

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Diferenciální exprese transkriptů slinných žláz klíštěte
Ixodes ricinus

Bakalářská práce

Sára Kropáčková

Školitel: Jan Perner, Ph.D.

České Budějovice 2019

Kropáčková S., 2019: Diferenciální exprese transkriptů slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*. [Analysis of differentially expressed transcripts in the tick salivary glands from *Ixodes ricinus*. Bc. Thesis, in Czech] – 56 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Annotation: Ticks are using different mechanisms for host immune system suppression. In this thesis, I compared ten transcripts from ticks salivary glands, which are differentially expressed during feeding on live animal and artificial systems. Further, a tick protein anticomplement 1, AC1, was chosen and subjected to deeper investigation, because of the significant difference in expression during feeding. Serum with specific antibodies was made and AC1 expression levels were examined in nymphs and adults, during feeding on different hosts. Moreover, any potential interacting partners from host serum through covalent binding were tested. This study contributes to the understanding of regulation of expression and functional characterisation of tick salivary proteins.

Prohlašuji, že svoji 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 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 dne

.....
Sára Kropáčková

Poděkování:

Děkuji svému školiteli Honzovi Pernerovi za jeho trpělivost, čas a odborné rady. Ráda bych poděkovala Petru Kopáčkovi za přijetí do jeho laboratoře, ve které mi dovolil učit se laboratorním metodám a umožnil mi pracovat na zajímavých experimentech. Děkuji také Honzovi Kotálovi za množství cenných rad a dohled v nepřítomnosti školitele. Dále bych ráda poděkovala členům laboratoře za výbornou atmosféru a ochotu mi kdykoliv poradit. Velké díky patří také mé rodině, mému příteli a přátelům.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární rešerše.....	2
2.1. Klíšťata	2
2.1.1. Klíšťe obecné (<i>Ixodes ricinus</i>).....	2
2.1.2. Přenos patogenů a jimi způsobené nemoci	3
2.1.3. Klíšťecí sliny.....	3
2.2. Hostitelská imunita a komplement	4
2.2.1. Komplementový systém.....	4
2.3. Klíšťecí antikomplement	5
2.3.1. Mechanismy klíšťecí antikomplementové aktivity.....	6
2.3.2. Využití antikomplementu při výzkumu vakcín.....	7
2.4. Antikomplement u ostatních členovců	7
2.5. Dysfunkce antikomplementu	8
2.6. Využití slinných proteinů členovců	8
3. Cíle práce.....	10
4. Materiály a metody.....	11
4.1. Získání klíšťat a odebírání tkání	11
4.2. Izolace totální tkáňové RNA a syntéza cDNA	11
4.3. Ověření diferenciální exprese transkriptů slinných žláz pomocí qPCR	11
4.4. Amplifikace a izolace genu pro expresi rekombinantního proteinu	13
4.5. Klonování a izolace plazmidové DNA	13
4.6. Pilotní exprese rekombinantu AC1	15
4.7. Western blot.....	15
4.8. Afinitní purifikace rekombinantního AC1 přes his-tag	16
4.9. Specifické proteolytické odštěpení tagů z rekombinantního AC1.....	17
4.10. Purifikace rekombinantu AC1 pomocí iontové chromatografie	17

4.11.	Produkce specifické protilátky	17
4.12.	Kovalentní interakce AC1 s hostitelskými proteiny	18
5.	Výsledky.....	20
5.1.	Ověření diferenciální exprese transkriptů slinných žláz pomocí qPCR	20
5.2.	Sekvenační alignment	21
5.3.	Amplifikace <i>ac1</i> z cDNA slinných žláz.....	22
5.4.	Ověření úspěšnosti klonování a transformace	23
5.5.	Pilotní exprese rekombinantu AC1 a western blot	24
5.6.	Afinitní purifikace rekombinantního AC1 přes his-tag	27
5.7.	Purifikace rekombinantu AC1 pomocí iontové chromatografie.....	28
5.8.	Identifikace rekombinantního proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie.....	29
5.9.	Produkce specifické protilátky.....	30
5.10.	Ověření exprese AC1 v nymfách	32
5.11.	Detekce proteinů ze slinných žláz pomocí séra z opakovaného sání.....	33
5.12.	Testování detekce AC1 pomocí séra z opakovaného sání	34
5.13.	Kovalentní interakce AC1 s hostitelskými proteiny	35
6.	Diskuze.....	40
7.	Závěr.....	43
8.	Seznam použité literatury.....	44
9.	Příloha	47

