

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



Identifikace promotorů klíč'at pro využití v molekulárně biologických aplikacích

Bakalářská práce

Johana Mustacová

Vedoucí práce: RNDr. Ján Štěrba, Ph.D.

Školitel specialista: Kateryna Kotsarenko, MSc. Ph.D.

České Budějovice 2018

Mustacová J., 2018: Identifikace promotorů klišťat pro využití v molekulárně biologických aplikacích. [Identification of tick promoters for use in molecular biology applications. BSc. Thesis, in Czech] – 27 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This thesis was focused for the identification of suitable promoters for gene expression in *Ixodes* tick cell cultures using plasmids encoding fluorescent proteins. The tick actin, EF-1 α , and RpL4 promoters were tested. Fluorescent microscope and microplate reader demonstrated the expression of fluorescent genes under the control of the studied promoters in tick cells.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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. 2018

.....

Johana Mustacová

Poděkování

Velké poděkování patří především mým školitelům Kateryně Kotsarenko, MSc. Ph.D. a RNDr. Jánů Štěřbovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, pomoc a trpělivost při vypracování této bakalářské práce.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	1
1 LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
1.1 KLÍŠŤATA	2
1.2 TRANSFEKCE KLÍŠŤEČÍCH BUNĚK	4
2 CÍLE PRÁCE	7
3 MATERIÁL A METODY	8
3.1 MATERIÁL	8
3.1.1 Plazmidy	8
3.1.2 Klonovací vektory	8
3.1.3 Buněčné linie	8
3.1.4 Chemikálie a roztoky	8
3.1.5 Kity	9
3.1.6 Primery	9
3.2 METODY	10
3.2.1 Navržení primerů a amplifikace promotorů	10
3.2.2 PCR	10
3.2.3 Agarózová elektroforéza	12
3.2.4 Izolace DNA z gelu	12
3.2.5 Precipitace DNA	12
3.2.6 Klonování – Gibson Assembly	12
3.2.7 Transformace bakterií <i>E. coli</i>	13
3.2.8 Colony PCR	13
3.2.9 Izolace plazmidů	13
3.2.10 Transfekce klíčecích buněk	14
3.2.11 Fluorescenční mikroskopie	15
4 VÝSLEDKY	16
4.1 Transfekce buněčné linie ISE6 s pRSET+CMV a pET+SV40	16
4.2 Transfekce klíčecí buněčné linie ISE6 a IRE/CTVM19 (pRSET+EF-1 α , pRSET+RpL4, pRSET+Actin)	18

4.3	Transfekce lidské buněčné linie DAOY	21
5	DISKUSE.....	22
6	ZÁVĚR.....	24
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	25

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

bp	párů bází (z angl. base pairs)
CaMV	angl. cauliflower mosaic virus
CMV	cytomegalovirus
CRISPR	angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Cas9	angl. CRISPR associated protein 9
DAPI	4', 6-diamidin-2-fenyindol
EF-1 α	elongation factor -1 α
FBS	ang. fetal bovine serum
GFP	zelený fluorescenční protein (z angl. green fluorescent protein)
L-15 médium	Leibovitz médium
mRNA	angl. messenger ribonucleid acid
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PBS	angl. phosphate-buffered saline
PFA	paraformaldehyd
RBS	angl. ribosomal binding site
RpL4	angl. Ribosomal protein L4
SV	angl. Simian Virus
TAE	Tris-acetate EDTA
TPB	angl. tryptose phosaphate broth

1 LITERÁRNÍ PŘEHLED

1.1 KLÍŠŤATA

Klíšťata řadíme mezi obligátní, hematofágní parazity, kteří jsou téměř celosvětově rozšířeni. Jedná se o vysoce obávané vektory lidských a zvířecích onemocnění. Mohou infikovat jak suchozemské obratlovce, včetně savců, tak ptáky, plazy, a dokonce i obojživelníky. Jsou to přenašeči širšího spektra patogenních organismů než jiné skupiny členovců. Mezi tyto patogenní organismy můžeme zahrnout houby, viry, bakterie (včetně rickettsií) a protozoa. Klíšťata navíc přímo způsobují smrtelnou klíšťovou paralýzu, alergické reakce a otravu (Sonenshine, 2014).

Nevšední úspěch klíšťat při přenosu onemocnění souvisí především s jejich dlouhověkostí, vysokým reprodukčním potenciálem a širokým spektrem hostitelů, stejně tak jako s jejich schopností vstřebávat velké množství krve po relativně dlouhý čas (Šimo a kol., 2017).

Onemocnění způsobená klíšťaty můžeme rozdělit do dvou skupin: nemoci přenášené klíšťaty a nemoci způsobené klíšťaty. Mezi onemocnění přenášená klíšťaty řadíme například lymeskou boreliózu, klíšťovou encefalitidu, rickettsiózu (způsobuje například Horečku Skaliských hor, angl. Rocky Mountain fever), ehrlichiózu, nebo lidskou granulocytární anaplazmózu. Neméně významná jsou zoonotická onemocnění přenášená klíšťaty, jako je anaplazmóza a babesióza, které hrají klíčovou roli v celosvětových ekonomických ztrátách zemědělské produkce dobytka (Sonenshine, 2014; Hajdušek a kol., 2013). Mezi onemocnění přímo způsobená klíšťaty zahrnujeme již výše zmíněnou paralýzu, která je charakteristická postupným ochrnutím jedince. Často končí smrtí, aniž by byla rozpoznána přítomnost klíštěte. Kousnutí některými druhy klíšťat může způsobit těžké otravy, ty však vedou ke smrti jen zřídka (Sonenshine, 2014).

U většiny patogenů dochází k přenosu na obratlovce skrze sliny, tento fakt zdůrazňuje význam klíštěcích slinných žláz a slin v procesu přenosu patogenů. Klíštěcí sliny obsahují komplexní a sofistikované farmakologicky účinné látky, které umožňují krmení klíšťat a usnadňují průtok krve z hostitele. Mimo jiné zabraňují bolesti a svědění, inhibují hemostázu a regulují vrozenou a získanou imunitní odpověď, angiogenezi a hojení ran u hostitelů (Francischetti a kol., 2009; Šimo a kol., 2017).

Taxonomicky patří klíšťata do kmene členovci, podkmen klepítkatci, třída pavoukovci, podtřída roztoči, nadřád Parasitiformers, řád klíšťata. Dohromady bylo popsáno již 907 druhů klíšťat (Bowman a kol., 2008). Všechny druhy klíšťat jsou rozděleny do tří čeledí: Ixodidae, Argasidae a Nuttalliellidae (ne moc známá monotypická čeleď, reprezentovaná pouze jedním druhem) (Nava a kol., 2009).

Klíšťata můžeme rozdělit na takzvaná „měkká“ a „tvrdá“. „Měkká“ klíšťata (klíšťáci, čeleď Argasidae) se vyznačují tím, že mají měkký hřbet bez chitinu, kdežto „tvrdá“ klíšťata (klíšťata, čeleď Ixodidae) mají tvrdý hřbet – úplně, nebo částečně pokrytý chitinem (Nava a kol., 2009).

V posledních letech pokroky medicíny a hubení škůdců značně omezily většinu nemocí přenášených vektory. Navzdory těmto faktům všechny klíšťaty přenášené nemoci se i nadále hojně vyskytují, a dokonce se zvyšuje jejich geografické rozšíření (Sonenshine, 2014). Z klíšťat se stal dosud neprobádaný objekt zájmu vědců, jak kvůli svým schopnostem jakožto vektorů patogenů, tak z hlediska farmakologických a biochemických vlastností molekul, které produkují. Znalost klíšťecích promotorů pro použití v molekulárně biologických aplikacích, napomůže k regulaci genové exprese v klíšťecích buňkách a případné výrobě rekombinantních proteinů.

Rekombinantní proteiny jsou uměle vytvořené pomocí genových modifikací. Při výrobě těchto proteinů je do genomu producenta uměle vložen gen z jiného organismu, kódující požadovaný protein (Kodíček, 2004). Pro vytvoření rekombinantních proteinů je za potřebí gen pro daný protein izolovat a naklonovat v expresním vektoru. Většina rekombinantních proteinů používaných v léčivech je lidských, ale exprimují se v jiných organismech, jako například v bakteriích, kvasinkách, nebo zvířecích buněčných kulturách (Clark & Pazdernik, 2016).

