - pilotní pokus

Transformované buňky BL21 StarTM (DE3) One Shot[®] byly přeočkovány do 10 ml LB média, které obsahovalo ampicilin (50 μ g/ml). Vzorky byly přes noc inkubovány v třepačce na 37 °C. Další den došlo k přesazení celého objemu buněk do 500 ml nového LB média se stejnou koncentrací ampicilinu jako v předešlém kroku a takto přesazené buňky byly třepány v 37 °C po dobu 2 hodin. K LB médiu byl přidán IPTG (1mM) a buňky byly vráceny do 37°C do třepačky na 4 hodiny. Po uplynutí inkubačního času došlo ke stočení buněk. Buňky byly následně rozpuštěny v 5 ml lyzačního pufru. Do směsi byl přidán lysozym (1 mg/ml). Reakce byla inkubována na ledu 30 minut. Následovala sonikace 6x po 10 s při 20 kHz. Buňky byly stočeny a supernatant byl přenesen na Ultrafree-CL microcentrifuge filters (MWCO 30 000 Da) pro odstranění proteinů vyšší molekulové hmotnosti. Supernatant byl stáčen 3 hodiny při 5 000 x g.

K analýze antimikrobiální aktivity rekombinantního proteinu byly použity kultury bakterií *Escherichia coli* (G-), *Chryseobacterium meningosepticum* (G-), *Enterococcus faecalis* (G+) a *Staphylococcus aureus* (G+). Tyto bakterie byly ze zmražené kultury kličkou odebrány do čerstvého LB média. Následně byly bakterie naočkovány na Petriho misky s LB agarem a byly inkubovány přes noc ve 37 °C. Buňky byly další den přeočkovány na nový LB agar a po uschnutí kultury byl aplikován hrubý buněčný lyzát AnIrDef peptidu po indukci. Hrubý buněčný lyzát byl rozdělen na frakce před filtrací a po filtraci přes

kolonu s 30 kDa cut-off membránou (Ultrafree-CL microcentrifuge filters (MWCO 30 000 Da)). Frakce byly rozděleny na dvě poloviny, jedna byla přefiltrována přes 0,22 μm filtr pro odstranění nečistot (sterilaci) a jedna bez přefiltrování. Obě frakce byly naneseny ve dvojím opakování po 1 μl a 5 μl . Jako pozitivní kontrola byl použit ampicilin (50 $\mu\text{g/ml}$) a jako negativní kontrola lyzační pufr, ve kterém se peptid vyskytoval. Takto připravené kultury byly inkubovány 8 hodin ve 37 °C. Koncentrace proteinu byla měřena pomocí spektrofotometru.

4. Výsledky

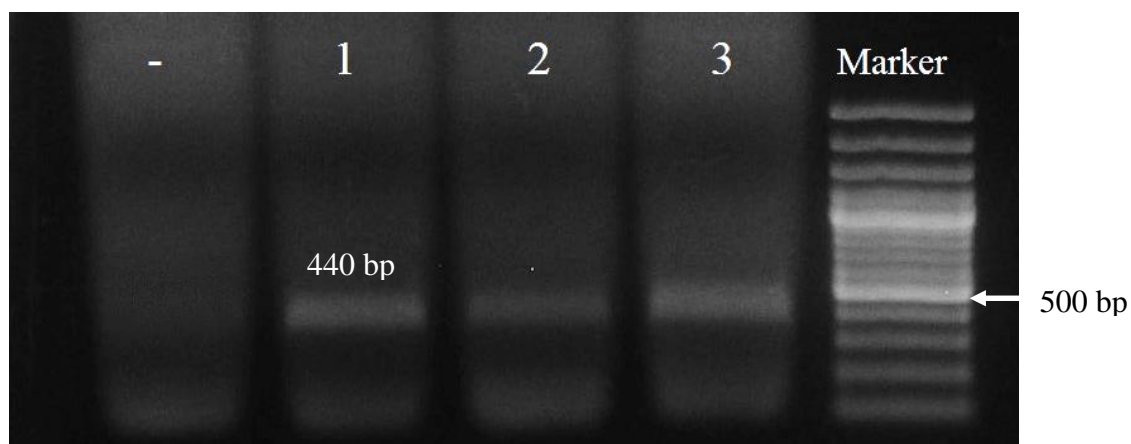
4.1. Izolace RNA, DNA a syntéza cDNA

RNA byla izolována z maximálně 30 mg tkáně, popřípadě jednotlivých stádií klíšťat. Na izolaci DNA byla použita vždy jedna nasátá samice, 5 nenasátých samic nebo samců a 30 nymf. Koncentrace izolované RNA a DNA z jednotlivých orgánů klíštěte a z celého klíštěte jsou zaznamenány v tabulce IV.

Tab. IV: Koncentrace vzorků.

Vzorek	DNA (µg/mL)	RNA (µg/mL)
Larvy nenasáté	-	33
Larvy nasáté	-	194
Nymfy nenasáté	-	57
Nymfy nasáté	428	582
Samice nenasátá	62	96
Samice nasátá	139	232
Samec	45	10
Slinné žlázy	-	20
Vaječníky	-	62
Střeva	-	31
Malpigické trubice	-	25
Hemolymfa - nasátá ♀	-	22
Slinné žlázy – nasátá ♀	-	159
Vaječníky – nasátá ♀	-	397
Střeva – nasátá ♀	-	150
Malpigické trubice – nasátá ♀	-	136

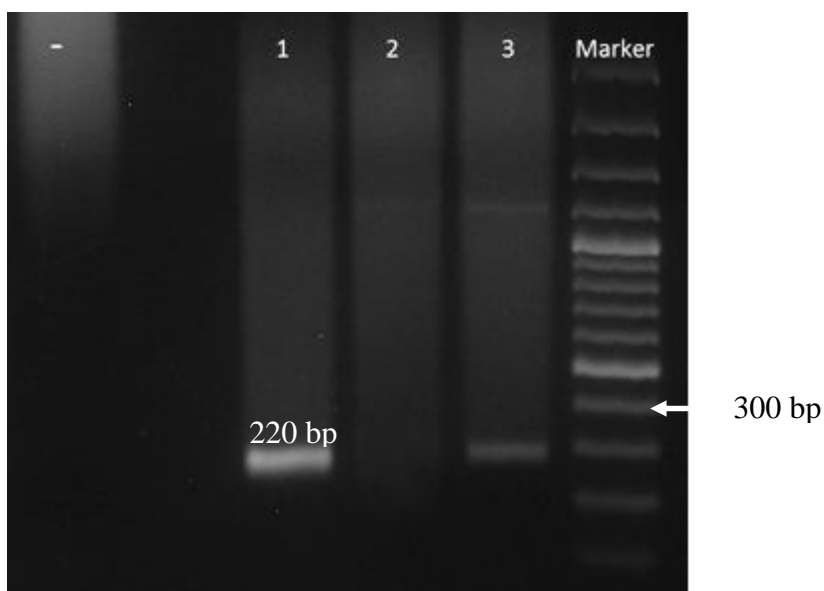
Z RNA nasátých nymf, nasátých samic a nenasátých samic byla syntetizována cDNA. Kvalita cDNA byla zkontrolována metodou PCR za použití primerů pro aktin klíštěte. Výsledky byly analyzovány na 1% agarózovém gelu. Získaný PCR produkt (440 bp) odpovídal správné velikosti fragmentu genu pro aktinu.



Obr. 6: Kontrola kvality cDNA pomocí aktinových primerů (- negativní kotrola, 1 – nasátá nymfa, 2 – nenasátá samice, 3 – nasátá samice, marker 100 bp).

4.2. Izolace fragmentu defenzinu

Metodou PCR, za použití specifických primerů, byl získán fragment kódující gen AnIrDef peptid. Primery byly navrženy podle sekvence, která byla objevena z knihovny transkriptomů vytvořené z nasátých samic *Ixodes ricinus* (GenBank: JAC94130.1). PCR produkty získané amplifikací za použití Taq polymerázy od Promega nebyly dostatečně viditelné, proto byla použita senzitivnější PCRBIO Ultra Polymeráza.



Obr. 7: Amplifikovaný fragment genu o velikosti 220 bp (- negativní kontrola, 1 – nasáté nymfy, 2 – nenasátá samice, 3 – nasátá samice, marker 100 bp).

PCR produkt byl purifikován z gelu a odeslán na sekvenační analýzu. Sekvenační reakce byla připravena přesně podle předpisů ze sekvenační laboratoře (koncentrace PCR produktu 80 - 100 ng/μl a primeru 5 μM). Sekvenování bylo provedeno z obou konců (primery F1 a R1) pro větší přesnost.

Získaná sekvence byla zaslána do GenBank:

ATGTCGGCTTTGAGATTCTCGCTTCTTCTCGTCCTTCTTGCAGCAGTTTCGGTG
GCATCGGGAAGAGTTCACGTTGACCATAATGAAGGTCCACCTACATATGGCT
GCCCCTTCAACGACATTCCGTGCCAGAACCACTGTCAGGAAGATGGCTACTT
GTACGGGGAATGCACAGATGCCCTTCATTCTACTTGCATGTGCAAACGATG.

Výsledky porovnání získané sekvence se sekvencí uvedenou v GenBank jsou uvedeny na obrázku 8.

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	316 bits(171)	2e-91	200/214(93%)	2/214(0%)	Plus/P
Query 1	ATGTCGGCTTTGAGATTCTCGCTTCTTCTCGTCCTTCTTGCAGCAGTTTCGGTGGCATCG	60			
Sbjct 1	ATGTCGGCTTTGAGATTCTCGCTTCTTCTCGTCCTTCTTGCAGCAGTTTCGGTGGCATCG	60			
Query 61	GGAAGAGTTCACGTTGACCATAATGAAGGTCCACCTACATATGCCGCCCCTTCAACGAC	120			
Sbjct 61	GGAAGAGTTCACGTTGACCATAATGAAGGTCCACCTACATATGCCGCCCCTTCAACGAC	120			
Query 121	ATTCGGTGCCAGAACCACTGTCAGGAAATGGCTACTTGTACGGGAAATGCACAGATGCC	180			
Sbjct 121	ATTCGGTGCCAGAACCACTGTCAGGAAATGGCTACTTGTACGGGAAATGCACAGATGCC	180			
Query 181	CTTCATTCTACTTGCATGTGCAAACGAATGATT	212			
Sbjct 181	CTTCATTCTACTTGCATGTGCAAACGAATGATT	214			

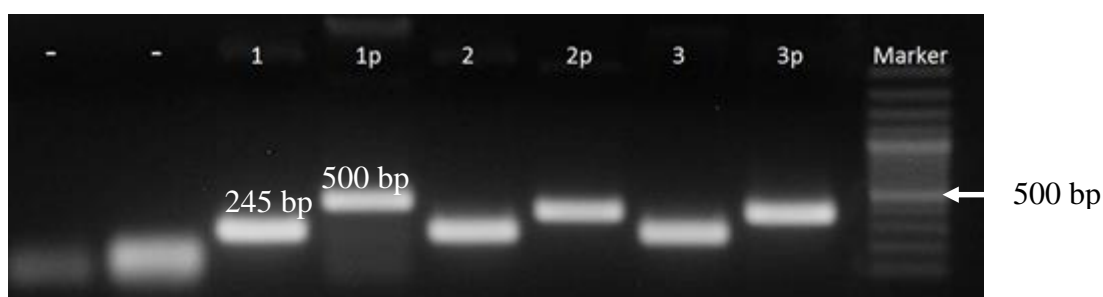
Obr. 8: Porovnání získané sekvence se sekvencí z GenBank (putative defensin [*Ixodes ricinus*], accession number JAC94130).