Seznam použitých zkratk

PBS	Phosphate buffered saline, Fosfátový pufr s 0,15 M NaCl
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleová kyselina
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerázová řetězová reakce
cDNA	Complementary DNA, Komplementární DNA
LB	Luria-Bertani medium (1% trypton, 0,5% kvasinkový extrakt, 0,5% NaCl, pH=7,0)
DNA	Deoxyribonucleic acid, Deoxyribonukleová kyselina
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis, Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
HRP	Horseradish peroxidase, Křenová peroxidáza
O/N	Overnight, Trvající přes noc
OD	Optical density, Optická hustota
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid

1. Úvod

Cílem této práce bylo ověření rozdílně exprimovaných transkriptů ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus*, při krmení krví s aktivní a neaktivní imunitou. Experimentální skupina klíšťat sála na živém králíkovi, kontrolní skupina byla krmena systémem umělého sání krví z králíka. Dalšímu zkoumání byl podroben klíštěcí antikomplementový protein AC1. Jeho rekombinantní forma byla exprimována v *Escherichia coli* jako fúzní protein se solubilizačním a purifikačním tagem. Dvoukrokovou purifikací byl získán protein o dostatečné čistotě pro imunizační účely. Následně bylo získáno specifické anti-sérum detekující protein AC1. Pomocí této imunodetekce byly provedeny kvantifikační western blot analýzy s nymfami klíšťat a dospělými klíšťaty, která sála na různých hostitelích. Dále jsme vychytávali kovalentně vazebné proteiny z krevní plazmy hostitele pomocí proteinu AC1. Závěrem, byla ověřena přirozená imunogenicita proteinu AC1 pomocí séra z králíka, na němž opakovaně sála klíšťata.

2. Literární rešerše

2.1. Klíšťata

Klíšťatovci (Ixodida) jsou parazité z řádu roztoči (Acari) z kmene členovci (Arthropoda) vyskytující se po celém světě (Sonenshine, 1991). Klíšťatovci se dělí na dvě skupiny, tvrdá klíšťata (Ixodidae) a klíšťáky, neboli měkká klíšťata (Argasidae). Klíšťata tvrdá se dále dělí na Prostriata a Metastriata. Rozdíly mezi těmito dvěma skupinami jsou v morfologii, fyziologii i ontogenezi.

Klíšťata, živící se krví vyšších obratlovců, potřebují využívat tento zdroj bílkovin již od larválního stádia vývoje (Sonenshine, 1991). Na člověku ovšem parazituje nejčastěji, například u našeho nejčastějšího druhu *I. ricinus*, nymfální stádium nebo dospělé samice. Během sání klíšťete může dojít k přenosu patogenů z jednoho hostitele na jiného (Jongejan a Uilenberg, 2004). To činí klíšťata významnými vektory původců nemocí jako je například lymfská borelióza, klíšťová encefalitida, babezióza nebo ehrlichióza (Sonenshine, 1991).

2.1.1. Klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*)

Klíšťe obecné, které patří do prostriatní skupiny klíšťat, je jedním z typických ektoparazitů žijících v České republice. Živí se krví 2–3 hostitelů, jedním hostitelem v každém vývojovém stádiu (larva-nymfa-dospělec) s výjimkou vajíček a dospělých samců. Dospělý samec má, na rozdíl od samičky, celé tělo kryté pevným štítkem, tvořeným kutikulou. Dospělé samičce překrývá štítek pouze třetinu hřbetu a je jí umožněno mnohonásobně zvětšit objem svého těla, čehož využívá při sání.