Rekombinantní proteiny původem ze širokého spektra organismů byly již úspěšně produkovány v prokaryotických expresních systémech. Ačkoliv je exprese jakéhokoliv genu z jakéhokoliv organismu v prokaryotickém hostiteli teoreticky možná, prakticky eukaryotické proteiny produkované v bakteriích nemají vždy požadovanou biologickou aktivitu nebo stabilitu (Glick a kol., 2010). S tímto faktem úzce souvisí absence většiny posttranslačních modifikací proteinů u prokaryot.

U prokaryot nejsou jednotlivé kroky syntézy proteinů rozděleny, a proto k translaci mRNA dochází souběžně s transkripcí. Naopak u eukaryot probíhá transport mRNA z jádra

do ribozomu v cytoplazmě nebo na endoplasmatickém retikulu, kde probíhá translace. Mnoho proteinů podstupuje určitý typ posttranslačních úprav, které jsou vyžadovány pro aktivitu a stabilitu proteinů (Glick a kol., 2010). Z důvodu zachování nativní struktury rekombinantních proteinů určitého organismu je vhodné vytvářet je přímo v něm.

Rekombinantní proteiny mají využití například v biotechnologiích nebo při výrobě biologických léčiv. Konkrétně proteiny obsažené v klíštěcích slinách mají potencionální využití v humánní medicíně jakožto antikoagulantia (Francischetti a kol., 2002; Šimo a kol., 2017).

1.2 TRANSFEKCE KLÍŠTĚCÍCH BUNĚK

V současnosti je k dispozici více než čtyřicet buněčných linií, získány byly z třinácti druhů čeledi Ixodidae a z jednoho druhu čeledi Argasidae. Úspěšná izolace a rozmnožení několika ekonomicky důležitých klíštěcích patogenů v klíštěcích buněčných liniích vytvořili užitečný model pro studium interakcí mezi klíštěcími buňkami a těmito virovými a bakteriálními onemocněními. Klíštěcí buněčné linie se ukázaly být užitečným nástrojem při definování komplexního charakteru vztahu hostitel-vektor-patogen. Díky dostupnosti nových genomických nástrojů (např. RNA interference) se klíštěcí linie stanou stále důležitějším doplňkem ke studiu samotných klíšťat a klíštěcích onemocnění *in vivo* (Bell-Sakyi a kol., 2007).

Některý vědci (Kurtti a kol., 2008; Esteves a kol., 2008; Naranjo a kol., 2013; Tuckow a kol., 2015) se již pokoušeli o expresi genů za pomoci transfekce klíštěcích buněk, nicméně problémem v jejich výzkumu byly relativně slabé promotory.

Promotor je speciální regulační oblast v sekvenci DNA, která upravuje expresi příslušného genu. V zásadě se jedná o to, že na oblast promotoru se naváže RNA polymeráza a proteiny podmiňující počátek transkripce, jedině tak může začít přepis genu do RNA. Počátek transkripce je obzvláště důležitým krokem v genové expresi, protože jde o hlavní bod, ve kterém buňka reguluje, který protein bude produkován a v jakém množství (Alberts, 2002).

Rozlišujeme dva druhy promotorů, promotory silné a promotory úzce regulované (angl. *tightly regulated*). Silné promotory jsou při produkci rekombinantních proteinů používány v případech, kdy je vyžadován vysoký stupeň genové exprese proteinů z klonovaných genů.

Úzce regulované promotory jsou užitečné ve fyziologických experimentech, jelikož se stávají v buňce aktivními jen v reakci na specifické podněty (Clark & Pazdernik, 2013).

Pro náš experiment a další využití případně nalezených promotorů by bylo vhodné najít především silné promotory. Na základě odborných článků jsme tedy vyhodnotili, které promotory použijeme pro naší práci s klíčecími buněčnými liniemi.

CMV promotor, společně s kuřecím β aktin a CAGGS (což byl chimérický konstrukt promotorů CMV a β aktin) promotorem použil Esteves a kol. (2008) při transfekci klíčecích buněčných linií BME26. Tyto klíčecí embryonální linie pocházely z klíčete druhu *Rhipicephalus microplus*. Vektory obsahovali červený fluorescenční protein DsRed2 a jeho exprese v buňkách trvala až 5 týdnů. Autor článku zde popisuje, že CAGGS promotor byl v buňkách funkční a DsRed2 se ukázal jako vhodný reportérový gen pro klíčecí buňky *R. microplus* (Esteves a kol., 2008).

Naopak Kurtti a kol. (2008) ve svém pokusu používal embryonální klíčecí buněčné linie druhu *Ixodes scapularis* ISE6. Používal stejné promotory jako v případě Esteves a kol. (2008). Navíc použil promotor pro Simian Virus SV40, který byl použit v plazmidu, jež měl jako reportérový gen neomycin fosfotransferáza-rezistentní gen. Exprese v buňkách probíhala zhruba 4 týdny a byla vyhodnocena jako méně stabilní. Nicméně, úspěšná exprese DsRed genu a genu neomycin fosfotransferáza v ISE6 buněčné linii nasvědčuje tomu, že promotory, které vedly tyto geny se dají považovat za funkční v klíčecích buňkách (Kurtti a kol., 2008).

Machado-Ferreira a kol. (2015) ve své práci použil promotor CaMV 35S, klíčecí promotor PBm (*R. microplus* pyretroid metabolizing esterase gene) a promotor SV40. Jako reportérový gen byl použit GFP. V této práci byly použity klíčecí buněčné linie *R. microplus* BME/CTVM2 a také živé organismy, konkrétně larvální stadium *R. microplus* a *I. scapularis*. Transgenní přesun a exprese v eukaryotických buňkách byly zprostředkovány pomocí bakterie *A. tumefaciens*. V závěru článku je uvedeno, že transgenní exprese bylo dosaženo *in vivo* v obou používaných druzích klíšat a také *in vitro* u klíčecí buněčné linie. Jako nejvýkonnější se zdál být PBm promotor. Nicméně exprese fluorescenčního proteinu trvala jen 2-3 týdny (Machado-Ferreira a kol., 2015).

Virové promotory CMV a SV40 byly tedy označeny jako funkční v klíčecích buněčných liniích druhu *R. microplus* BME26 (Esteves et al., 2008) a *I. scapularis* ISE6 (Kurtti et al. 2008). V těchto případech byly promotory použity pro vytvoření buněčných linií,

které budou stabilně exprimovat červený fluorescenční protein po určitou dobu, avšak neurčily relativní sílu promotoru.

Protože chtěl Tuckow a kol. (2015) najít promotory se značnou transkripční aktivitou v klíčících buňkách, zvolil pro svůj experiment promotor pro klíčící gen elongation factor-1 α (*ef-1 α*) a promotor pro gen ribosomal protein (*rpl4*). Tyto geny byly zvoleny proto, že jejich exprese probíhá napříč všemi stádii *R. microplus*. Jako reportérový gen posloužil duální luciferázový systém (angl. dual luciferase system). Oba testované promotory EF-1 α a rpL4 byly schopné fungovat jako promotory v buněčné linii BME26, což bylo demonstrováno aktivitou luciferázy jakožto reportéru. Exprese v buňkách probíhala zhruba 7 dní (Tuckow a kol., 2015).

Informace o nové sekvenci funkčního klíčícího promotoru zlepší porozumění základům molekulární biologie klíšťat, stejně tak jako poskytne další užitečné molekulárně biologické nástroje pro experimenty používající kultury klíčících buněk. Genetická manipulace s vektory patogenů, jako jsou klíšťata, může zlepšit vývoj alternativních strategií boje proti jimi přenášeným chorobám. Klíčící expresní vektory s použitím silných promotorů mohou být potencionálně použity pro výrobu rekombinantních proteinů v klíčících buňkách nebo ke genové úpravě pomocí CRISPR/Cas9.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem práce bude identifikovat sekvence silného promotoru a ověřit jejich využití v molekulárně biologických aplikacích s klíčecími buňkami.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Plazmidy

K našemu pokusu byly vybrány plazmidy pET-30a+ (GenScript), pRSET/EmGFP (Invitrogen) a pHMGFP Vector (Promega). Plazmidy pRSET a pHMGFP se vyznačují tím, že v sobě obsahují gen pro zelený fluorescenční protein, což je potřebná vlastnost k jejich následné detekci. Navíc tyto plazmidy obsahují geny rezistentní na antibiotika, plazmid pET-30a+ obsahuje gen pro rezistenci na kanamycin, plazmidy pRSET/EmGFP a pHMGFP obsahují gen pro rezistenci na ampicilin.