4.3. 3'RACE PCR

Celá sekvence genu byla získána pomocí RACE PCR za použití PCR-BIO Ultra polymerázy. Po úspěšném zaklonování RACE PCR produktu do PCR-4-TOPO vektoru a sekvenování rekombinantů byla přečtena celá sekvence genu až do poly-A konce.



Obr. 9: Amplifikovaný gen kódující AnIrDef za použití primeru F1 a reverse primeru pro polyA konec (Marker 100 bp, - negativní kontrola, 1 – nymfy, 2 – nasátá samice).



Obr. 10: „Screening“ rekombinantů na přítomnost inzertů pomocí gen specifických primerů a M13 primerů na plazmidu (- negativní kontrola, 1 - 3 gen specifické primery F1/R1, 1p - 3p M13 F/R primery na plazmidu, marker 100 bp).

Sekvence celého genu:

```
ATGTCGGCTTTGAGATTCTCGCTTCTTCTCGTCCTTCTTGCAGCAGTTTCGGTG
GCATCGGGAAGAGTTCACGTTGACCATAATGAAGGTCCACCTACATATGGCT
GCCCTTCAACGACATTCCGTGCCAGAACCCTGTCAGGAAGATGGCTACTT
GTACGGGGAATGCACAGATGCCCTTCATTCTACTTGCATGTGCAAACGATG3'
```

UTR:

```
*atTTtagcaaaagcaacgatagttgtcgttctataaataaacatctagctgagttgctaataaacatgtgaaacaagggaaa
```

Celá sekvence genu byla opět porovnána se sekvencí získanou z GenBank.


```

92.1% identity in 63 residues overlap; Score: 319.0; Gap frequency: 0.0%
UserSeq1      1 MSALRFSLLLVLLAAVSVASGRVHVDHNEGPPTYGCPFNDIPCQNHCQEDGYLYGECTDA
UserSeq2      1 MSALRFSLLLFLLVAVSVASGRVHVDHNEGPPAYGCPFNDMPCQNHCQEDGYLYGECTDA
***** ** *****
UserSeq1      61 LHS
UserSeq2      61 LLS
* *

```

Obr. 13: Porovnání AMK sekvence v programu ExPASy (horní sekvence je AnIrDef, dolní je původní z GenBank (JAC94130)).

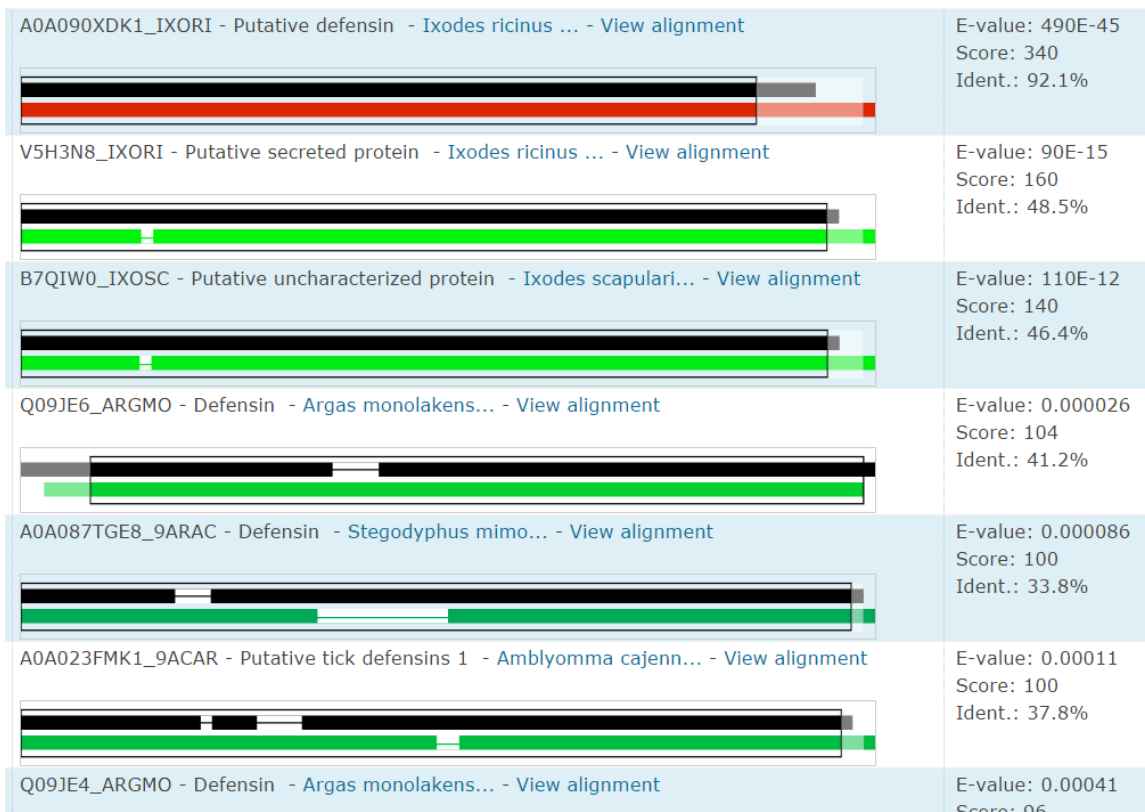
4.4. *In silico* charakterizace proteinu

Celý protein (včetně signální sekvence) má 68 AMK, molekulová váha je 7556,6 daltonů, pI 5,64, náboj -3,3.

- AMK sekvence nového defenzinu byla porovnaná se sekvencemi v různých databázích. Nejvyšší shody (46%) ukázal hypotetický protein z klíštěte *I. scapularis* a defenziny z různých organismů, včetně klíšťat.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
hypothetical protein IscW_ISCW023545 [Ixodes scapularis]	55.5	55.5	98%	3e-08	46%
Defensin [Argas monolakensis]	43.5	43.5	89%	8e-04	41%
Defensin [Stegodyphus mimosarum]	42.7	42.7	86%	0.001	37%
defensin 2 [Haemaphysalis longicornis]	41.2	41.2	98%	0.006	32%
RecName: Full=Defensin; AltName: Full=Varisin A1; Flags: Precursor	40.4	40.4	94%	0.010	33%
Defensin [Argas monolakensis]	40.4	40.4	92%	0.010	39%
antimicrobial peptide [Haemaphysalis longicornis]	40.4	40.4	98%	0.012	31%
arthropod defensin [Actinomyces sp. oral taxon 171]	40.0	40.0	57%	0.014	41%
Defensin [Stegodyphus mimosarum]	39.7	39.7	91%	0.019	32%
hypothetical protein H101_03483 [Trichophyton interdigitale H6]	39.7	39.7	50%	0.021	44%
secreted salivary gland peptide, putative [Ixodes scapularis]	38.5	38.5	98%	0.043	30%
scapularisin preproprotein, putative [Ixodes scapularis]	38.9	38.9	98%	0.044	30%
putative secreted salivary gland peptide [Ixodes scapularis]	38.5	38.5	98%	0.052	30%
persulcatusin [Ixodes persulcatus]	38.5	38.5	98%	0.053	30%
micasin precursor [Arthroderma otae]	38.1	38.1	50%	0.060	44%

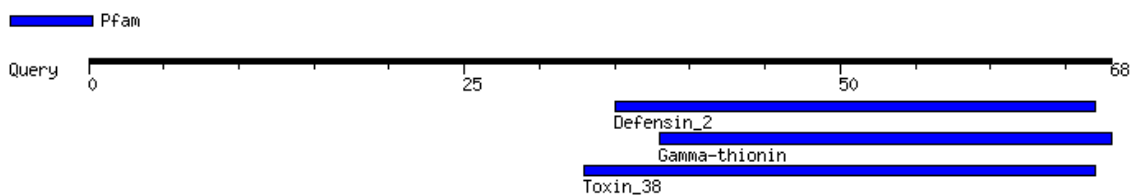
Obr. 14: Porovnání AMK sekvence s databází NCBI.



Obr. 15: Porovnání AMK sekvence v databázi UniProt.

- Motiv peptidu

In silico analýza AnIrDef peptidu ukázala přítomnost motivu charakteristického pro defenziny.



Pfam (3 motifs)

Pfam	Position(Independent E-value)	Description
Defensin_2	35..67(3.2e-05) Detail	PF01097, Arthropod defensin
Gamma-thionin	38..68(0.0017) Detail	PF00304, Gamma-thionin family
Toxin_38	33..67(0.0061) Detail	PF14866, Potassium channel toxin

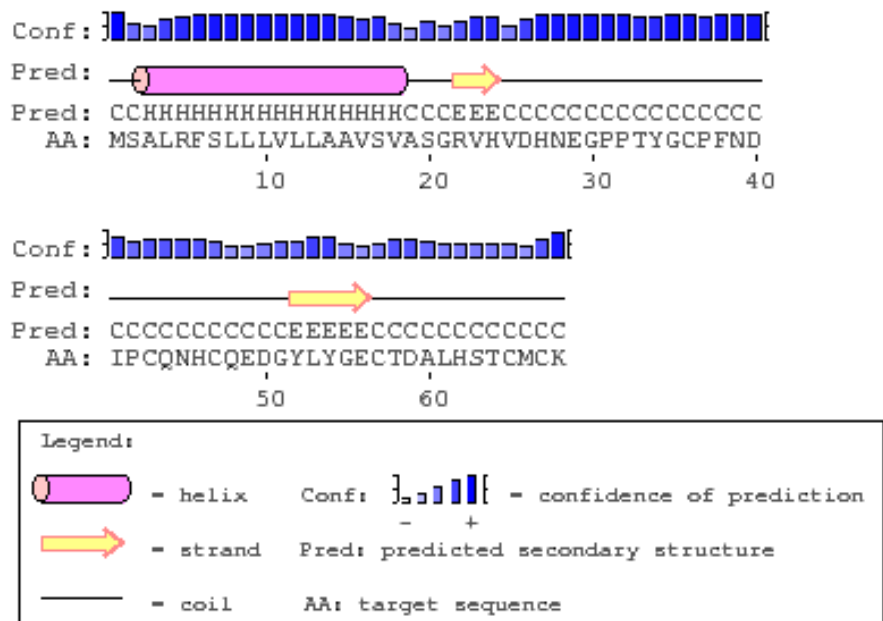
Obr. 16: Identifikace motivu charakteristického pro defenziny u AnIrDef peptidu (http://www.genome.jp/tools-bin/search_motif_lib).

Nově získanému peptidu byl přidělen pracovní název AnIrDef (**an**ionic **I***xodes* **r***icinus* **def**enzin). Motiv AnIrDef: C-(6)-C-(3)-C-(9)-C-(7)-C-(1)-C je typický pro hmyzí

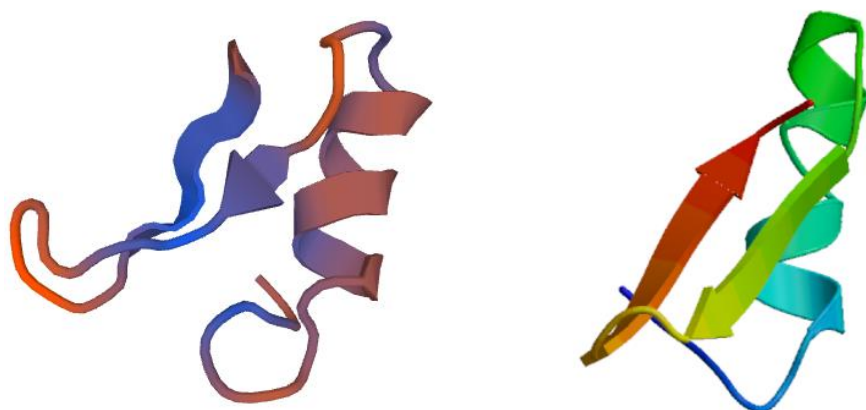
defenziny, který je: C-X (5-16) – C-X (3) - C-X (9-10) – C-X (4-7) – C-X (1)- C (Seufi et al., 2011).