Klíšťecím největším orgánem je střevo, v němž dochází ke zpracování krve hostitele (Sonenshine, 1991). Trávení probíhá uvnitř střevních buněk (intracelulárně) a dochází během něj především k rozložení hemoglobinu a albuminu pomocí kombinace cysteinových a aspartátových proteáz (Sojka et al., 2013; Sojka et al., 2016). Dalším důležitým orgánem v těle klíšťete jsou slinné žlázy. Je to párový orgán složený ze sekrečních váčků (acinů), které produkují sliny. Klíšťecí sliny obsahují cement, kterým se klíšťe ukotvuje v kůži hostitele, protizánětlivé enzymy a různé molekulární inhibitory, usnadňující přijímání krve (Munderloh a Kurti, 1995). Právě střevo a slinné žlázy klíšťete jsou zásadní orgány v přenosu patogenů z klíšťete do hostitele.

2.1.2. Přenos patogenů a jimi způsobené nemoci

Klíšťata nabírají s krví velké množství vody, které se potřebují zbavit. Voda se vstřebává stěvnou a skrz slinné žlázy je vylučována zpět do hostitele. S vodou klíšťata vypouští také patogeny, např. spirochéty *Borrelia burgdorferi*, způsobující lymfskou boreliózu. Během sání se ve střevě klíštěte *Ixodes scapularis* množí spirochéty, které jsou schopné přesunout se do slinných žláz pozměněním projevu svých povrchových proteinů, poté jsou se slinami přeneseny do těla hostitele (Hovius et al., 2008). U klíštěte *I. ricinus* a spirochét *Borrelia afzelii* je přenos odlišný. V tomto případě je, oproti slinným žlázám, rozhodujícím orgánem klíštěcí střevo (Pospíšilová et al., 2019). Při přeměně klíštěte na vyšší vývojové stádium borrelie v těle klíšťat zůstávají, ovšem přenos není možný z dospělé samice do vajíček. V tomto případě tedy larvy klíšťat nejsou nebezpečím nákazy (Radolf et al., 2012; Hovius et al., 2007).

Patogenem klíšťové encefalitidy je virus. Klíště je hlavním přenašečem ve střední Evropě. K přenosu na klíšťata dochází transovariálně, z infikované dospělé samice do vajíček, nebo z mezihostitelů, nejčastěji drobných savců, na klíště (Dörrbecker et al. 2010). K přenosu může dojít také z klíštěte na klíště při společném sání ze stejného místa. V tomto případě nemusí dojít k nakažení hostitele (Labuda et al., 1993). Člověk se může nakazit také při konzumaci neošetřených mléčných produktů ze zvířat, která jsou nakažená (Mansfield et al., 2009). Mezi další, méně častá, klíšťaty přenášená onemocnění patří ehrlichioza, jejímž původcem je bakterie *Anaplasma phagocytophilum*, babezióza a další. Zejména *Babesia divergens* a *Babesia microti* způsobují u člověka závažné onemocnění, připomínající malárii (Mosqueda et al., 2012).