3.1.2 Klonovací vektory

Bylo použito několik druhů chemicky kompetentních buněk *E. coli*, a to TOP10 (Thermo Fisher Scientific), NEB 5-alpha (New England Biolabs) a NovaBlue Singles (Novagen/MERCK Millipore).

3.1.3 Buněčné linie

Pro pokus byly vybrány embryonální klišťecí buněčné linie ISE6 a IRE/CTVM19, které byly poskytnuty Tick Cell BioBank, Pirbright Institute (Dr. Lesley Bell-Sakyi). Buňky byly kultivovány v médiu L-15 (Biowest) + 20 % FBS (Biowest) + 10 % TPB + antibiotika. Dále byla použita lidská medulloblastomová buněčná linie DAOY ATCC HTB-186, která byla kultivována v médiu: DMEM (Biowest)+FBS+ antibiotika.

3.1.4 Chemikálie a roztoky

Tabulka I.: Použité chemikálie a roztoky v závislosti na druhu metody.

Agarózová gelová elektroforéza	
TAE pufr	0,04 M tris acetate, 1 mM EDTA
Agaróza	1,5 % agarózy v 1x TAE pufru

Precipitace DNA	
3M octan sodný	
96 % ethanol	
70 % ethanol	
DEPC voda	

Média a půdy pro kultivaci bakterií	
LB medium	na 1000ml: 10 g pepton, 5 g kvasinkový extrakt, 10 g NaCl
LB agar	agar v LB mediu
SOC medium	na 10ml: 2% trypton, 0.5% kvasinkový extrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glukózy
Antibiotika	Ampicilin, Kanamycin

Kultivace klíčtčích buněk	
PBS	1x PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄
L-15 medium	
Antibiotika	Penicilin, Streptomycin
TPB	na 1000 ml: 20 g tryptóza, 2 g dextróza, 5 g NaCl, 2,5 g Na ₂ HPO ₄
FBS	

Kultivace lidských buněk	
DMEM	
Antibiotika	Penicilin, Streptomycin

3.1.5 Kity

Tabulka II: Použité kity v závislosti na metodách.

PCR	PCR using Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)
Agarózová gelová elektroforéza	6x DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)
Purifikace DNA	illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare)
Klonování	Gibson Assembly Master Mix (New England Biolabs)
Izolace plasmidu	Plasmid Mini Kit a Plasmid Maxi Kit (Qiagen)
Transfekce	PolyJet™ In Vitro DNA Transfection Reagent (SignaGen)

3.1.6 Primery

Primery, které byly použity pro PCR reakce jsou zaznamenány v Tabulce III. Primery byly vyrobeny firmou Generi Biotech.

Tabulka III: Použité primery.

Název primeru	Sekvence	T_m [°C]
pET-Fga	5'-ATT TCG CGG GAT CGA GAT CGA TCT CGA TCC TCT-3'	65,3
pET-Rga	5'-CTC GAG CAC CAC CAC CAC CAC CAC TGA GAT CCG-3'	69,4
SV40-Fga	5'-AGC TAG GGC GCT TTA GGT GTG GAA AGT CCC CAG-3'	68
SV40-Rga	5'-AGC CTA GGC CTC CAA AAA AGC CTC CTC ACT ACT-3'	66
RBS-Fga	5'-AGG AGC CTC CTC CGG TAC ATA TGT ATA TCT CCT TC-3'	63,1
RBS-Rga	5'-AAA CCT CCG GAT CCG AGG GAA TTG TGA GCG GAT A-3'	67
mRFP-Fga	5'-ATG GCC TCC TCC GAG GAC GTC ATC AAG GAG TTC-3'	67,4
mRFP-Rga	5'-CAC CAC CAC GAG CTC TTA GGC GCC GGT GGA GTG-3'	71
pRSET-Fga	5'-CCA CAA CGG TTT CCC TCT AGA-3'	56,5
pRSET-Rga	5'-AGA GGC GGT TTG CGT ATT G-3'	55,7
CMV-Fga	5'-ACG CAA ACC GCC TCT GTT GAC ATT GAT TAT TGA CTA-3'	63,5
CMV-Rga	5'-GGG AAA CCG TTG TGG GAG CTC TGC TTA TAT AGA CCT-3'	65,3
EFIS-Fga	5'-CGC AAA CCG CCT CTA TCA GAT AGA ATC AAT AA-3'	59,7
EFIS-Rga	5'-TTG TGG CCG ACG GAG AGC GAA GAG AA-3'	65,3
pRSET-EF-Fga	5'-CTC TCC GTC GGC CAC AAC GGT TTC CCT CTA GA-3'	67,7
pRSET-EF-Rga	5'-TCT GAT AGA GGC GGT TTG CGT ATT GGG CGC-3'	66,6
Rpl4IS-Fga	5'-ACG CAA ACC GCC TCT AAT AAT AGC TCT GCC TTT-3'	63,9

Název primeru	Sekvence	T _m [°C]
RpL4IS-Rga	5'-GGG AAA CCG TTG TGG ACG TCG GAG ATG AAA AAG-3'	64,7
ActIS-Fga	5'-ACG CAA ACC GCC TCT TGT CCA CGC AGG GTA TAA-3'	68,1
ActIS-Rga	5'-GGG AAA CCG TTG TGG CTC TTG ATC TCA GGG GTG-3'	67,2
mGFP F	5'-CCCCTGCCCTTCGCTTATGA-3'	59,6
mGFP R	5'-TGCTTCGCTCCCACGAGTAG-3'	59,2

3.2 METODY

3.2.1 Navržení primerů a amplifikace promotorů

Specifické primery byly navrženy v počítačovém programu Geneious podle známých sekvencí promotorů a plazmidů. Délka primerů byla 19-36 bází s teplotou tání v rozmezí od 55,7 do 71 °C, ta byla určena podle programu OligoAnalyzer 3. 1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>), tak aby rozdíl teplot tání u dvojice primerů byl minimální.

3.2.2 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) nám posloužila k amplifikaci našich promotorů a plazmidů. K reakci jsme použili Q5® Hot Start High-Fidelity DNA polymerázu. Reakce probíhala ve zkumavkách velikosti 0,2 µl v termocykléru T100 (Bio-Rad). Složení PCR reakcí o celkovém objemu 50 µl jsou zaznamenány v Tab. IV.

Tabulka IV: Složení PCR reakce.

5x Q5 Reaction Buffer	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
Forward Primer	2,5 µl
Reverse Primer	2,5 µl
Template DNA	1 µl
Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	0,5 µl
Nuclease-Free Water	32,5 µl

Teplotní a časový profil reakce: 30 sekund 98 °C (počáteční denaturace templátové DNA a aktivace DNA polymerázy), následně proběhlo 30 cyklů 10 sekund 98 °C (denaturace DNA), 30 s za specifické teploty nasednutí pro použité primery (angl. annealing temperature), 30 s 72 °C (syntéza DNA, angl. elongation). Následovalo prodloužení reakce 2 minuty 72 °C (angl. final extension) a následně ponechání vzorků při teplotě 10 °C.

Amplifikace části plazmidu pET-30a+ neobsahující původně obsažený promotor o velikosti 5150 bp, proběhla s primery pET-Fga a pET-Rga se specifickou nasedací teplotou (Tab.III). Obdobně plazmid pRSET/EmGFP, velikost 3528 bp, byl amplifikován s dvojicí

primerů pRSET-Fga a pRSET-Rga (Tab.III). Speciálně pro promotor EF-1 α byl plazmid pRSET/EmGFP amplifikován s primery pRSET-EF-Fga a pRSET-EF-Rga (Tab.III).