- Struktura defenzinu

Pro modelaci struktury nového defenzinu byly využity volně dostupné programy na internetu, které pracují na základě nejvyšší shody v jejich databázích.



Obr. 17: Predikce sekundární struktury AnIrDef (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk>).



Obr. 18: Predikce 3D struktury (vlevo - AnIrDef, vpravo pro porovnání jiný defenzin členovců) (<http://swissmodel.expasy.org>).

Pro defenziny jsou typické 3 disulfidické můstky ve struktuře peptidu. AnIrDef má ve své struktuře typický počet můstků se specifickým spojením cysteinů C1-C4, C2-C5 a C3-C6.

```

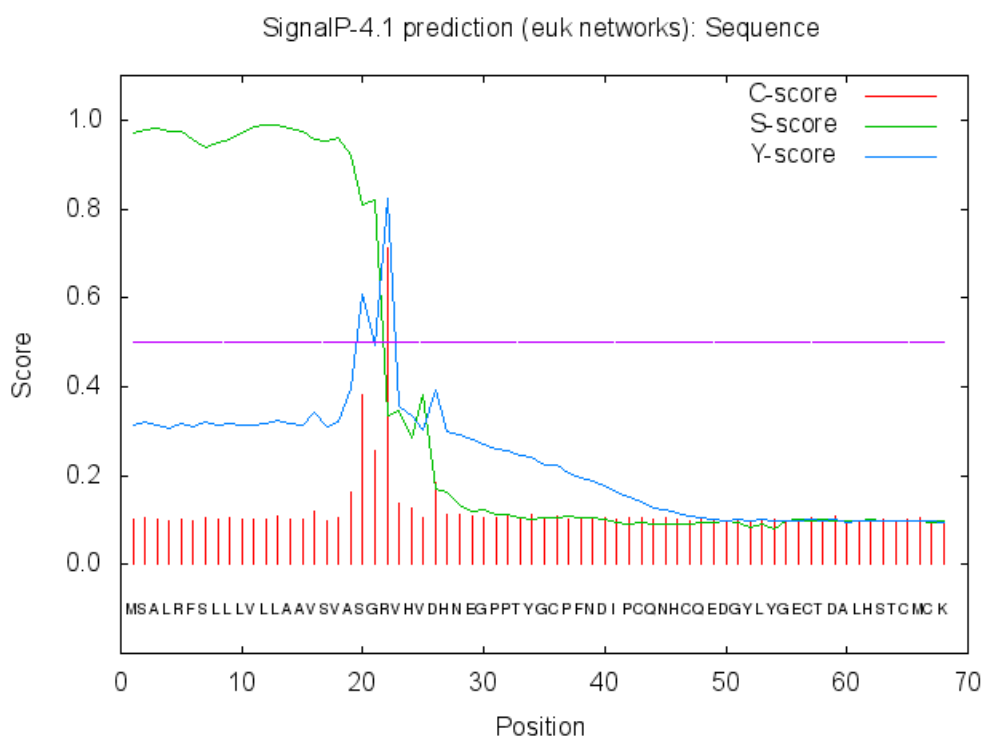
................................................................10.....20.....30.....40.....50.....60.....
AA      MSALRFSLLLVLAAVSVASGRVHVDHNEGPPTYGCPFNDIPCQNHQCQEDGYLYGECTDALHSTCMCK
DB_state      1      1      1      1      1 1
DB_conf       7      8      8      8      7 7

DB_bond  bond(36,57)
DB_bond  bond(43,65)
DB_bond  bond(47,67)

Conn_conf 0.659006

```

Obr. 19: Predikce disulfidických můstků (<http://disulfind.dsi.unifi.it/>).



Obr. 20: Predikce přítomnosti signální sekvence

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

Zjištění signální sekvence je důležité vzhledem ke klonování genu do expresního vektoru bez signální sekvence. Signální sekvence AnIrDef se odštěpuje mezi 21 a 22 AMK.

Bylo zjištěno, že náboj AnIrDef i po odštěpení signální sekvence zůstává záporný. Tento defenzin je tak třetím popsaným záporným defenzinem u klíšťat. První záporně nabitý defenzin byl popsaný u klíštěte *A. hebraeum* a druhý u *H. longicornis*. AnIrDef je prvním popsaným záporně nabitým defenzinem z klíštěte *I. ricinus*.

Estimated charge at pH 7.00 = -3.3

ed residues. For a folded protein this is **not** valid. However,

Estimated charge over pH range

pH	Charge
4.00	5.1
4.50	3.1
5.00	1.3
5.50	0.1
6.00	-0.8
6.50	-2.0
7.00	-3.3
7.50	-4.4
8.00	-5.9
8.50	-7.8
9.00	-9.8
9.50	-11.4
10.00	-12.8

Obr: 21: Kalkulace náboje peptidu (<http://protcalc.sourceforge.net/cgi-bin/protcalc>).

Predikcí biologické funkce došlo k utvrzení, že peptid by mohl mít antimikrobiální vlastnosti.

Biological Process Predictions

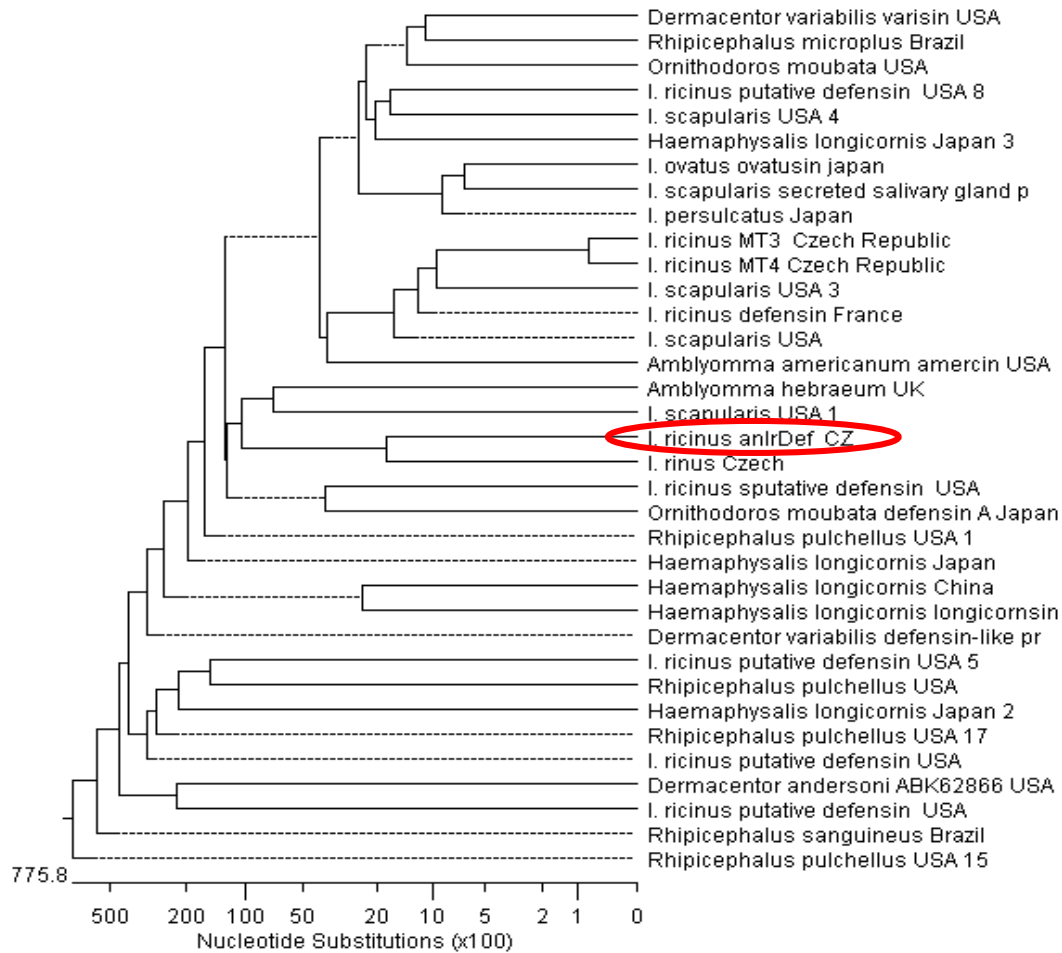
GO Term	Description	Number	SVM Probability
GO:0050829	GO defenserESPonsetoGram-negativebacterium	10	0.391
GO:0050830	GO defenserESPonsetoGram-positivebacterium	10	0.391

Obr. 22: Predikce biologické funkce (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~mwass/combfunc/>).

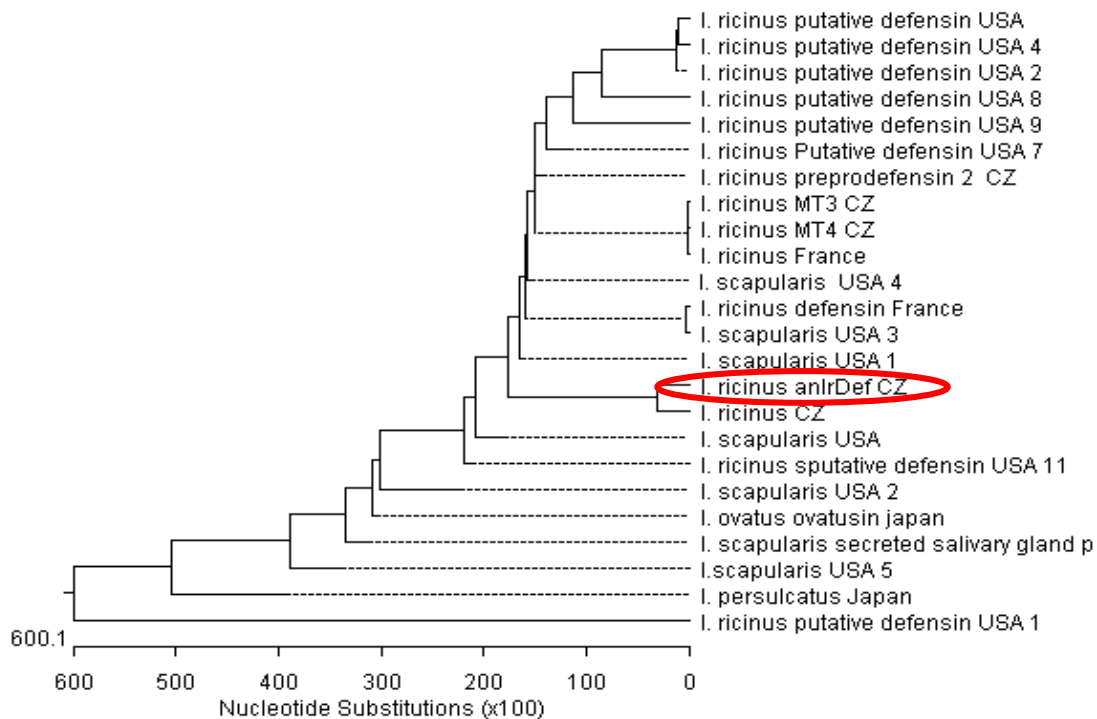
Pomocí databáze antimikrobiálních peptidů (The antimicrobial peptide database, <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) byla sekvence AnIrDef srovnána se sekvencemi antimikrobiálních peptidů v databázi.