2.1.3. Klíštěcí sliny

Sliny krevsajících členovců obsahují, jak proteinové, tak i neproteinové, bioaktivní látky, které sekretují do hostitele během sání. Tyto látky jsou např. antikoagulanty, snižující srážlivost krve, vasodilatanty, rozšiřující cévy, a látky zabraňující shlukování krevních destiček. Těmito vlastnostmi látky zabraňují srážení krve, v místě vpichu, čímž je parazitovi usnadněno sání (Ribeiro, 1995). Klíštěcí sliny navrch obsahují látky regulující zánět v hostitelově těle a potlačující vrozenou i získanou imunitu (Wikel, 1996). V klíštěcích slinách jsou proteiny, cílící na aktivní místo enzymů, které jsou často součástí různých enzymových kaskád, jako např. srážení krve nebo komplement (Francischetti et al., 2009). Další skupinou látek, obsažených v klíštěcích slinách jsou inhibitory cílící na místa mimo

aktivního místa enzymu. Cílením mimo aktivní místo enzymu naruší spojení komplexu a potlačí jeho aktivaci. Do této skupiny inhibitorů patří například komplementový inhibitor OMCI, který cílí kromě alternativní cesty i na klasickou cestu aktivace komplementu, z klíštěte *Ornithodoros moubata* a RaCI z *Rhipicephalus appendiculatus* (Nunn et al., 2005; Jore et al., 2016). Všechny zmíněné látky jsou pro klíště, které saje krev z hostitele několik dní v kuse, velmi důležité.

Klíšťata dále zasahují do hostitelových imunoregulačních a efektorových drah. Ty zahrnují buňky prezentující antigen, T a B buňky, cytokiny, granulocyty, komplement a další biologicky aktivní molekuly. Touto cestou klíšťata utlumují hostitelovu imunitu (Wikel a Bergman, 1997). Mnohé klíštěcí slinné složky jsou členy rozšířených multigenových rodin, jako například lipokaliny, cystatiny, ixostatiny nebo metaloproteázy (Francischetti et al., 2009). Tyto proteiny jsou exprimovány různou intenzitou během sání klíštěte (Kotsyfakis et al., 2015; Schwarz et al., 2013). Některé klíštěcí geny mají ve slinných žlázách při sání na živém hostiteli, s aktivní imunitní odpovědí, mnohonásobně vyšší expresi (Tab. 1) než při sání krve z uměle vytvořených krmítek, kdy je krev imunitně neaktivní (Perner et al., 2018).

2.2. Hostitelská imunita a komplement

Imunitní systém savců se dělí na dvě základní větve, specifickou a nespecifickou imunitu. Nespecifická imunita je vrozená, zasahuje stejně proti všem typům cizorodých částic a nemá imunologickou paměť. Specifická imunita je získávána během života, při styku a antigenem, je specifická, rozpoznává antigeny a přizpůsobuje jim reakci, a má imunologickou paměť, při opětovném setkání s antigenem je protiakce rychlejší. Základními výkonnými složkami, první zmíněné, nespecifické imunity jsou fyzikální bariéry organismu, bazofily, makrofágy a komplementový systém.

2.2.1. Komplementový systém

Komplement, složka humorální imunity, obsahuje zhruba 30 membránových a sérových proteinů. Doménou komplementu jsou sérové proteiny C1–C9. Jsou to rozpustné proteiny a glykoproteiny, produkovány převážně hepatocyty, které se nacházejí v krvi v inaktivní formě. K aktivaci komplementového systému může dojít třemi způsoby. Prvním způsobem je klasická cesta, kdy je komplement aktivován imunitním komplexem, navázáním protilátky na antigen. Druhým způsobem je cesta alternativní, při níž dochází k aktivaci pomocí molekul na povrchu bakterií. A třetí variantou je lektinová cesta, kdy dojde k rozpoznání sacharidu na povrchu patogenu přes manózu, která váže lektin, nebo

skupinou fikolinů (Matsushita et al., 2001). Všechny cesty aktivace tvoří enzymové komplexy C3 konvertáza, která štěpí molekulu C3 na C3a a C3b podjednotky, a C5 konvertáza, která štěpí vytvořenou C5 molekulu na C5a a C5b podjednotky. C5 konvertáza vzniká při vzniku vazby C3b molekuly s C3 konvertázou.