Pro amplifikaci CMV promotoru o délce 588 bp jsme použily plasmid pcDNA DEST 40 a primery s názvem CMV-Fga a CMV-Rga (Tab. III). Promotor SV40 o délce 309 bp byl amplifikován z plasmidu pcDNA DEST 40 s primery SV40-Fga a SV40-Rga a jejich nasedací teplotou (Tab. III). Dále byl z téhož plasmidu amplifikován RBS o délce 73 bp pomocí primerů RBS-Fga, RBS-Rga (Tab. III). Fluorescenční protein mRFP byl amplifikován pomocí primerů mRFP-Fga a mRFP-Rga (Tab.III).

Promotor pro EF-1 α , velikost 263bp, byl získán analýzou genomové sekvence *I. scapularis* (GenBank DS847962.1). Promotor pro gen RpL4, velikost 272 bp, byl získán analýzou genomové sekvence *I. scapularis* (GenBank DS778096.1). Promotor pro gen Actin, velikost 50 bp, byl získán analýzou genomové sekvence *I. scapularis* (GenBank DS620365.1). Reakce probíhala se specifickými primery (EFIS-Fga, EFIS-Rga, RpL4IS-Fga, RpL4IS-Rga, ActIS-Fga, ActIS-Rga) a jejich nasedacími teplotami (Tab. III). Sekvence těchto promotorů jsou uvedeny na Obr. 1.

<p>Sekvence EF-1α promotoru</p> <p>5'-ATCAGATAGAATCAATAAAAACCGGAGCATGCGGGCCGCCATGACAGTCAGCAAGATTTAGGACCGCATTITG ATAATAAACTTCTTTACAAGCTTTTATAAAAATATTTAATAAATTTAAAATTACCATAATGTTTTACTTTAATAA AATATTTATAAACGTTTGCATAACAAAGCGTTTTGTGAACGTATTGATGACGTCATAACCAAGTCGATATATAGC ACGTGACCCGCCCGCTCACTTCTCTTCGCTCTCCGTCGG-3'</p> <p>Sekvence RpL4 promotoru</p> <p>5'-AATAATAGCTCTGCCTTTTATAACGGGCGATAGCTTCCGCTACCTAGCGACTTCTATAGATTCTGCTGAGGAA GACTAGTAATTTTTGACAAAACATTAAGCTATTGTAAGCTATAAGTAATAAATAAATTTATAAAAATAATT CACGTAAATGTTTGCGAACAGTTGTGGCTAGAGTTTATTATAGACGGAACATTTTTGGATCCAAGCATGTAGTT CGTGTCTATGCGCGCCATGTATTCCTCCGACCTTTTTTCATCTCCGACGT-3'</p> <p>Sekvence Actin promotoru</p> <p>5'-TGTCCACGCAGGGTATAACTCCAGCTGACCAGCACCCCTGAGATCAAGAG-3'</p>

Obrázek 1: Sekvence promotorů získaných z genomové sekvence *I. scapularis*.

3.2.3 Agarózová elektroforéza

Navážené množství agarózy bylo přidáno k odměřenému 1xTAE pufru v takovém množství, aby byl získán gel o požadované koncentraci (1-2%). Takto vzniklý roztok se nechal vařit přibližně 3 minuty v mikrovlnné troubě a po dostatečném ochlazení (přibližně na 50 °C) byl nalit do elektroforetické vaničky s hřebínkem. Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforetické vany, která obsahovala 1xTAE pufr. Vzorek byl smíchán s 6x DNA Gel Loading Dye + SYBR. Pro určení velikosti DNA fragmentů byl použit 1 kb marker + SYBR. Elektroforéza probíhá většinou při 120 V, zhruba 45 minut.

3.2.4 Izolace DNA z gelu

Izolace byla provedena přesně podle postupu popsáném v kitu ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit. Tento kit jsme používali pro izolaci fragmentů DNA z gelu, je určen pro izolaci fragmentů o velikosti v rozmezí od 50 bp až do 10 kb. U takto získané DNA se změřila koncentrace a čistota vzorku. Na základě výsledků se zvážily další kroky a případné přečištění.

3.2.5 Precipitace DNA

Precipitace neboli vysrážení slouží k odstranění nežádoucích příměsí (např. solí) ze vzorku DNA. K DNA byla přidána 1/10 objemu 3M octanu sodného a 3 objemy 96 % ethanolu. Vzorek byl ponechán v mrazáku při -20 °C přes noc (rychlejší varianta je 20 minut při -70 °C). Následně se vzorek centrifugoval při 14 500 x g, 4 °C, 30 minut. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a přidáno 200 µl 70 % ethanolu a následně proběhla opět centrifugace při 14 500 x g, 4 °C, 30 minut. Poté byl odpipetován supernatant a vzorek byl ponechán vyschnout. Po dostatečném vyschnutí ethanolu byl pelet rozpuštěn ve 20 µl destilované vody.

3.2.6 Klonování – Gibson Assembly

Tato metoda umožňuje v rámci jedné izotermické reakce spojení několika překrývajících se DNA fragmentů, bez ohledu na jejich délku. Součástí reakční směsi je kromě DNA fragmentů také exonukleáza, DNA polymeráza a DNA ligáza. Výsledkem reakce je dvouvláknová kruhová molekula DNA, která může sloužit například jako templát pro PCR, nebo v našem případě k přímé transformaci buněk (Gibson, 2009).

Pro náš pokus byl použit Gibson Assembly Master Mix. Postupovalo se dle návodu výrobce. Jednotlivá látková množství a hmotnost fragmentů pro protokol Gibson Assembly jsou zaznamenány v Tab. V.

Tabulka V: Látkové množství a hmotnost fragmentů pro Gibson Assembly.

Fragment	Mol [fmol]	Hmotnost [ng]
pRSET/GFP	22,93	50
CMV	68,81	26,28
pET	15,71	50
SV40	47,13	9,44
RBS	78,52	5,15
mRFP	47,12	20,18
EF	73,93	12,84
pRSET EF	24,66	54
RpL4	74,32	13,78
pRSET RpL4	24,78	54
Actin	74,28	3,63
pRSET Actin	24,78	54

3.2.7 Transformace bakterií *E. coli*

Pro všechny kompetentní buňky Top10, NEB 5-alpha a NovaBlue Singles byl použit následující postup. Práce probíhala v laminárním boxu za sterilních podmínek.

Pro transformaci bylo použito 50 μ l suspenze kompetentních buněk. K nim bylo přidáno 3 μ l ligační směsi a proběhla inkubace 30 minut na ledu. Následně byl proveden teplotní šok na 30 sekund při 42 °C, poté byla zkumavka se směsí přemístěna na led. Ke směsi bylo přidáno 250 μ l SOC média a zkumavka byla inkubována na třepačce 1 hodinu při 37 °C a 225 rpm. Následně byla buněčná suspenze rozetřena sterilní skleněnou hokejkou na kultivační agarovou půdu ve množství 150 μ l a 50 μ l na plotnu a vzorky se nechaly inkubovat 24 hodin při 37°C.

3.2.8 Colony PCR

Pro kontrolu, zdali jsou naše plazmidy přítomny v bakteriálních buňkách byla provedena tzv. colony PCR. Tato PCR reakce obsahovala primery, které byly specifické pro náš klonovaný fragment. Pro každou transformaci bylo použito pro kontrolu nejméně 20 kolonií. Pro separaci PCR produktů byla použita gelová elektroforéza v 1 % agarózovém gelu.

3.2.9 Izolace plazmidů

Izolace plazmidů z kompetentních buněk byla provedená pomocí Plasmid Mini Kitu a Plasmid Maxi Kitu (Qiagen) na základě postupu, který je uveden výrobcem.

3.2.10 Transfekce klíčtých buněk

Pojem transfekce značí umělé zavádění cizorodých nukleových kyselin do eukaryotických buněk, nebo přesněji do zvířecích buněk (Tuckow a kol., 2015). S buněčnými liniemi jsme pracovali v laminárním boxu za sterilních podmínek.

3.2.10.1 Elektroporace

Jedná se o aplikaci řízených elektrických pulsů do živých buněk nebo tkání za účelem permeabilizace buněčné membrány k použití transfekce nebo transformace. Tyto impulzy jsou dodány generátorem do páru elektrod. Impulz posléze vyvolá transmembránový potenciál, který způsobí vratný rozpad buněčné membrány, což vede k vytváření pórů, které umožní molekulám, jako jsou například DNA, proteiny nebo protilátky, vstoupit do buňky. K elektroporaci jsme použili přístroj ECM 630 Electroporation System (BTX).