Podle databáze antimikrobiálních peptidů vykazuje AnIrDef největší homologii s antimikrobiálním peptidem defenzinem z klíštěte *O. moubata*, dále pak se záporně nabitým defezinem z klíštěte *A. hebraeum* a defenzinem (mytilinem) ze slávky jedlé *Mytilus edulis*. Všechny výše uvedené antimikrobiální peptidy mají předpokládanou aktivitu proti G+, nebo G- bakteriím, nebo i k oběma najednou.

Prediktivní fylogenetické zařazení AnIrDef mezi ostatní klíšťata a mezi klíšťata rodu *Ixodes* ukázalo, že nově popsany defenzin je mezi všemi klíšťaty nejbliže k defenzinu z klíštěte *A. hebraeum* a *O. moubata*. Při srovnání s jinými druhy klíšťat rodu *Ixodes* vykazoval nejvyšší shody s defenzinem *I. scapularis* USA.



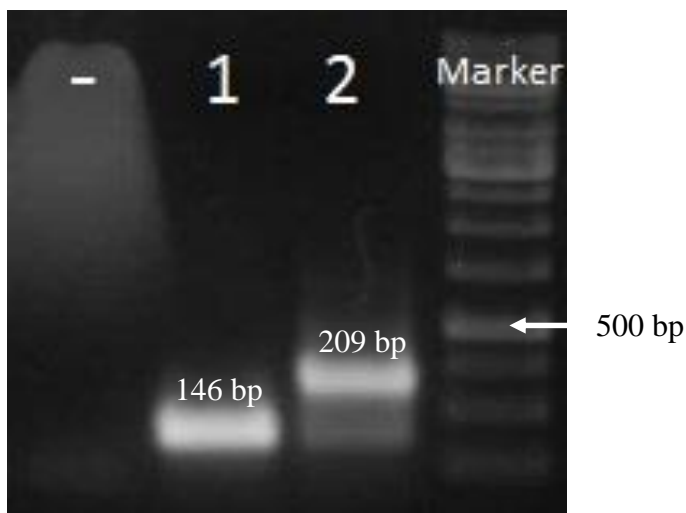
Obr. 23: Fylogenetické zařazení AnIrDef mezi defenziny různých rodů klíšťat.



Obr. 24: Zařazení AnlrDef mezi defenziny klíšťat rodu *Ixodes*.

4.5. Produkce rekombinantního proteinu

Pro klonování do expresního vektoru byly navrženy nové primery. Primer forward byl navržen na oblast za signální sekvencí a primer reverse na konec sekvence, která byla získaná pomocí RACE PCR.



Obr. 25: Amplifikovaný fragment genu bez signální sekvence a se signální sekvencí (- negativní kontrola, 1 – zralý peptid (bez signální sekvence), 2 – celý gen, marker 100 bp).

Jako templát byl pro PCR použitý plazmid, který obsahoval tížený inzert. PCR produkty byly purifikovány z gelu a zaklonovány do expresního vektoru pET101/D-TOPO®. Rekombinanty byly následně kontrolovány pro přítomnost inzertu a plazmid byl odeslán na sekvenční analýzu s T7 primery. Sekvence potvrdila přítomnost inzertu ve správném čtecím rámci. Sekvence fúzního proteinu (včetně části plazmidu nutné pro expresi proteinu – označena *):

AGAGTTCACGTTGACCATAATGAAGGTCCACCTACATATGGCTGCCCCTTCAA
CGACATTCCGTGCCAGAACCACTGTCAGGAAGATGGCTACTTGTACGGGGAA
TGCACAGATGCCCTTCATTCTACTTGCATGTGCAAACGA *aagggcgagctca

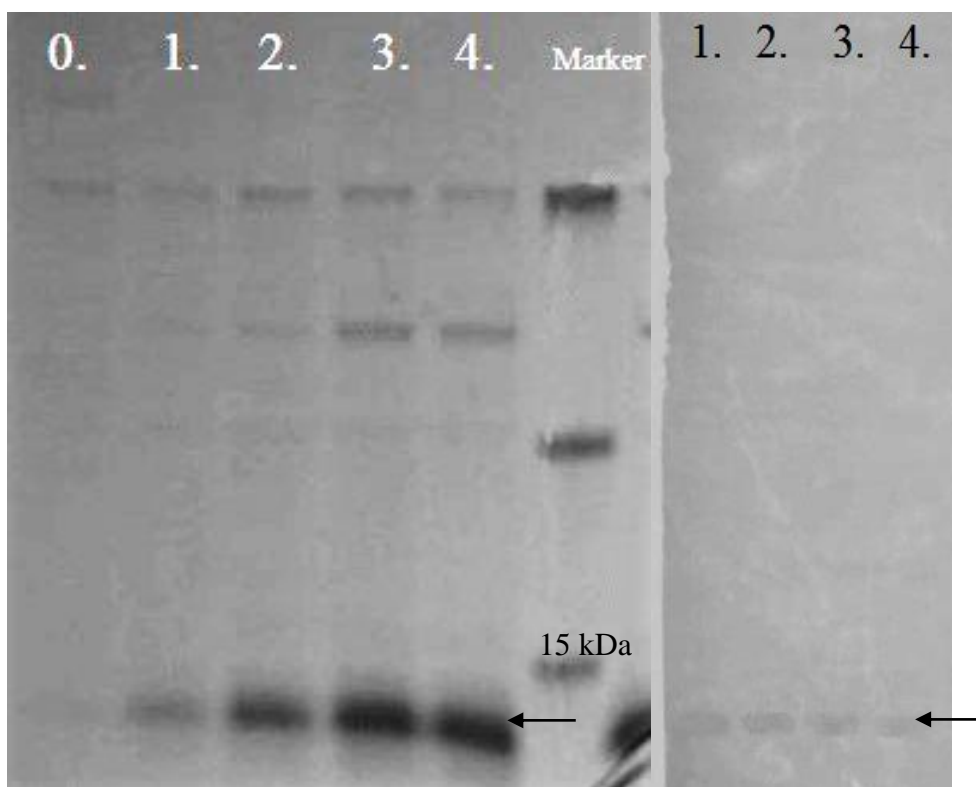
agcttgaagtaagcctatccctaaccctctcctcggtctcgattctacgcgtaccggctcatcatcaccatcaccattga.

Aminokyselinová sekvence proteinu:

R V H V D H N E G P P T Y G C P F N D I P C Q N H C Q E D G Y L Y G E C T D A
L H S T C M C K R * k g e l k l e g k p i p n p l l g l d s t r t g h h h h h Stop.

Fúzní protein má molekulovou váhu 8,795 kDa.

Expres rekombinantního proteinu byla docílena transformací expresních buněk *E. coli* BL21 star. Následoval pilotní pokus pro ověření exprese proteinu. Znázornění exprese cílového fúzního proteinů pomocí SDS-page elektroforézy je představeno na obr. 26.

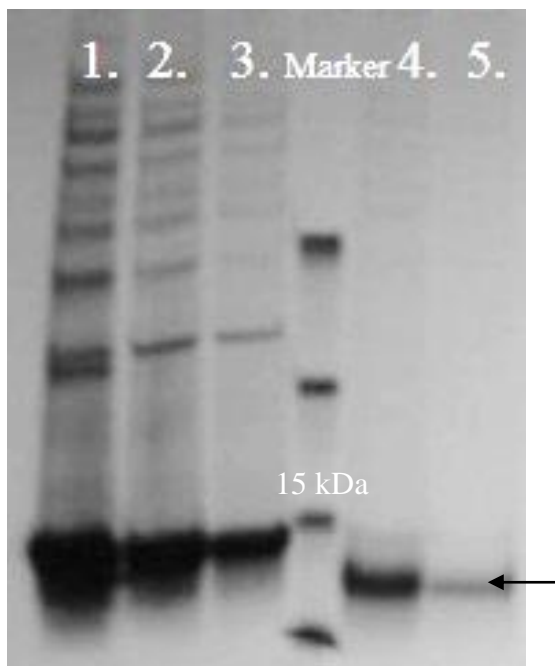


Obr. 26: Časový harmonogram exprese rekombinantního proteinu a PVDF membrána s přítomnými proteiny z časové exprese rekombinantního proteinu (1. hodina, 2. hodina, 3. hodiny, 4. hodina).

Třetí hodina ukazuje největší narůst exprese.

Přítomnost rekombinantního proteinu byla potvrzena pomocí anti-His protilátek přenosem proteinů z SDS-gelu na obr. 26 na membránu PVDF membránu díky metodě Western blot.

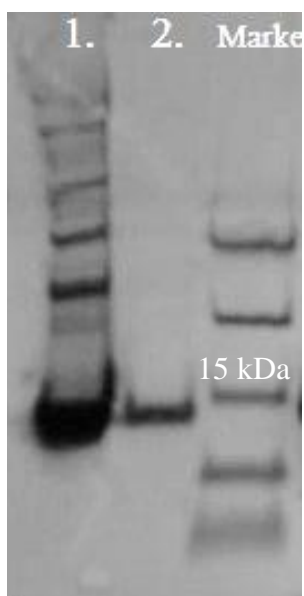
Po prokázání přítomnosti rekombinantního AnIrDef peptidu došlo k nativní purifikaci proteinu za předepsaných podmínek v protokolu Ni-NTA Spin Kit Handbook. V tomto případě protein na Ni-NTA agarózu nebyl navázán. Proto byly změněny purifikační podmínky. Z lyzačního pufu byl k odstraněn imidazol úplně a v případě promývacího pufu bylo sníženo množství imidazolu na 10 mM.



Obr. 27: Nativní purifikace proteinu (1 – lyzát, 2 – vzorek proteklý kolonou, 3 – promývací pufr proteklý kolonou, 4 – 5 – eluce).

4.6. Antimikrobiální aktivita rekombinantního proteinu - pilotní pokus

Pro odstranění nepotřebných proteinů v buněčném lyzátu byl přefiltrován supernatant přes filtr Ultrafree-CL microcentrifuge filters (MWCO 30 000 Da).



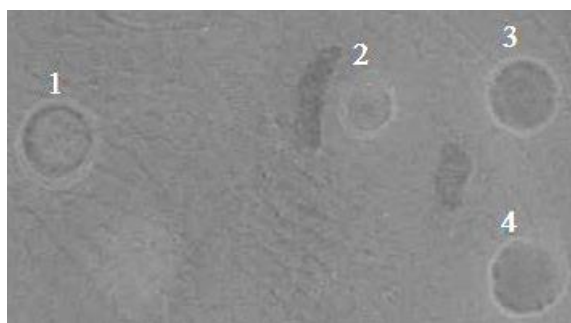
Obr. 28: Rozdělení směsi proteinů přes filtr (1 – frakce před filtrací, 2 – přefiltrovaná frakce).