Tyto proteiny interagují nejen mezi sebou, zároveň mohou spolupracovat i s jinými imunitními dráhami. Komplement se však uplatňuje jen při zánětlivých reakcích, během nichž se, rozšířenými cévami, do místa infekce dostává větší množství komplementových molekul. Protein C3, aktivovaný pomocí serinových proteáz, plní důležitou roli nasednutím na povrch mikrobu nebo imunního komplexu, čímž ho označí k fagocytóze. Následně se také, kaskádovitým efektem, postupně zapojují další části komplementu způsobující například opsonizace a chemotaxi leukocytů (Smith et al., 1999). Výsledkem kaskády komplementu je MAC (Membrane attack complex, Komplex napadající membránu), proteinový komplex narušující membrány parazitických mikroorganismů. MAC napadené membrány proděraví, čímž dojde k lýzi buňky (Hořejší a Bartůňková, 2001).

2.3. Klíčtější antikomplement

Klíště je svými slinami schopné inhibovat každou ze tří drah aktivace komplementu, což je klíčové při jeho sání na hostiteli. Jedna hypotéza tvrdí, že je rozsah hostitelů dán schopností klíčtějších slin potlačovat alternativní cestu komplementu těchto druhů (Lawrie et al., 1999). V roce 2000 byl ze slin klíšete *I. scapularis* purifikován antikomplementový protein Isac, u něhož byly zjištěny inhibiční schopnosti (Valenzuela et al., 2000). Isac reguluje alternativní cestu tím, že zabráňuje navázání se plazmatického faktoru B na C3b komplementový protein. Tyto proteiny inhibují alternativní cestu komplementu zrychlením rozpadu C3 konvertázy (Valenzuela et al., 2000; Daix et al., 2007). Vytěsněním properidinu dojde k rozpadu C3 konvertázy, a tím k inhibici alternativní cesty komplementu (Tyson et al., 2008). Přestože properidin není aktivní složkou C3 konvertázy, je nezbytný pro stabilizaci a plnou aktivitu konvertázy (Fearon a Austen, 1975). U proteinu Isac nebyly objeveny žádné podobné vlastnosti s dříve popsány antikomplementovými molekulami. Později byly popsány homologní sekvence cDNA izolované ze slinných žláz klíšat *I. scapularis* a *Ixodes pacificus* (Ribeiro et al., 2006). A následně byly popsány i dva Isac homology z klíšete *I. ricinus*, nazvané IRAC I a IRAC II (*I. ricinus* anti-complement protein), které inhibují alternativní cestu komplementu stejným mechanismem jako dříve popsáný Isac.

Tyto proteiny jsou exprimované ve slinných žlázách klíštěte a exprese se zvyšuje během sání klíštěte (Daix et al., 2007). Během vývoje IRAC I a II došlo k diverzifikaci molekulových inhibitorových aktivit, které získaly schopnosti účinkovat proti komplementům různých hostitelských druhů (Schroeder et al., 2007). U klíštěte *I. scapularis* jsou popsány rozdíly v expresi tohoto proteinu při sání klíšťat na myších a morčatech (Narasimhan et al., 2019).

Salp20, *I. scapularis* salivary protein 20, patří do antikomplementové proteinové rodiny klíštěcích slinných proteinů, které také inhibují alternativní dráhu komplementu. Salp20 se váže místo properidinu na C3 konvertázu. Salp20 je stejně jako Isac a IRAC I a II členem ILP (Isac-like protein) rodiny (Ribeiro et al., 2006; Tyson et al., 2007). Je pravděpodobné, že všechny proteiny z této rodiny interagují právě s properidinem (Tyson et al., 2008).

2.3.1. Mechanismy klíštěcí antikomplementové aktivity

Není jasné, zda všechny druhy klíšťat využívají stejné antikomplementové mechanismy a pokud ano, zda používají i stejné molekuly (Lawrie et al., 1999). Mechanismy antikomplementové činnosti jsou ve srovnání s jinými oblastmi imunologie relativně málo studované. Přitom je jejich pochopení, v případě, že chceme antikomplement využívat jako druh terapie, nezbytnou součástí (Lawrie et al., 2005).