Elektroporace buněčných linií ISE6 a IRE/CTVM19 plazmidy pRSET+CMV a pET+SV40 byla provedena dle protokolu „DNA Transfection by Electroporation“ (Sambrook & Russell, 2001). Použito bylo 7,2 mil buněk ISE6 /4,5ml a 86,4 mil. buněk IRE19 /4,5 ml. Buňky byly resuspendovány a centrifugovány při 500 x g, 5 min., 4°C. Následně byly buňky resuspendovány ve 4, 5 ml nového média a spočítány. Poté proběhla centrifugace při 500 x g, 5 min., 4 °C a buňky byly resuspendovány při pokojové teplotě v 2,4 ml 1xPBS. Následně bylo 400 µl roztoku přesunuto do 4 mm elektroporačních kyvet, tento krok probíhal na ledu. Podmínky elektroporace: odpor 300 Ω, kapacitance 1050 µF, časová konstanta – 29 ms, napětí 250 V, 350 V a 500 V.

3.2.10.2 PolyJet

Transfekce s použitím reagentie PolyJet je prováděna na chemické bázi. PolyJet je popisován jako biologicky odbouratelné transfekční činidlo na bázi polymeru, u kterého bylo prokázáno, že dokáže zavést DNA do buněčných linií různých druhů. Při transfekci klíčtých buněčných linií bylo použito médium L-15, při transfekci lidských buněčných linií bylo použito médium DMEM, low glucose. Efektivita transfekce byla ověřena pomocí PCR se specifickými primery pro mGFP a měřením fluorescence na čtečce mikrodětiček (Synergy™ H1, Biotek).

Pro reakci jsme použili různé poměry PolyJet:DNA, konkrétně 1:1, 2:1, 3:1 a 4:1. Rovněž byly pro reakci použity dvě rozdílná množství DNA (100 ng a 200 ng). Do každé jamky na panelu bylo napipetováno 100 µl média s buňkami (30000 buněk na jamku) 10 µl mixu pro transfekci (5 µl PolyJetu a 5 µl DNA).

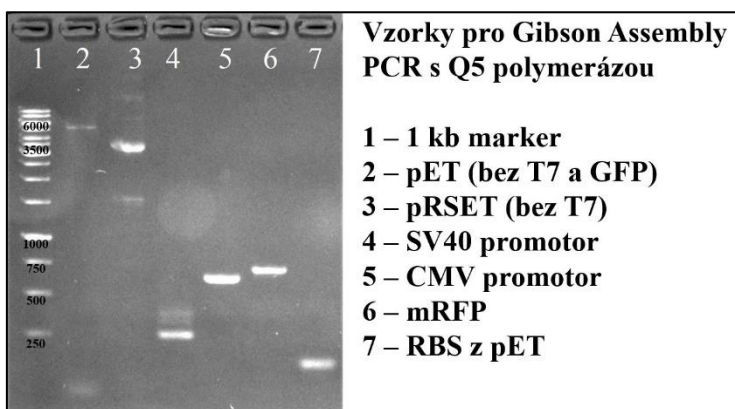
3.2.11 Fluorescenční mikroskopie

Pro detekci signálu fluorescenčních proteinů fluorescenčním mikroskopem byly transfekované buňky ISE6 centrifugovány při 2000 x g, 10 min (Cryo-System Bio-Seal (Hettich), za pokojové teploty. Buňky byly fixovány na sklíčko pomocí 4% PFA, před fixací byl vzorek ohraničen hydrofilním markerem. Fixace proběhla 30 min., následně byl vzorek 3x promyt PBS, vysušen a zakápnut 2 kapkami Vectashield Antifade Mounting Medium s DAPI. Nakonec byl vzorek překryt krycím sklíčkem, které bylo zafixováno lakem na nehty.

4 VÝSLEDKY

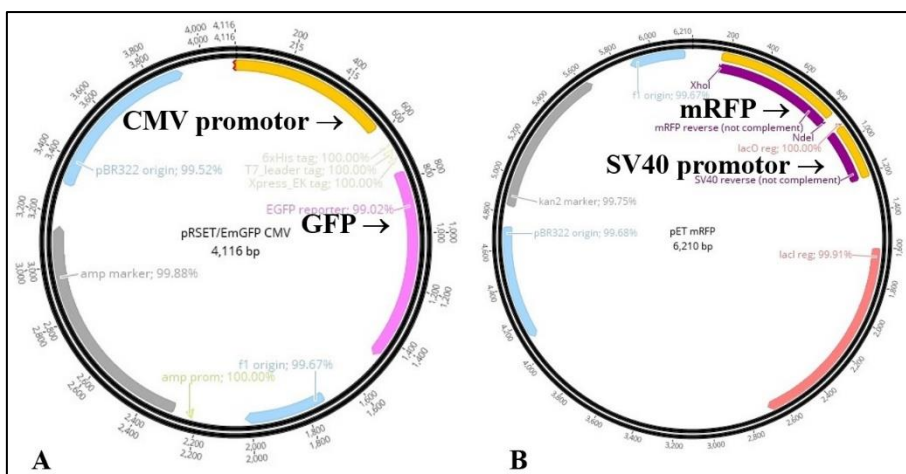
4.1 Transfekce buněčné linie ISE6 s pRSET+CMV a pET+SV40

Pro získání požadovaných plazmidových konstruktů byly vytvořeny příslušné primery, jak je uvedeno v Metodách (3.2.1). Následně byly pomocí PCR amplifikovány jednotlivé sekvence. Před provedením Gibson Assembly byla provedena PCR reakce jednotlivých fragmentů. Byly obdrženy fragmenty, jejichž délka souhlasila, tudíž se následně použily pro metodu Gibson Assembly. Výsledek PCR reakce je vyobrazen na Obrázku 2.



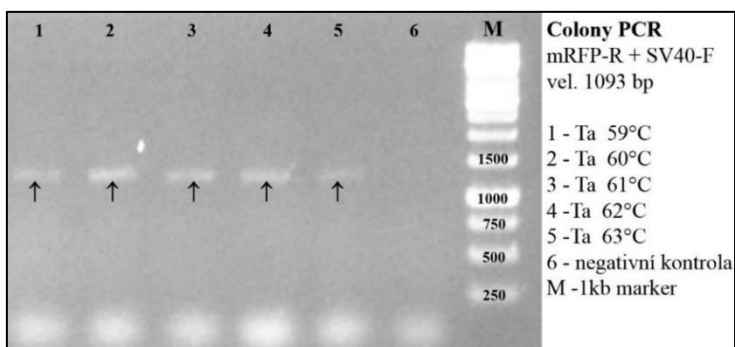
Obrázek 2: Fragменты pro Gibson Assembly získané pomocí PCR.

Na Obr. 3 je vizualizace obdržенých plazmidů, kde jsou zobrazeny příslušné promotory a reportérové geny.



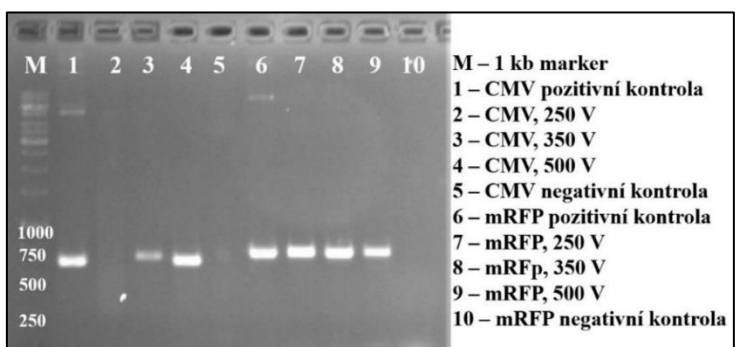
Obrázek 3: **A:** Plasmid pRSET+CMV s reportérovým genem GFP pod promotorem CMV navrhnutý v programu Geneious. **B:** Plasmid pET+SV40 s reportérovým genem mRFP pod promotorem SV40 navrhnutý v programu Geneious.

Po transformaci byla ověřena přítomnost namnožených plazmidů v bakteriálních buňkách pomocí PCR (Obr. 4).