Kultury *Escherichia coli*, *Chrysobacterium meningosepticum*, *Enterococcus faecalis* a *Staphylococcus aureus* byly nanášeny na LB agar s ampicilinem a bez ampicilinu. Všechny bakterie rostly pouze na LB agaru bez ampicilinu. Po přesazení buněk na nový LB agar byl použit pro kontrolu antimikrobiálních vlastností AnIrDef hrubý lyzát, vzorek před filtrací a po filtraci. Byly vybrány tyto frakce pro nejvyšší koncentrace proteinu.

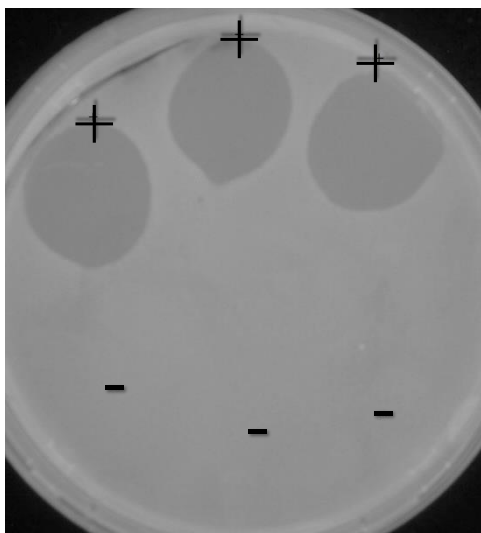
Pomocí spektrometru byla změřena orientační koncentrace proteinu jednotlivých frakcí.

Tab. V: Koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích.

Vzorek	Koncentrace ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Hrubý lyzát	40,8
Frakce proteinů větších než 30 kDa	36,3
Frakce proteinů menších než 30 kDa	2,206



Obr. 29: Příklad Petriho misky s buňkami *Staphylococcus aureus* a s nanesenými frakcemi (1 – hrubý lyzát (5 μl – sterilní), 2 – hrubý lyzát (1 μl – nesterilní), 3 – hrubý lyzát (5 μl – nesterilní), 4 – frakce proteinů větší než 30 kDa (5 μl – nesterilní)).



Obr. 30: Příklad Petriho misek s buňkami *Staphylococcus aureus* s pozitivní kontrolou (+) a negativní kontrolou (-).

Tab VI: Přehled výsledků z antimikrobiálního pokusu.

Vzorek	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Ch. meningosepticum</i>
Hrubý lyzát	-	+	-	+
Frakce prot. větších než 30 kDa	-	+	-	-
Frakce prot. menších než 30 kDa	-	-	+	+

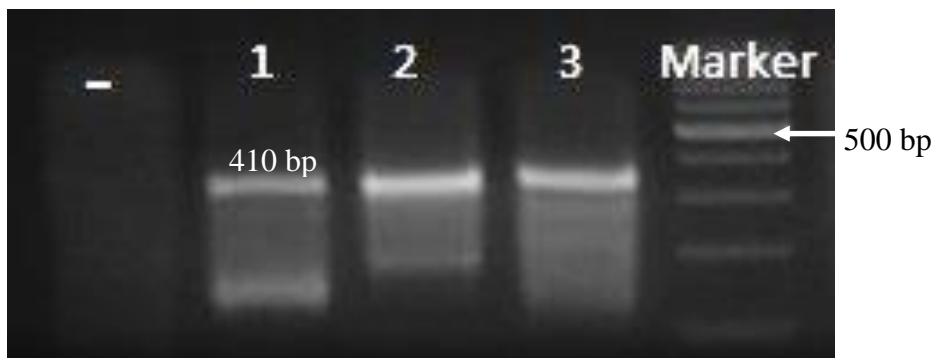
Pilotní analýza antimikrobiálního potenciálu rekombinantního proteinu AnIrDef zřetelně prokázala omezení růstu bakterií *Enterococcus faecalis* (G+), *Staphylococcus aureus* (G+) a *Chryseobacterium meningosepticum* (G-). Tyto bakterie byly vybrány jako zástupci představitelů gram pozitivních a gram negativních bakterií.

4.7. Exprese genu kódujícího AnIrDef v různých tkáních a vývojových stádiích

I. ricinus

Pro analýzu exprese AnIrDef v různých tkáních a vývojových stádiích *I. ricinus* byla použita RNA (koncentrace 20 ng/μl) vyizolovaná ze slinných žláz, hemolymfy, vaječnicků, střev, malpigických trubic nasátých a nenasátých samic a také z celých nasátých a nenasátých samic, samců, nasátých a nenasátých nymf a larev.

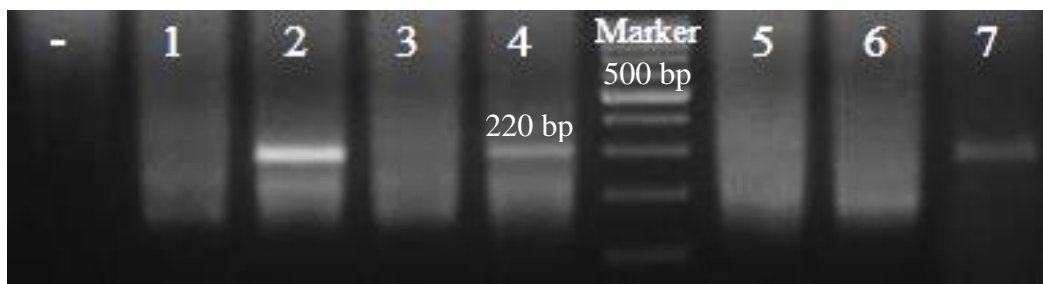
Pro kontrolu byla provedena reakce s aktinovými primery klíštěte. Kontrola byla provedena u všech stádií klíštěte a všech tkání.



Obr. 31: Potvrzení přítomnosti aktinu v cDNA z jednotlivých stádií klíštěte - negativní kontrola, 1 – nymfa, 2 – nenasátá samice, 3 – nasátá samice).

- Exprese genu kódujícího AnIrDef v jednotlivých stádiích *I. ricinus* a tkáních nasáté a nenasáté samice

Ke zjištění exprese genu byly využity primery F1/R1M na celý gen defenzinu.



Obr. 32: Exprese genu v jednotlivých stádiích *I. ricinus* (- negativní kontrola, 1 – nenasáté larvy, 2 – polonasáté nymfy, 3 – nenasáté samice, 4 – nasátá samice 5 – samci, 6 – nenasáté nymfy, 7 – nasáté larvy).

Tkáně nasáté a nenasáté samice byly analyzovány stejným způsobem. Exprese genu byla zkoumána ve vaječnících, slinných žlázách, střevech a malpigických trubicích. Výsledky exprese genu v tkáni viz tab. VII.

Tab. VII: Expresse genu a aktinu v tkáních a stádiích klíštěte.

Vzorek	Actin	AnIrDef
Larvy nenasáté	+	-
Larvy nasáté	+	+
Nymfy nenasáté	+	-
Nymfy nasáté	+	+
Samice nenasátá	+	-
Samice nasátá	+	+
Samec	+	-
Slinné žlázy	+	-
Vaječníky	+	-
Střeva	+	-
Malpigické trubice	+	-
Hemolymfa - nasátá ♀	+	+
Slinné žlázy – nasátá ♀	+	+
Vaječníky – nasátá ♀	+	+
Střeva – nasátá ♀	+	-
Malpigické trubice – nasátá ♀	+	+

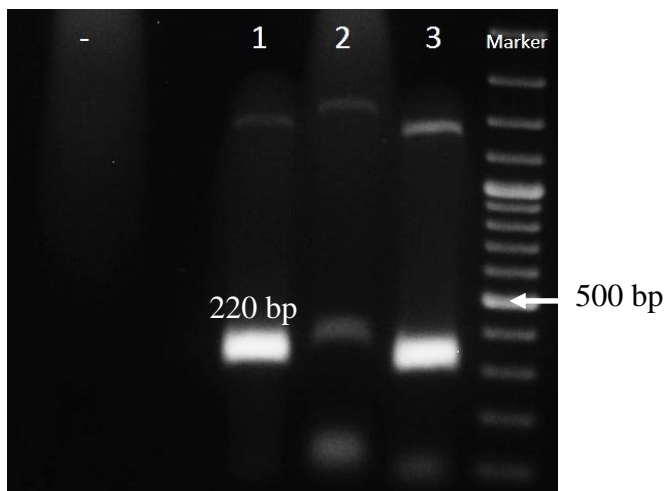
Analýza ukázala, že k expresi genu dochází výrazně u nasátých klíšťat v porovnání s nenasátými klíšťaty a stádium klíštěte nehraje roli. Nejvýraznější exprese byla zaregistrována v případě nasátých nymf. V případě tkání nenasáté samice nebyla exprese genu prokázána u žádné tkáně. Ve tkáních nasáté samice se AnIrDef exprimuje v hemolymfě, slinných žlázách, malpigických trubicích a vaječnicích stejnou měrou.

4.8. Analýza genomové struktury genu kódujícího AnIrDef

Genomová struktura genu kódujícího AnIrDef byla zkoumána na přítomnost případných intronů. Pro tento účel byla izolována genomové DNA ze samců, samic a nymf. Ani u jednoho ze stádií nedošlo k prokázání přítomností intronů v genomové sekvenci.

První experiment byl proveden za běžně používané annealingové teploty (50 °C). U všech stádií vždy vznikl PCR produkt jedné velikosti. PCR produkt byl osekvenován a sekvence

se shodovala se sekvencí získanou z cDNA. Pro tyto účely použita PCRBIO Ultra polymeráza.



Obr. 33: Amplifikovaný fragment genu o velikosti 220 bp (- negativní kontrola, 1 – nasaté nymfy, 2 – nenasaté samice, 3 – nasaté samice) z genomové DNA.

U druhého experimentu došlo ke snížení annealingové teploty. Došlo k amplifikaci různých nespecifických produktů. Přítomnost intronů v genomové sekvenci AnIrDef nebyla prokázána.

5. Diskuze

Klíšťata se během sání krve setkávají se značným množstvím patogenů, které se v krvi vyskytují. Efektivní imunitní systém klíšťat zabraňuje patogenům proniknout přes bariéry do jejich těla. Jednou z účinných a rychlých odpovědí imunitního systému klíšťat je produkce antimikrobiálních peptidů působících proti infekcím a traumatům. AMPs mají schopnost působit na různé patogeny díky své vysoké variabilitě.

S rostoucím problémem rezistence patogenů na antibiotika se nabízí možnost využít klíšťata jako zdroj pro vytvoření nových účinných antimikrobiálních terapeutik. Obecně jsou klíšťata *I. ricinus* schopná přežít infekce, které jsou jinak pro člověka život ohrožující. Navíc tyto infekce nezpůsobují klíšťatům žádná omezení. Konkrétně v případě Lymeské boreliózy (LB), hemocyty klíštěte eliminují většinu spirochét pomocí fagocytózy v hemocelu ještě před tím, než patogen dorazí do slinných žláz. Je patrný rozdíl mezi reakcemi imunity klíštěte na určité patogeny. Reakce imunity klíštěte na virus TBEV (Tick-borne encephalitis virus) není žádná, na rozdíl od reakce na spirochéty způsobující LB, na které je odpověď silná. Různorodost reakcí plyne z evoluce a to nejspíš proto, že klíště je se spirochétami obeznámeno podstatně delší dobu než s virem TBEV.