Při prvních pokusech zkoumání antikomplementu byl protein purifikován z klíštěcích slin druhu *I. scapularis*. Klíšťatům byly odebrány sliny, přičemž slinění bylo vyvoláno pilokarpinem. Následně byl ze slin purifikován antikomplementový protein. Tento protein byl dále použit na pokus, kdy byla měřena jeho aktivita při klasické a alternativní cestě aktivace komplementu, s použitím králičích erytrocytů. Byl potvrzen vliv antikomplementového proteinu na alternativní dráhu aktivace komplementu. U klasické dráhy nebyl zjištěn vliv klíštěcího antikomplementu na spouštění komplementové kaskády (Valenzuela et al., 2000).

Později bylo dokázáno, že i antikomplementové proteiny z *I. ricinus* (IxAC) inhibují alternativní dráhu komplementu, ale ne dráhu klasickou. Experimenty také ukázaly, že inhibice alternativní dráhy komplementu v lidském séru probíhá u všech 7 rekombinantních paralogů IxAC proteinů podobně. IxAC proteiny mají mezi sebou podobné mechanismy skládání proteinu a terciární struktury. Účinek IxAC proteinů, bránících vazbě properidinu s C3 složkou komplementu, může být vysvětlen sníženou stabilitou C3 konvertázy v důsledku blokování properidinu (Couvreur et al., 2008).

2.3.2. Využití antikomplementu při výzkumu vakcín

Proti ektoparazitům, jako jsou klíšťata, je možné použít dva typy vakcín, které používají antigeny buď „skryté“ nebo „vystavené“ imunitnímu systému během jeho napadení. Vakcína používající „skryté“ antigeny je již komerčně dostupná. Spoléhá se na antigen Bm86, střevní na membránu vázaný protein z klíštěte *Rhipicephalus microplus* (Willadsen et al., 1989). Tato vakcinace způsobuje, komplementem indukované, poničení stěn klíštěcího střeva, čímž dochází k prosakování nasáté krve do tělní dutiny. To způsobuje smrt klíštěte nebo snížení schopnosti rozmnožit se (Rand et al., 1989). Vakcíny využívající „skryté“ antigeny mají dvě základní nevýhody. Poskytují pouze krátkodobou imunitní ochranu a při jejich použití nedochází k odpadnutí klíšťat z hostitele, čímž může nadále docházet k přenosu patogenů (Daix et al., 2007).

K vyvinutí protiklíštěcí vakcíny založené na antigenech „vystavených“ imunitnímu systému by mohl sloužit IRAC I a II. Tato vakcína by měla přerušit sání klíštěte krátce po jeho přísátí, a tím by se snížila pravděpodobnost přenosu patogenů. Dříve popsané případy rezistence hostitelů proti klíšťatům byly spojeny s alternativní cestou komplementového systému. Proto je důležité zaměřit se na blokování proteinů, které inhibují tuto část imunitního systému (Ribeiro, 1989; Lawrie et al., 1999). Bylo prokázáno, že IRAC molekuly jsou mezi prvními antigeny injikovanými do těla hostitele (Valenzuela et al., 2000). Vyvoláním vhodné odpovědi humorální imunity by mohlo dojít k neutralizaci IRAC molekul protilátkami, což by mohlo aktivovat původní alternativní dráhu komplementu. Kromě toho by vazba hostitelovy protilátky na IRAC mohla vytvořit imunitní komplexy, které by aktivovaly klasickou dráhu komplementu. Aktivace těchto dvou cest by měla vyvolat zánět, čímž by došlo k přerušení sání klíštěte (Daix et al., 2007).