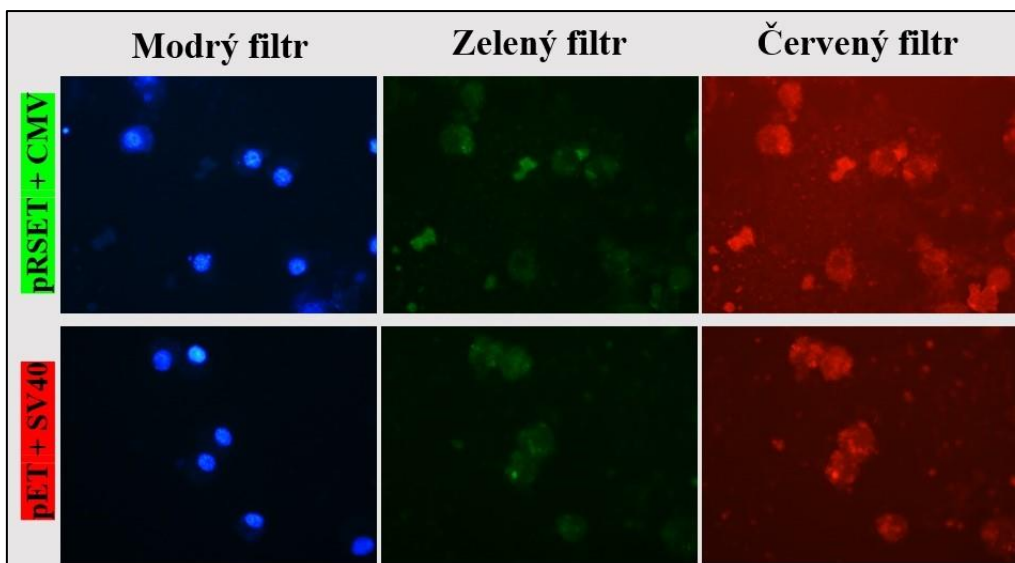
Obrázek 4: Agarózová elektroforéza PCR fragmentů mRFP+SV40 amplifikovaných s použitím specifických primerů při různých nasedacích teplotách.

Obdobně bylo provedeno ověření úspěšnosti transfekce klíčících buněk. Tento krok posloužil k optimalizaci prováděné elektroporace. Zjistilo se, že nejúčinněji probíhala elektroporace při 500 V. Elektroporace byla tedy provedena podruhé, za stejných podmínek, jen s rozdílným napětím, které bylo 250 V a 500 V (Obr. 5).



Obrázek 5: PCR reakce s DNA izolovanou z ISE6 buněk, které byly transfekovány pRSET+CMV a pET+SV40.

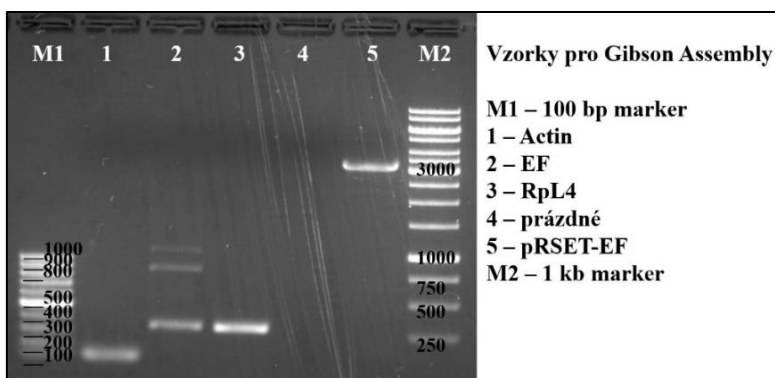
Po následné kontrole buněk pod fluorescenčním mikroskopem bylo však zjištěno, že použití elektroporace jako nástroje pro transfekci klíčících buněk se nejeví jako vhodná metoda, jelikož nebyl detekován fluorescenční signál (Obr. 6).



Obrázek 6: Fotografie transfekovaných buněk pořízené fluorescenčním mikroskopem. U buněk transfekovaných plazmidem pRSET+CMV byl očekáván specifický signál proteinu GFP při použití zeleného filtru, u buněk transfekovaných plazmidem pET+SV40 signál proteinu RFP při použití červeného filtru.

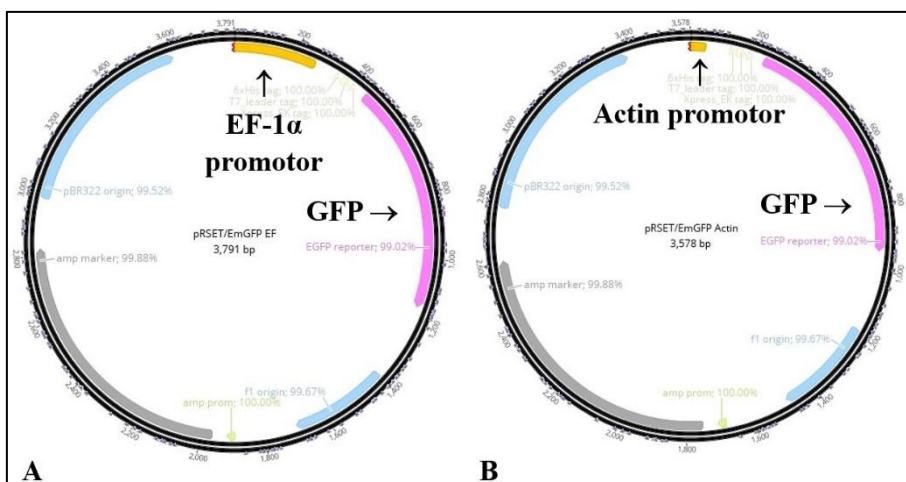
4.2 Transfekce klíčící buněčné linie ISE6 a IRE/CTVM19 (pRSET+EF-1 α , pRSET+RpL4, pRSET+Actin)

Před započítím Gibson Assembly byla provedena PCR jednotlivých fragmentů. Výsledek je vyobrazen na Obr 7. Byly získány fragmenty očekávané délky, takže se provedla Gibson Assembly a následně transformace bakteriálních buněk.

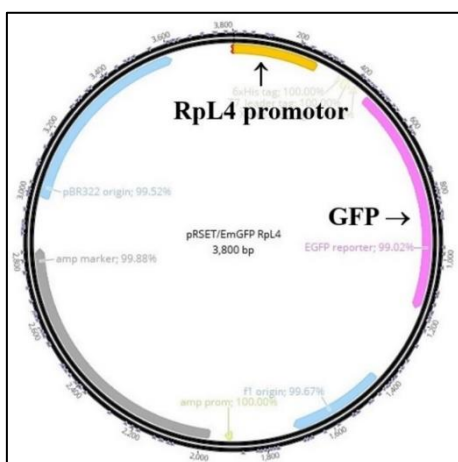


Obrázek 7: Elektroforetická separace PCR fragmentů určených pro Gibson Assembly protokol.

Obrázky 8 a 9 obsahují vizualizaci plazmidů pRSET+EF-1 α , pRSET+RpL4 a pRSET+Actin.

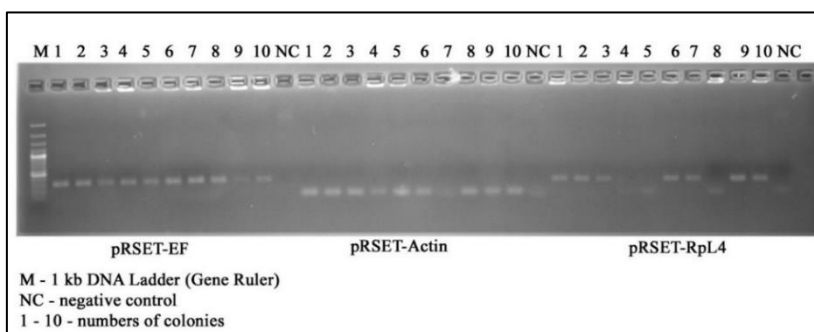


Obrázek 8: **A:** Plasmid pRSET+EF-1 α s reportérovým genem GFP pod promotorem EF-1 α navrhnutý v programu Geneious. **B:** Plasmid pRSET+Actin s reportérovým genem GFP pod aktinovým promotorem navrhnutý v programu Geneious.