AMPs bezobratlých byly studovány velmi intenzivně již několik dekad. Výzkumy AMPs přinesly odpovědi na to, proč jsou klíšťata tolik úspěšným vektorem mnoha nebezpečných patogenů, zatímco samotná klíšťata si s těmito patogeny snadno umějí poradit. Doposud bylo popsáno mnoho AMPs klíšťat. Bylo také prokázáno, že tyto AMPs jsou především aktivní proti G+ bakteriím. Jisté druhy defenzinů již byly identifikovány v klíštěti *I. ricinus* (např. Rudenko et al., 2007, Chrudimská et al., 2011, Tonk et al., 2014).

Antimikrobiální aktivita defenzinů je obecně zaměřena na membrány bakterií, přes to, že mechanismus není zcela známý. U kladně nabitých defenzinů dochází k interakci s negativně nabitými částicemi mikrobiálních membrán, např. s lipopolysacharidy G- bakterií, s polysacharidy G+ bakterií a s fosfolipidy (Raj et al., 2002). Tudiž se díky náboji a zápornému pI zdá být nepravděpodobné, že AnIrDef je přitahován záporně nabitými částicemi bakteriální membrány. Nicméně, poslední studie Romenstada a kol. (2003) vysvětluje, že v defenzinu z mušle existuje funkčně výrazná smyčka. Tato smyčka je charakteristická přítomností jak pozitivně nabitých tak hydrofobních AMK a má funkční význam při navazování defenzinu mušle na bakteriální membrány. Později po popsání a charakterizování prvního záporně nabitého defenzinu klíšťat Lai a kol. (2004) provedli

sekvenční porovnání v rodinách defenzinů bezobratlých a přišli k závěru, že přítomnost pozitivně nabitě a hydrofobní smyčky, jako v případě defenzinu mušle, je konzervativní vlastnost všech defenzinů. Tudíž, v případě záporně nabitého defenzinu, včetně právě v této studii charakterizovaného AnIrDef, se pravděpodobně může vázat k bakteriální membráně přes pozitivní a hydrofobní smyčku blízko C terminálního konce, dokonce přes to, že celkový náboj je negativní. Jiná možnost je, že AnIrDef působí antibakteriálně přes alternativní mechanismy jako je stimulace autolytických enzymů, narušení syntézy bakteriální DNA, nebo proteinů, interagování s intracelulárními cíli (viz 1.2.4 Záporně nabitě defenziny).

Von Horsten a kol. v roce 2004 popsali atypický záporně nabitý defensin-like peptid z primátů a navrhli, že defenziny jsou schopné fungovat jako lektiny, a tudíž se jsou schopné spíše vázat na bakteriální povrch než bezprostředně lyzovat membrány buňky. To znamená, že funkce těchto peptidů je možná více komplexní a může zahrnovat i jiné úkoly než jen imunitní obranu proti patogenům.

V současné době jsou známy způsoby, jakými se patogeny dokáží účinně bránit proti ataku kladně nabitých AMPs. Mikroby často využívají právě náboje k jejich obraně. Proto došlo k vývoji záporně nabitých AMPs, které jsou schopné být účinné i proti jinak imunním mikrobům (Guilhelmelli et al. 2013). Tudíž je předmětné blíže prozkoumat mechanismus působení záporně nabitých AMPs, a to i právě popsaného AnIrDef. Nález teprve třetího záporně nabitého defenzinu klíšťat je nejen přínosem pro pochopení komplexity rozmanité rodiny antimikrobiálních proteinů bezobratlých, ale je také pokrokem v porozumění antimikrobiálních mechanismů.

Výsledky ukázaly, že k expresi AnIrDef dochází vždy u nasátých klíšťat a stádium klíštěte nehraje roli. Regulace exprese defenzinu jako odpovědi na sání krve byla poprvé pozorována u krevsajícího hmyzu *Stomoxys calcitrans* (pomocí Northern-blot analýzy) (Lehane et al., 1997), následně v klíštěti *Ornithodoros moubata* (pomocí reverzní transkripce PCR) (Nakajima et al., 2001, 2002) a později i v *Ixodes ricinus* (Rudenko et al., 2005). Běžně se ovšem věřilo, že genová exprese v těchto druzích je indukována až po septickém zranění nebo infekci (Raj and Dentino, 2002). Nicméně v roce 2004 Lai a kol. dokázali, že ke zvýšení exprese dvou genů kódujících defenziny v klíštěti *Amblyomma* dochází již během sání klíštěte na myších. Prokázali, že koncentrace defenzinu rostla v průběhu sání klíštěte. Regulační cesty při sání klíštěte jsou zapojené také v případě genové exprese peptidu AnIrDef, ačkoli tyto cesty prozatím nejsou známy. Tento fenomén

může být vysvětlen faktem, že klíšťata jsou při sání ohrožena značným množstvím bakterií, a tudíž musí dojít k účinné obraně proti tomuto riziku (Cociancich et al., 1993). Nebo se může jednat o funkce defenzinů, které doposud nebyly brány v potaz, jako je trávení krve. Bylo prokázáno, že defenziny klíšťat se exprimují v různých tkáních. Diskutovalo se, že exprese AMPs v těle vektoru odráží jistou funkční vlastnost v antimikrobiálních peptidech bezobratlých (Brossard et al., 2004). Hmyzí defenziny jsou syntetizovány predominantně v tukovém tělisku (ekvivalent jater) a jsou sekretovány do hemolymfy (Dimarcq et al., 1998). Nicméně, také krevsající komáři a mouchy mají silnou expresi defenzinů ve střevech (Lehane et al., 1997). Některé defenziny klíšťat byly detekovány s větší expresí ve střevech (Nakajima et al., 2002), v hemocytech (Fogaca et al., 2004), ve slinných žlázách a v jiných orgánech důležitých pro krmení a patogenní přenos (Valenzuela et al., 2002). V naší studii bylo prokázáno, že AnIrDef vykazuje nejvyšší expresi u nasátých stádií klíštěte, následně v hemolymfě odebrané z nasátých samic, ve slinných žlázách, malpigických trubicích a vaječnicích z nasaté samice. Tyto výsledky ukazují, že AnIrDef se tvoří v klíštěti během sání, kdy je pravděpodobné, že se klíště setká s infekčním materiálem, ale nemusí být produkován jen jako reakce na setkání se klíštěte s infekčním materiálem.

In silico analýza funkčních aktivit AnIrDef potvrdila, že peptid by mohl mít antimikrobiální vlastnosti, a to jak proti gram negativním tak i gram pozitivním bakteriím, i dříve popsané AMPs jsou aktivní proti gram negativním, gram pozitivním bakteriím a houbám. Je faktem, že defenziny některých klíšťat jsou schopné účinně likvidovat i spirochéty *B. burgdorferi*. Ve studii Johnse a spol. (2000) došlo k pozorování, že hemolymfa s boreliemi infikovaného klíštěte *D. variabilis* bez obsahu buněk silně inhibuje spirochéty *B. burgdorferi* (72%), obzvláště v přítomnosti kuřecího lysozymu. V průběhu vyzorovali indukcí nového peptidu o MW 5,3 kDa, identifikovaného později jako defenzin, stejně tak došlo ke zvýšení exprese „lysozyme-like“ peptidů. Nicméně, bez purifikace antimikrobiálních peptidů z hemolymfy nebylo možné vysvětlit jak defenziny nebo lysozymy ničí LB spirochéty. Lysozym z kuřat není proti boreliím účinný sám o sobě, ale jen v kombinaci s defenzinem z klíštěte dokáže účinně ničit většinu borelií během 1 hodiny. Předpokládá se, že schopnost hemolymfy *D. variabilis* eliminovat tyto bakterie je možná kvůli synergickému efektu mezi těmito dvěma peptidy. Pro porovnání hemolymfa z klíštěte *I. scapularis*, které bylo infikováno boreliemi, nebyla schopná viditelně inhibovat spirochéty. (Johns et al., 2001). Rozdíl mezi expresí defenzinů těchto dvou klíšťat *D.*

variabilis and *I. scapularis* možná pomůže pochopit proč je jen poslední z nich kompetentním vektorem pro přenos borelie.

AnIrDef izolovaný z nasátého klíštěte *I. ricinus* ukazuje vlastnosti, které mají i jiné doposud charakterizované defenziny jako je: proteolytické zpracování propeptidu, disulfidické můstky, stejně tak sekundární a terciární struktury. Tudíž se dají očekávat stejné funkční vlastnosti jako u jiných defenzinů. Nicméně díky jeho zápornému náboji nemůžeme vyloučit, že AnIrDef může mít i jinou než antimikrobiální funkci nebo může být aktivní vůči jiným organizmům.

V současné době se AMPs využívají i pro klinickou praxi. Dochází k využití i geneticky upravených proteinů, popřípadě i jiných technik, aby se dosáhlo vyšší výnosnosti antimikrobiální funkce. Zajímavé by mohlo být využití AnIrDef, právě díky zápornému náboji, který by se dal využít na rezistentní druhy bakterií (Marr, 2006, Juretić et al., 2009, Scorciapino et al., 2012b, Medeiros, 2014). Záporně nabité defenziny obecně a zejména AnIrDef jsou nevyužitým zdrojem antimikrobiálních látek s novým mechanismem účinku, které mají potenciál být využité pro aplikaci v medicíně a biotechnologií.

Výsledky této práce plně nevysvětlují všechny vlastnosti a antimikrobiální schopnosti nově nalezeného peptidu. Nicméně antimikrobiální funkce AnIrDef musí být objasněna s cílem zjistit, zda nově popsáný peptid může nebo nemůže být účinným proti některým původcům vektory přenášených nemocí.

Prioritou budoucích výzkumů bude purifikace nativního nebo syntetického peptidu s cílem získat dostatečné množství peptidu pro analýzu jeho antimikrobiálního potenciálu, provést analýzy funkčních schopností proti širokému spektru patogenů, které způsobují lidské choroby a prozkoumat možné zapojení AnIrDef do jiných životně důležitých procesů klíšťat, jako například trávení krve.

Podobné práce jsou nezbytné k popsání a porozumění cest imunitního mechanismu vektorů s cílem vylepšit metody kontroly klíšťat.

6. Závěr

- Gen kódující nový defenzin s pracovním názvem AnIrDef (**an**ionic **I**xodes **r**icinus **def**ensin) byl izolován z klíštěte obecného *Ixodes ricinus*.
- Podmínky amplifikace genu z cDNA byly optimalizovány za použití senzitivnější PCR BIO Ultra polymerázy.
- Celá sekvence genu byla získána pomocí 3'RACE PCR.
- *In silico* analýza AnIrDef prokázala přítomnost typických struktur a vlastností pro hmyzí defenziny.
- AnIrDef je třetím defenzinem klíšťat se záporným nábojem vůbec a prvním izolovaným z klíštěte obecného *I. ricinus*.
- Předběžná fylogenetická analýza potvrdila, že AnIrDef je nejvíce podobný záporně nabitému defenzinu z klíštěte *Amblyomma hebraeum* a *Ornithodoros moubata*. Srovnání AnIrDef mezi klíšťaty rodu *Ixodes* vykazuje nejvyšší podobnost s defenzinem *I. scapularis* (Severní Amerika).
- Rekombinantní AnIrDef byl produkován v bakteriálním expresním systému.
- Bylo zjištěno, že exprese genu kódujícího AnIrDef je indukována krmáním. Nejvýrazněji byla exprese prokázána u nasátých nymf.
- Ve tkáních nasáté samice se gen exprimuje v hemolymfě, slinných žlázách, malpigických trubicích a vaječnicích. V případě tkání nenasáté samice nebyla exprese genu prokázána.
- Genomová struktura získaného defenzinu neobsahuje žádné introny.
- Pilotní analýza antibakteriálního potenciálu rekombinantního proteinu AnIrDef prokázala jeho schopnost inhibovat růst gram pozitivních a gram negativních bakterií.