2.4. Antikomplement u ostatních členovců

Aktivita antikomplementu byla objevena ve slinných žlázách dipter flebotomů (*Lutzomyia longipalpis*), jejichž sliny dokáží inhibovat klasickou i alternativní cestu aktivace komplementu (Cavalcante et al., 2003). Dále byl antikomplement prokázán u ploštic ze skupiny zákeřnicovití (podčeleď Triatominae), a to u druhů *Triatoma brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* a *Panstrongylus megistus*. Sliny těchto živočichů dokáží inhibovat klasickou cestu lidského komplementu (Barros et al., 2009). Dalším zajímavým antikomplementem je

protein objevený ve slinných žlázách komára *Anopheles albimanus*, který je významný vektor malárie ve Střední Americe. Nazývá se albicin a funguje na stejném principu jako např. ISAC (Mendes-Sousa et al., 2013). Stejně tak ve slinách mouchy tse-tse, přenášející původce spavé nemoci, *Trypanosoma brucei gambiense*, byly objeveny inhibitory serinových proteáz. U těchto proteinů byla nalezena homologie v aktivním místě s lidským komplementovým C1 inhibitorem, cystatinem G1. Dále bylo zjištěno, že při snížení exprese těchto genů, dochází ke snížení infekce trypanozomou. Parazit, v tomto případě, využívá fyziologii mouchy tse-tse k rozšíření šancí na svůj přenos (Ooi et al., 2015). Antikomplement je důležitou složkou slin krevsajících členovců.

2.5. Dysfunkce antikomplementu

Narušením normálního fungování některé ze složek komplementu, poškozením tkání, nebo střetnutím s tělu cizími povrchy, může dojít k nadměrné aktivaci komplementu. Rozrušení komplementové rovnováhy zvýšenou produkcí efektorových molekul může dojít k ovlivnění celého imunitního systému a přispívat k autoimunitním a zánětlivým poruchám.

Lidské onemocnění, hemolytický uremický syndrom, způsobuje mutace genu faktoru H, která vede k narušení aktivity C3 konvertázy. Dochází k poškození cévního endotelu a ukládání fibrinu uvnitř cév (Botto et al., 2009). K paroxysmální noční hemoglobinurii dochází, pokud je u regulátorů komplementu, CD59 a DAF, snížena exprese, z důvodu mutace na genu PIG-A. Výsledkem je, komplementem vyvolaná, mohutná lýze červených krvinek a následná hemolytická anémie. Bílé krvinky jsou také citlivé na lýzi buněk a tkáňový faktor z těchto poškozených buněk může přispět k trombóze (Liebman a Feinstein, 2003). V poslední době je čím dál více úsilí věnováno navrhování terapeutik, cílících na proteiny komplementu. Jednou z hlavních překážek je nedostatečné porozumění molekulárním mechanismům, které se podílí na komplementem zprostředkovaném boji proti patogenům (Ricklin a Lambris, 2007).

2.6. Využití slinných proteinů členovců

Na využití proteinů ze slin členovců v lidské terapii se již pracuje. Někteří členovci exprimují ve svých slinách několik biologicky aktivních proteinů, které mohou hostiteli pomáhat s ředěním krve. Například protein EV131 je využitelný při léčbě astmatu. Podávání aerosolu EV131 potlačovalo hyperreaktivitu dýchacích cest. Navíc dokáže EV131

vychytávat histamin, což by mohlo pomoci při léčbě alergických onemocnění (Weston-Davies et al., 2005).