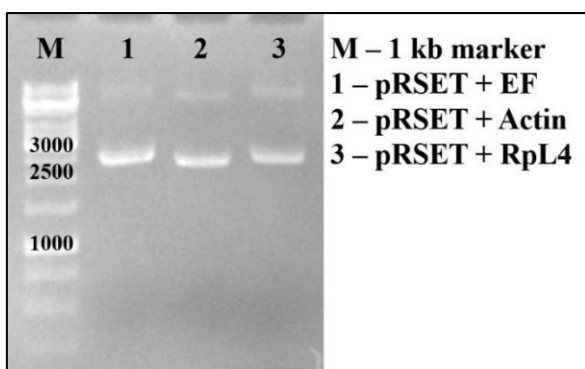
Obrázek 9: Plasmid pRSET+RpL4 s reportérovým genem GFP pod promotorem RpL4 navrhnutý v programu Geneious.

S plazmidy byla provedena úspěšná transformace bakteriálních buněk, která se ověřila pomocí colony PCR, jejíž výsledek je na Obrázku 10.



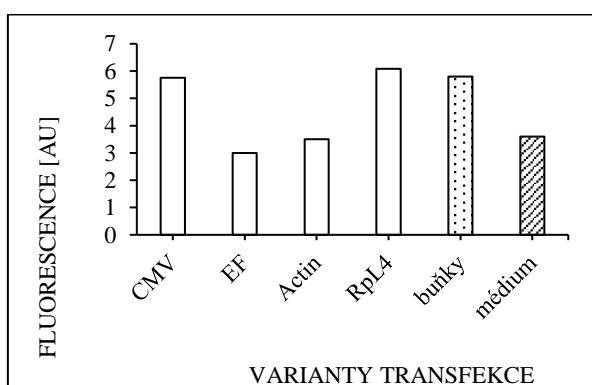
Obrázek 10: Výsledky elektroforetické analýzy vybraných kolonií na přítomnost inzertů v plazmidu pRSET.

Po transformaci byla provedena izolace plazmidů z bakteriálních buněk a jejich velikost jsme se ověřila pomocí agaróзовé elektroforézy (Obr. 11). Velikost jednotlivých plazmidů odpovídala očekávané velikosti pro jejich superspiralizované formy.



Obrázek 11: Fotografie gelu s plazmidy izolovanými z bakteriálních buněk po transfekci.

Pro transfekci byla použita reagentie PolyJet. Nebyla zde však viditelná zvýšená fluorescence, což můžeme vyčíst z grafu na Obrázku 12, kde jsou zaznamenány jednotlivé hodnoty měření fluorescence.

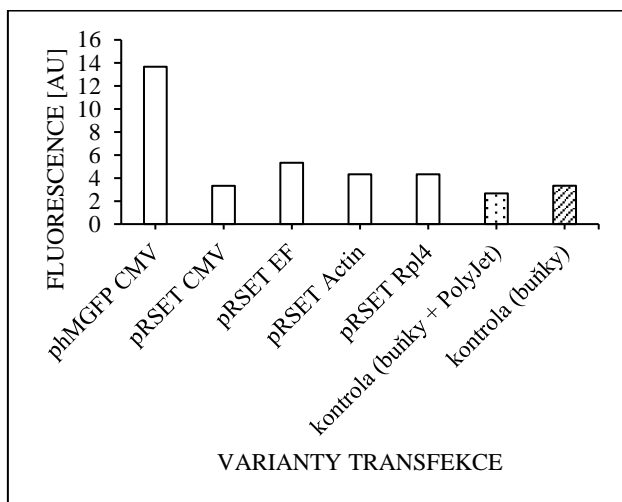


Obrázek 12: Graf znázorňující fluorescenci vykazovanou transfekovanými klíčecími buňkami. Zobrazeny jsou i hodnoty fluorescence média (médium) a netransfekovaných buněk (buňky).

Jako kontroly pro transfekci byly použity netransfekované buňky v médiu a samotné médium. Buňky transfekované jednotlivými plazmidy vykazovali téměř stejnou fluorescenci jako kontroly nebo dokonce nižší (Obr. 12). Lze tedy usoudit, že v transfekovaných buňkách neprobíhala exprese fluorescenčního proteinu.

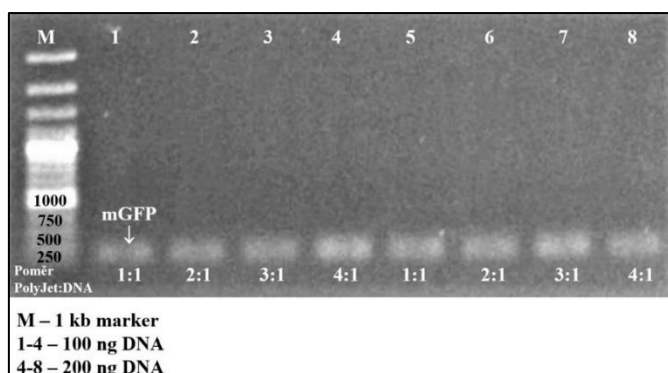
4.3 Transfekce lidské buněčné linie DAOY

Pomocí PolyJetu byla provedena kontrolní transfekce lidské buněčné linie DAOY. K transfekci byly použity plazmidy phMGFP+CMV, pRSET+CMV, pRSET+EF, pRSET+Actin, pRSET+RpL4. Transfekce lidských buněk nám ukázala, že naše pozitivní kontrola plazmid phMGFP+CMV má největší fluorescenční signál (Obr. 13). Pro kontrolu byl transfekován plazmid phMGFP do klíčtčích buněk IRE19, kde ale nebyla viditelná žádná fluorescence.



Obrázek 13: Graf znázorňující fluorescenci vykazovanou lidskými buňkami transfekovanými plazmidy phMGFP+CMV, pRSET+CMV, pRSET+EF, pRSET+Actin, pRSET+RpL4.

Následně byla provedena PCR reakce s primery pro mGFP. Podle elektroforézy se mGFP v buňkách nacházel, nicméně nebyla pozorována žádná fluorescence, což znamená, že CMV promotor v klíčtčích buňkách pravděpodobně nefunguje (Obr. 14).



Obrázek 14: Výsledky elektroforetické analýzy na přítomnost plazmidu phMGFP+CMV v transfekovaných klíčtčích buňkách.

5 DISKUSE

V rámci mé práce jsem se zabývala promotory, které by měly být schopny vést genovou expresi v klíštěcích buňkách. Výsledky mých pokusů však nepotvrdili funkčnost zvolených promotorů v klíštěcích buněčných liniích ISE6 a IRE/CTVM19. Důvodem mohla být špatná volba promotorů. CMV a SV40 promotory jsou lidské virové promotory, a tudíž se dá předpokládat, že nemusí být funkční u členovců. Navíc Tuckow a kol. (2015) tvrdí, že tyto virové promotory byly v klíštěcích buněčných liniích *R. microplus* slabé a nehodí se tedy pro experimenty, které vyžadují rychlejší a silnější expresi proteinů (Tuckow a kol., 2015).

V člancích, o které se opírala má práce, však bylo více rozdílů. Například Esteves a kol. (2008), Machado-Ferreira a kol. (2015) a Tuckow a kol. (2015) používali pro své experimenty jiné buněčné linie než já, což by mohlo být jedním z důvodů, proč jsem neobdržela pozitivní výsledky. Dále autoři článků používali transpozony (Kurti a kol., 2008; Esteves a kol., 2008) a rozdílné expresní vektory. Dalším rozdílem byly reportérové geny, já jsem použila GFP a mRFP. Esteves a kol. (2008), Kurti a kol. (2008) a Narajno a kol. (2013) použily jako reportérový gen DsRed2, Kurti a kol. (2008) použil navíc jako reportér neomycin fosfotransferáza-rezistentní gen. Tuckow a kol. (2015) využil dual-luciferase systému a Machado-Ferreira a kol. (2015) použil zelený fluorescenční protein. GFP a mRFP jsou však obvykle použitelné ve velké škále buněk (Remington, 2011; Heppert a kol. 2016).