Představená práce byla obhájena na konferenci Studentské grantové agentury Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích v roce 2015 a obsadila 3. místo mezi projekty.

7. Použité zkratky

AnIrDef - **A**nionic *I.ricinus* **D**efenzin

AMK – **A**minokyselina

AMPs – **A**ntimikrobiální **p**eptidy

AAMPs – **A**nionic **a**ntimikrobiální **p**eptidy

ATB – **A**ntibiotika

BSA – **B**ovin serum **a**lbumin

cAMP – **C**ationic **a**ntimicrobial **p**eptides

cDNA – **C**omplementary DNA

DNA – **D**eoxyribonucleic acid

HRP - **H**orseradish **p**eroxidase

G- bakterie – **G**ram **p**ozitivní bakterie

G+ bakterie – **G**ram **n**egativní bakterie

LB – **L**ymská **b**orelióza

MRSA – **M**ethicillin-**r**esistant *Staphylococcus aureus*

PCR – **P**olymerase **c**hain **r**eaction

RACE PCR – **R**apid **a**mplification of **c**DNA **e**nds

RNA – **R**ibonucleic acid

SDS - **S**odium **d**odecyl sulfat

TBS – **T**ris - **b**uffered **s**alin

8. Literatura

- Bahar A.A., Ren D (2013): Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals*. 6. 1543-1575.
- Band V.I., Weiss D.S. (2015): Mechanisms of Antimicrobial Peptide Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel)*. 4. 18-41.
- Beaty B.J., Marquard W.C. (1996): The biology of disease vectors. University press of colorado.
- Blanco-Padilla A., Soto K.M., Hernández I. M., Mendoza S. (2014): Food antimicrobials nanocarriers. *The Scientific World Journal*. 2014. 11.
- Brogden K. A., (2005): Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol*. 3. 238-250.
- Brossard M., Wikel S.K. (2004): Tick immunobiology. *Parasitology*. 129. 161–176.
- Buckley A.M., Webber M.A., Cooles S., Randall L.P., La Ragione R.M., Woodward M.J., Piddock L.J. (2006): The acrab-tolc efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell. Microbiol*. 8. 847–856.
- Campos M.A., Vargas M.A., Regueiro V., Llompart C.M., Albertí S., Bengoechea J.A. (2004): Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun*. 72. 7107–7114.
- Capinera J.L. (2008) *Encyclopedia of Entomology*, 2nd edition. Springer. 1-4. 4346.
- Cloete T., Kwaadsteniet M., Botes M., Romero J. M. (2010): *Nanotechnology in Water Treatment Applications*. Casteir Academic Press. 3. 79.
- Cociancich S., Ghazi A., Hetru C., Hoffman J.A., Letellier L. (1993): Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *Biol Chem*. 268. 19239-19245.
- Cottagnoud P., Pfister M., Acosta F., Cottagnoud M., Flatz L., Kuhn F., Muller H.P., Stucki A. (2004): Daptomycin is highly efficacious against penicillin-resistant and penicillin- and quinolone-resistant pneumococci in experimental meningitis. *Antimicrob Agents Chemother*. 48. 3928-3933.

- Cox E., Michalak A., Pagentine S., Seaton P., Pokorny A. (2014): Lysylated phospholipids stabilize models of bacterial lipid bilayers and protect against antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1838. 2198–2204.
- Chan C., Burrows L.L., Deber Ch.M. (2004): Helix Induction in Antimicrobial Peptides by Alginate in Biofilms. *The Journal of Biological Chemistry.* 37. 38749-38754.
- Chrudimská T., Slaninová J., Rudenko N., Růžek D., Grubhoffer L. (2011): Functional characterization of two defensin isoforms of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasit Vectors.* 4. 63.
- Dalebroux Z.D., Matamouros S., Whittington D., Bishop R.E., Miller S.I. (2014): PhoPQ regulates acidic glycerophospholipid content of the *Salmonella Typhimurium* outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111. 1963–1968.
- Dimarcq L., Bulet P., Hetru C., Hoffmann J. (1998): Cysteine-rich antimicrobial peptides in invertebrates. *Biopolymers.* 47. 465–477.
- Epand R.M., Vogel H.J. (1999): Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochemica et Biophysica Acta.* F 1462. 11-28.
- Ezekowitz R.A., Hofmann J.A. (2003): Innate Immunity. Humana press inc. 89-107.
- Fogaca A. C., Lorenzini D. M., Kaku L. M., Esteves E., Bulet P., Daffre E. (2004): Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental & Comparative Immunology.* 28. 191–200.
- Fox J.F. (2013): Antimicrobial peptides stage a comeback . *Nature Biotechnology.* 31. 379–382.
- Frick I.M., Åkesson P., Rasmussen M., Schmidtchen A., Björck L. (2003): SIC, a Secreted Protein of *Streptococcus pyogenes* That Inactivates Antibacterial Peptides. *The Journal of Biological Chemistry.* 278. 16561-16566.
- Fujii G., Selsted M.E., Eisenberg D. (1993): Defensins promote fusion and lysis of negatively charged membranes. *Protein Sci.* 2. 1301-1312.

- Fuse N., Hayashi Y., Fukata J., Tominaga T., Ebisui O., Satoh Y., Isohara T., Uno I., Imura H. (1993): Purification and characterization of new anti-adrenocorticotropin rabbit neutrophil peptides (defensins). *Eur. J. Biochem.* 216. 653-659.
- Ganz T., Selsted M.E., Szklarek D., Harwig S.S., Daher K., Bainton D.F., Lehrer R.I. (1985): Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest.* 76. 1427–1435.
- Ganz T., Lehrer R.I. (1995): Defensin. *Pfiarmac. Thu.* 66. 191-205.
- Ganz T. (2003): The Role of Antimicrobial Peptides in Innate Immunity. *INTEGR. COMP. BIOL.* 43. 300–304.
- Gong D., Wilson P.W., Bain M.M., McDade K., Kalina J., Hervé-Grépinet V., Nys Y., Dunn I.C. (2010): Gallin; an antimicrobial peptide member of a new avian defensin family, the ovodefensins, has been subject to recent gene duplication. *BMC Immunology.* 11. 12.
- Guilhelmelli F., Vilela N., Albuquerque P., Derengowski Lda S., Silva-Pereira I., Kyaw C.M. (2013): Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol.* 9. 353.
- Guina T., Yi E.C., Wang H., Hackett M., Miller S.I. (2000): A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.* 182. 4077–4086.
- Hancock R.E.W., Falla T.J. (1996): Antimicrobial peptides: broad-spectrum antibiotics from nature. *Clinical Microbiology and Infection.* 1. 226–229.
- Hancock R.E.W., Chapple D.S. (1999): Peptide Antibiotics. *Int J Pept Protein Res.* 43. 1317-1323.
- Harris F., Dennison S.R., Phoenix D.A. (2009): Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr Protein Pept Sci.* 10. 585-606.
- Harris F., Dennison S.R., Phoenix D.A. (2016): Anionic Antimicrobial Peptides from Eukaryotic Organisms. *Current Protein and Peptide Science.* 17. 85-606.
- Hiemstra P.S., Zaat S. A. J. (2013): Antimicrobial Peptides and Innate Immunity. Springer. Kap. 1, str 1-28.
- Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway, C.A., Ezekowitz R.A.B. (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science.* 284. 1313-1318.

- von Horsten H., Schäfer B., Kirchho C. (2004): SPAG11/isoform HE2C, an atypical anionic β -defensin-like peptide. *Peptides*. 25. 1223–1233.
- Hynes W. L., Ceraul S.M., Todd S.M., Seguin K.C., Sonenshine D.E. (2005): A defensin-like gene expressed in the black-legged tick *Ixodes scapularis*. *Medical Veterinary Entomology*. 19. 339-344.
- Jensen T., Pedersen S. S., Garne S., Heilmann C., Hoiby N., Koch C. (1987): Colistin inhalation therapy in cystic fibrosis patients with chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J. Antimicrob. Chemother.* 19. 831–838.
- Jin T., Bokarewa M., Foster T., Mitchell J., Higgins J., Tarkowski A. (2004): *Staphylococcus aureus* Resists Human Defensins by Production of Staphylokinase, a Novel Bacterial Evasion Mechanism. *The Journal of Immunology*. 172. 1169 –1176.
- Johns R., Sonenshine D.E., Hynes W.L. (2001): Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31. 857–865.
- Johns R., Sonenshine D.E., Hynes W.L. (2000): Response of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) to hemocoelic inoculation of *Borrelia burgdorferi* (Spirochetales). *J Med Entomol*. 2. 265-270.
- Jones A., Geörg M., Maudsdotter L., Jonsson A.B. (2009): Endotoxin, capsule, and bacterial attachment contribute to *Neisseria meningitidis* resistance to the human antimicrobial peptide LL-37. *J. Bacteriol.* 191. 3861–3868.
- Jongejan K., Uilenberg G. (2004): The global importance of ticks. *Parasitology*. 129. 3-14.
- Jolivet-Gougeon A., Bonnaure-Mallet M. (2014): Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. *Drug Discov. Today Technol.* 11. 49–56.
- Juretić D., Vukicević D., Ilić N., Antcheva N., Tossi A. (2009): Computational design of highly selective antimicrobial peptides. *J Chem Inf Model*. 49. 2873-82
- Kagan B.L., Ganz T., Lehrer R.I. (1994): Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology*. 87. 131-149.
- Kastin A.J. (2013): *Handbook of Biologically Active Peptides*. Elsevier. Kap. 18. 103.

- Kondejewski L.H., Farmer S.W., Wishart D.S., Hancock R.E.W., Hodges R.S. (1996): Gramicidin S is active against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Int J Pept Protein Res.* 47. 460-466.
- Lai R., Lomas L.O., Jonczy J. Turner P.C. Rees H.H. (2004): Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Biochem. J.* 379. 681–685.
- Lambert J., Keppi E., Dimarcq J.L., Wicker C., Reichhart J.M., Dunbart B., Lepage P., Van Dorsselaer A., Hoffmann J., Fothergill J., Hoffmann J., Fothergrilli J., Hoffmann D (1989): Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranovae* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86. 262-266.
- Leake I. (2015): IBD: cathelicidin can reverse intestinal fibrosis in models of colitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 12. 3.
- Lee M. T., Chen F. Y., Huang H. W. (2004): Energetics of Pore Formation Induced by Membrane Active Peptides. *Biochemistry.* 43. 3590-3599.
- Lehane M.J., Wu D., Lehane S.M. (1997): Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94. 11502–11507
- Lehrer R.I., Ganz T. (1999): Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defense. *Curr Opin Immunol.* 11. 23–27.
- Li Y., Xiang Q., Zhanga Q., Huang Y., Su Z. (2012): Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides.* 37. 207–2015.
- Lichtenstein, A. (1991): Mechanism of mammalian cell lysis mediated by peptide defensins. Evidence for an initial alteration of the plasma membrane. *J. Clin. Invest.* 88. 93–100.
- Lillehoj P.B., Kaplan C.W., He J., Shi W., Ho C.M. (2014): Rapid, electrical impedance detection of bacterial pathogens using immobilized antimicrobial peptides. *J Lab Autom.* 19. 42-49.

- Lu X., Che Q., Lv Y., Wang M., Lu Z., Feng F., Liu J., Yu H. (2010): A novel defensin-like peptide from salivary glands of the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*. *Protein Sci.* 2010. 19. 392-397.
- Luca M., Maccari G., Maisetta G., Batoni G. (2015): BaAMPs: the database of biofilm-active antimicrobial peptides. *Biofouling.* 31. 193-199.
- Marr A.K., Gooderham W.J., Hancock R.E.W.(2006): Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook . *Current Opinion in Pharmacology.* 6. 468–472.
- Matsuyama K, Natori S. (1988): Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*. *J Biol Chem.* 263. 17112–17116.
- Medeiros K.A., Joanitti G.A., Silva L.P. (2014): Chitosan nanoparticles for dermaseptin peptide delivery toward tumor cells in vitro. *Anticancer Drugs.* 25. 323-331.
- Michaelson D., Rayner J., Couto M., Ganz T. (1992) : Cationic defensins arise from charge neutralized propeptides: a mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity. *Institute Journal of Leukocyte Biology.* 51.
- Moskowitz S.M., Ernst R.K., Miller S.I. (2004): PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J Bacteriol.* 186. 575-579.
- Nakajima Y., van der Goes van Naters-Yasui A., Taylor D., Yamakawa M. (2001): Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochem Mol Biol.* 31. 747-751.
- Nakajima Y., Taylor D., Yamakawa M. (2002): Involvement of antibacterial peptide defensin in tick midgut. *Experimental and Applied Acarology.* 28. 135–140.
- Neubauerová T., Macková T., Macek T., Koutek B. (2009): Kationické antimikrobiální peptidy. *Chem. Listy.* 103. 460–468.
- Nizet V. (2006): Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr Issues Mol Biol.* 8. 11-26.

- Obrecht D.L., Chevalier E., Mohle K., Robinson J. A. (2012). β -Hairpin protein epitope mimetic technology in drug discovery. *Drug Discovery Today*. 9. 63-69.
- Ong Z.Y., Wiradhama N., Yang Y.Y. (2014): Strategies employed in the design and optimization of synthetic antimicrobial peptide amphiphiles with enhanced therapeutic potentials. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 78. 28-45.
- Oppenheim J., Biragyn A., Kwak L., Yang D. (2003): Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis*. 62. ii17-ii21.
- Poole K. (2007): Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann. Med.* 39. 162-176.
- Peréz A., Poza M., Fernández A., Fernández M.C., Mallo S., Merino M., Rumbo-Feal S., Cabral M.P., Bou G. (2012): Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56. 2084-2090.
- Raj P.A., Dentino A.R. (2002): Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol. Lett.* 206. 9-18.
- Ramos R., Silva J.P., Rodrigues A.C., Costa R., Guardão L., Schmitt F., Soares R., Vilanova M., Domingues L., Gama M. (2011): Wound healing activity of the human antimicrobial peptide LL37. *Peptides*. 32. 1469-1476
- Romenstand B., Molina F., Richard V., Roch P., Granier C. (2003): Key role of the loop connecting the two beta strands of mussel defensin in its antimicrobial activity. *Eur J Biochem*. 13. 2805-2813.
- Rowley A.F., Powell A. (2007): Invertebrate Immune Systems—Specific, Quasi-Specific, or Nonspecific?. *The Journal of Immunology*. 179. 7209-7214.
- Saido-Sakanaka H., Ishibashi J., Momotani E., Amano F., Yamakawa M. (2004): In vitro and in vivo activity of antimicrobial peptides synthesized based on the insect defensin. *Peptides*. 25. 19-27.
- Rudenko N., Golovchenko M., Edwards M.J., Grubhoffer L. (2005): Differential expression of *Ixodes ricinus* genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection. *J Med Entomol*. 42. 36-41.

- Rudenko N., Golovchenko M., Grubhoffer L. (2007): Gene organization of a novel defensin of *Ixodes ricinus*: first annotation of an intron/exon structure in a hard tick defensin gene and first evidence of the occurrence of two isoforms of one member of the arthropod defensin family. *Insect Molecular Biology*. 16. 501–507.
- Saito Y., Konnai S., Yamada S., Imamura S., Nishikado H., Ito T., Onuma M., Ohashi K. (2009): Identification and characterization of antimicrobial peptide, defensin, in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. *Insect Mol Biol*. 18. 531-539.
- Schmidtchen A., Frick I.M., Björck L. (2001): Dermatan sulphate is released by proteinases of common pathogenic bacteria and inactivates antibacterial alpha-defensin. *Mol. Microbiol*. 39. 708–713.
- Scorciapino M.A., Rinaldi A.C. (2012): Antimicrobial Peptidomimetics: Reinterpreting Nature to Deliver Innovative Therapeutics. *Front Immunol*. 3. 171.
- Selsted M.E., Tang Y.Q., Morris W.L., McGuire P.A., Novotny M.J., Smith W., Henschen A.H., Cullor J.S. (1993): Purification, primary structures, and antibacterial activities of β -defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. 268. 6641-6648.
- Seufi A.M., Hafez E.E., Galal F.H. (2011): Identification, phylogenetic analysis and expression profile of an anionic insect defensin gene, with antibacterial activity, from bacterial-challenged cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *BMC Molecular Biology*. 12. 47.
- Siedenbiedel F., Tiller J.C. (2012): Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles. *Polymers*. 4. 46-71.
- Srinivas N., Jetter P., Ueberbacher B.J., Werneburg M., Zerbe K., Steinmann J., Van der Meijden B., Bernardini F., Lederer A., Dias R.L., Misson P.E., Henze H., Zumbunn J., Gombert F.O., Obrecht D., Hunziker P., Schauer S., Ziegler U., Käch A., Eberl L., Riedel K., DeMarco S.J., Robinson J.A. (2010): Peptidomimetic antibiotics target outer-membrane biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*. 19. 1010-1013.
- Stauss-Grabo M, Atiye S, Le T, Kretschmar M. (2014): Decade-long use of the antimicrobial peptide combination tyrothricin does not pose a major risk of acquired resistance with gram-positive bacteria and *Candida* spp. *Pharmazie*. 69. 838-841.

- Tang Y.Q., Yaun J., Osapay G., Osapay C., Tran D., Miller C., Quелlette A., Selsted M. (1999): A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated α -defensins. *Science*. 286. 498–502.
- Todd S.M., Sonenshine D.E., Hynes W.L. (2007): Tissue and life-stage distribution of a defensin gene in the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. *Med Vet Entomol*. 21. 141-147.
- Tonk M., Cabezas-Cruz A., Valdés J.J., Rego R., Chrudimská T., Strnad M., Šíma R., Bell-Sakyi L., Franta Z., Vilcinskas A., Grubhoffer L., Rahnamaeian M. (2014): Defensins from the tick *Ixodes scapularis* are effective against phytopathogenic fungi and the human bacterial pathogen *Listeria grayi*. *Parasites & Vectors*. 7. 554.
- Tossi A., Sandri L. (2002): Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. *Curr. Pharm. Des*. 8. 743-761.
- Tran A.X., Whittimore J.D., Wyrick P.B., McGrath S.C., Cotter R.J., Trent M.S. (2006): The lipid A 1-phosphatase of helicobacter pylori is required for resistance to the antimicrobial peptide polymyxin. *J. Bacteriol*. 188. 4531–4541.
- Uematsu N., Matsuzaki K. (2000): Polar angle as a determinant of amphipathic α -helix-lipid interactions: a model peptide study. *Biophysical Journal*. 79. 2075–2083.
- Urbanová V., Hartmann D., Grunclová L., Šíma R., Flemming T., Hajdušek O., Kopáček P. (2014): IrFC - An *Ixodes ricinus* injury-responsive molecule related to *Limulus* Factor C. *Developmental & Comparative Immunology*. 46. 439-447.
- Volf P., Horák P. (2007): Paraziti a jejich biologie. Triton. kap. 4., 262 – 264.
- Wang Z., Wang G. (2003): APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research*. 32. 590-592.
- Wang X., Ribeiro A.A., Guan Z., Abraham S.N., Raetz C.R. (2007): Attenuated virulence of a *Francisella* mutant lacking the lipid a 4'-phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104. 4136–4141.
- Wang G. (2010): Antimicrobial Peptides: Discovery, Design and Novel Therapeutic Strategies. GABI.
- Wang J., Bian G., Pan W., Feng T., Dai J. (2015): Molecular characterization of a defensin gene from a hard tick, *Dermacentor silvarum*. *Parasit Vectors*. 8. 25.

- Wei L., Che H., Han Y., Ly J., Mu L., Ly L., Wu J., Yang H. (2015): The first anionic defensin from amphibians. *Amino acids*. 47. 1301-1308.
- Wen H., Lan X., Zhang Y., Zhao T., Wang Y., Kajiura Z., Nakagaki M. (2010): Transgenic silkworms (*Bombyx mori*) produce recombinant spider dragline silk in cocoons. *Mol Biol Rep*. 37. 1815-1821.
- Whenham H., Lu W.H., Maidin M.B.M., Wilson P.W., Bain M.M., Stevenson L.M., Stevens M.P., Bedford M.R., Dunn I.C. (2015): Ovodefensins, an Oviduct-Specific Antimicrobial Gene Family, Have Evolved in Birds and Reptiles to Protect the Egg by Both Sequence and Intra-Six-Cysteine Sequence Motif Spacing. *Biology of Reproduction*. 92. 1-13.
- White S.H., Wimley W.C., Selsted M.E. (1995): Structure, function, and membrane integration. *Current Opinion in Structural Biology*. 5. 521-527.
- Woo J., Oh S., Webster P., Lee Y.J., Lim D.J., Moon S.K. (2014): OD2/RICK-Dependent β -Defensin 2 Regulation Is Protective for Nontypeable *Haemophilus influenzae*-Induced Middle Ear Infection. *PLoS One*. 9. e90933.
- Wu Z.B., Hoover D. M., Yang D., Boulegue C., Santamaria F., Oppenheim J. J., Lubkowski J., Lu W. Y. (2003). Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100. 8880–8885.
- Xiao Y., Hughes A.L., Ando J. (2004): A genome-wide screen identifies a single beta-defensin gene cluster in the chicken: implications for the origin and evolution of mammalian defensins. *BMC Genomics*. 5. 56.
- Yaduka P., Sharma S. (2014): Novel intracanal medicaments and its future scope. *Int J Pharm Bio Sci* . 4. 65-69.
- Yin L.M., Edwards M.A., Li J., Yip C.M., Deber C.M. (2012): Roles of Hydrophobicity and Charge Distribution of Cationic Antimicrobial Peptides in Peptide-Membrane Interactions. *J Biol Chem*. 10. 7738–7745.
- Yeaman M.R., Yount N.Y. (2003): Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological reviews* 55. 27 – 55.

Yu D., Sheng Z., Xu X., Li J., Yang H., Liu Z. (2006): A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. *Peptides*. 27. 31-35.

Valenzuela J.G., Francischetti I.M., Pham V.M., Garfield M.K., Mather T.N., Ribeiro J.M. (2002): Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis* *J Exp Biol*. 205. 2843–2864].

Zheng H., Zhou L., Yang X., Wang D., Liu J. (2012): Cloning and characterization of a male-specific defensin-like antimicrobial peptide from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Dev Comp Immunol*. 37. 207-211.

Zhou J., Liao M., Ueda M., Gong H., Xuan X., Fujisaki K. (2007): Sequence characterization and expression patterns of two defensin-like antimicrobial peptides from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Peptides*. 28. 1304-1310.