Dále jsem transfekovala klíštěcí buněčné linie ISE6 a IRE/CTVM19 plazmidy pRSET+EF-1 α , pRSET+RpL4, pRSET+Actin. Tyto klíštěcí promotory byly zvoleny kvůli tomu, že se jedná o promotory genů, které se běžně vyskytují v mnoha buněčných liniích. Tuckow a kol. (2015) pro svojí studii také použil promotory pro geny EF-1 α a RpL4, právě z toho důvodu, že jejich exprese probíhá napříč všemi stádii *R. microplus*. Jeho práce také uvádí, že EF-1 α a RpL4 promotory byly úspěšně použity pro vedení genové exprese dvou rozdílných luciferázových proteinů. V mém případě byly promotory pro geny EF-1 α , RpL4 a Actin identifikované přímo z genomu *I. scapularis*, tudíž lze předpokládat, že právě tyto promotory jsou funkční. Dle našich výsledků však nebyly.

Celkem jsem vyzkoušela dva druhy transfekce. V obou případech byla transfekce úspěšná, což bylo dokázáno provedením PCR reakce. Transfekce pomocí PolyJetu je však více účinnější než elektroporace. Elektroporace využívá pro transfekci elektrický proud. PolyJet je na chemické bázi, a proto je šetrnější k buňkám a jednodušší na manipulaci. Avšak PolyJet je určen především pro savčí buňky. Vhodná transfekční činidla pro klíštěcí buněčné

linie popsal ve své práci Barry a kol. (2013). Jako nejvhodnější se jeví Lipofectamine 2000 a XtremeGENE. Kurtti a kol. (2008) například ve své práci použil k transfekci Effectene reagent, bez něhož neproběhla exprese fluorescenčního proteinu.

Abych se přesvědčila, zdali funguje mnou zvolená metoda transfekce, rozhodla jsem se transfekovat lidskou buněčnou linii DAOY. Transfekce byla provedena se stejnými plazmidy jako transfekce klíštěcích buněk, navíc byl použit plazmid phMGFP+CMV. Reakce probíhala pomocí PolyJetu. V lidských buňkách plazmid phMGFP vykazoval nejvyšší fluorescenci, ale v klíštěcích buňkách jsme nepozorovali žádné změny ve fluorescenci. Nicméně po provedení PCR reakce byl v klíštěcích buňkách přítomný mGFP. Zjistili jsme tedy, že plazmid phMGFP je funkční, kdežto ostatní plazmidy ne. Je tedy možné, že na mé výsledky mohla mít vliv i nevhodná konstrukce plazmidů. Pro budoucí pokusy jsem se tedy rozhodla použít jako kostru plazmid phMGFP.

Takto byly optimalizovány podmínky transfekce klíštěcích buněk a vyzkoušeny rozdílné plazmidy. Tyto poznatky mohou být využity pro budoucí práci s plazmidem phMGFP a promotory EF-1 α a RpL4.

6 ZÁVĚR

- Pro transfekci buněčných linií ISE6 a IRE/CTVM19 byly použity plazmidy s promotory pro CMV, SV40, gen EF-1 α , gen Actin a gen RpL4.
- Bylo zjištěno, že v porovnání s elektroporací je PolyJet vhodnější metodou pro transfekci klíštěcích buněk.
- U žádného z používaných plazmidů nebyly po transfekci klíštěcích buněk pozorovány viditelné změny fluorescence.
- Lidská buněčná linie DAOY a plazmid phMGFP byly použity jako pozitivní kontrola pro transfekci pomocí PolyJetu.
- Plazmid phMGFP který je vhodný pro vedení proteinové exprese v eukaryotických buňkách bude použit jako kostra pro přípravu expresních vektorů pro klíštěcí buňky.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALBERTS, Bruce, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin RAFF, Keith a Peter WALTER, 2002. Molecular biology of the cell. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, s. 306. ISBN 0-81-53-4072-9.

BARRY, Gerald, Pilar ALBERDI, Esther SCHNETTLER, Sabine WEISHEIT, Alain KOHL, John K. FAZAKERLEY a Lesley BELL-SAKYI, 2013. Gene silencing in tick cell lines using small interfering or long double-stranded RNA. *Experimental and Applied Acarology*. **59**(3), 324.

BELL-SAKYI, Lesley, Erich ZWEYGARTH, Edmour F. BLOUIN, Ernest A. GOULD a Frans JONGEJAN, 2007. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends in Parasitology*. **23**(9), 450-457.

BOWMAN, Alan a Patricia NUTTAL, 2008. *Ticks: Biology, disease and control*. New York: Cambridge University Press. ISBN 9780521867610.

CLARK, David a Nanette PAZDERNIK, 2016. Biotechnology. *Biotechnology*. Second edition. Boston: Elsevier/AP Cell, Academic Cell is an imprint of Elsevier, s. 335-363. ISBN 978-0-12-385015-7.

CLARK, David P. a Nanette J. PAZDERNIK, c2013. CLARK, David P. a Nanette J. PAZDERNIK. *Molecular biology: [academic cell]*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, s. 221. ISBN 978-0-12-378594-7.

ESTEVEES, Eliane, Flavio A. LARA, Daniel M. LORENZINI, et al., 2008. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell line (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **38**(5), 568-580.

FRANCISCHETTI, I. M. B., Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood*. **99**(10), 3602.

FRANCISCHETTI, Ivo, M.B, A. SA-NUNES, B. J. MANS, I. M. SANTOS a J. M. RIBEIRO, 2009. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience*. **14**, 2051-2052.

- GIBSON, Daniel G, Lei YOUNG, Ray-Yuan CHUANG, J Craig VENTER, Clyde A HUTCHISON a Hamilton O SMITH, 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*. **6**(5), 343-345.
- GLICK, Bernard R., Jack J. PASTERNAK a Cheryl L. PATTEN, c2010. *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. 4th ed. Washington, DC: ASM Press, s. 240. ISBN 978-1-55581-498-4.
- HAJDUŠEK, Ondřej, Radek ŠÍMA, Nieves AYLLÓN, Marie JALOVECKÁ, Jan PERNER, José DE LA FUENTE a Petr KOPÁČEK, 2013. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **3**, 1-2.
- HEPPERT, Jennifer K., Daniel J. DICKINSON, Ariel M. PANI, et al., 2016. Comparative assessment of fluorescent proteins for *in vivo* imaging in an animal model system. *Molecular Biology of the Cell*. **27**(22), 3385-3394.
- KODÍČEK, Milan, 2004. KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, s. 21. ISBN 80-7080-551-x.
- KURTTI, Timothy J., Joshua T. MATTILA, Michael J. HERRON, et al., 2008. Transgene expression and silencing in a tick cell line: A model system for functional tick genomics. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **38**(10), 963-968.
- LODISH, Harvey, David BALTIMORE a Arnold BERK, 1997. Molecular cell biology. *Molecular cell biology*. 3. ed., 4. print. New York: Scientific American Books, s. 252. ISBN 0716723808.
- MACHADO-FERREIRA, Erik, Emilia BALSEMÃO-PIRES, Gabrielle DIETRICH, et al., 2015. Transgene expression in tick cells using *Agrobacterium tumefaciens*. *Experimental and Applied Acarology*. **67**(2), 269-287.
- NARANJO, Victoria, Nieves AYLLÓN, José M. PÉREZ DE LA LASTRA, et al., 2013. Reciprocal regulation of NF- κ B (Relish) and Subolesin in the tick vector, *Ixodes scapularis*. *PLoS ONE*. **8**(6): e65915, 1-11.
- NAVA, Santiago, Alberto A. GUGLIELMONE a Atilio J. MANGOLD, 2009. An overview of systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience*. **2009**(February), 2858.
- REMINGTON, S. James, 2011. Green fluorescent protein: A perspective. *Protein Science* [online]. **20**(9), 1513.

SAMBROOK, Joseph a David W. RUSSELL, c2001. SAMBROOK, Joseph a David W. RUSSELL. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 16.33-16.36. ISBN 0879695773.

SONENSHINE, Daniel E. a R. Michael ROE, 2014. *Biology of ticks*. 2nd ed. New York: Oxford University Press. ISBN 978-019-9744-053.

ŠIMO, Ladislav, Maria KAZIMIROVA, Jennifer RICHARDSON a Sarah I. BONNET, 2017. The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **7**:281, 1-7.

TUCKOW, A. P. a K. B. TEMEYER, 2015. Discovery, adaptation and transcriptional activity of two tick promoters: Construction of a dual luciferase reporter system for optimization of RNA interference in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cell lines. *Insect Molecular Biology*. **24**(4), 454-466.