OMCI (*Ornithodoros moubata* Complement Inhibitor), také označovaný jako EV576 nebo Coversin, je protein objevený ve slinách klíštěte *O. moubata*. Pomáhá klíštěti přijímat potravu potlačením imunitní obrany v těle hostitele (Nunn et al., 2005). Coversin je inhibitor komplementu, působící na C5 složku, čímž zabraňuje tvorbě MAC. Coversin nepůsobí na C3 složku komplementu (Hepburn et al., 2007). Vývojem Coversinu se zabývá biofarmaceutická společnost Akari Therapeutics, která testuje jeho účinky u pacientů s paroxysmální noční hemoglobinurií a trombotickou mikroangiopatií. Trombotická mikroangiopatie je syndrom charakterizovaný rozpadem erytrocytů v krvi, sníženým množstvím krevních destiček a poruchami mikrocirkulace krve (Nangaku et al., 2007). Trombotická mikroangiopatie je jedna z možných komplikací při transplantaci hematopoetických kmenových buněk (George et al., 2004). Jediným schváleným lékem pro paroxysmální noční hemoglobinurii a trombotickou mikroangiopatii je Soliris, který má stejný mechanismus účinku jako Coversin. Nevýhodou Solirisu je subkutánní aplikace (injekce), kterou musí provádět zdravotnický pracovník. Coversin se již ukázal jako účinný při jeho použití na zvířecích modelech (Kuhn et al., 2016).

3. Cíle práce

- ověřit různě exprimované transkripty z transkriptomové analýzy slinných žláz klíšťat *I. ricinus*, která sála *in vitro* x *in vivo*, pomocí RT-qPCR
- heterologní exprese rekombinantního „antikomplementového“ proteinu (IrAC1)
- purifikace rekombinantního proteinu
- příprava specifických protilátek a imunodetekční experimenty

4. Materiály a metody

4.1. Získání klíšťat a odebrání tkání

Klíšťata *I. ricinus* pocházela z chovu Parazitologického ústavu Akademie věd České republiky, část byla nasbírána volně žijících v lesích v okolí Českých Budějovic. Nymfy a dospělé samice sály na živém zvířeti, králíkovi či morčeti, nebo byly krmeny uměle na membránách na umělém krmicím systému s kravskou či králičí krví (Kröber a Guerin, 2007). Tkáně slinných žláz byly vypitvány z nymf a dospělých samic pod stereomikroskopem (Zeiss) do resuspendačního pufru z kitu pro izolaci RNA (Macherey-Nagel). Při pitvě byly nástroje i pracovní místo ošetřeno pomocí RNaseZAP (Sigma-Aldrich).

4.2. Izolace totální tkáňové RNA a syntéza cDNA

Z pitvaných tkání byl vytvořen homogenát pomocí inzulinové jehly (29G) a podle protokolu firmy Macherey-Nagel byla ze vzorků izolována totální RNA. Tato RNA byla následně kvantifikována (ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop) a její integrita byla elektroforeticky ověřena na 1% agarózovém gelu. Jednovláknová cDNA byla syntetizována ze 100 ng vstupní RNA pomocí oligo-dT primerů podle Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit od firmy Roche.

4.3. Ověření diferenciální exprese transkriptů slinných žláz pomocí qPCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce, qPCR, byla použita pro analýzu relativního množství transkriptů ve vzorcích a porovnání genové exprese v klíštěcích tkáních. PCR reakce probíhala v teplotách a časech podle tabulky (Tab. 1) se specifickými primery (Tab. 2). Pro získání výsledků primární analýzy bylo provedeno měření na přístroji LightCycler 480 s programem Software release 1.5.0 SP4 (Roche), který zaznamenával Cp hodnoty metodou druhé derivace maxima s aritmetickou úpravou počáteční hodnoty pro určení bodu překročení stanoveného prahu fluorescence (Cp, crossing point).

Tab. 1: Teploty a délka jejich trvání při qPCR reakci. * postupné zvyšování o 5 °C.

Popis	Teplota	Trvání	Počet cyklů
Inkubace	95 °C	5 min	1
Denaturace DNA	95 °C	10 s	50
Annealing	58 °C	20 s	
Extenze	72 °C	10 s	
Křivka tání	95 °C	15s	1
	65 °C	1 min	
	97 °C + *	1 min	
Ochlazení	12 °C	∞	1

Tab. 2: Přehled specifických primerů použitých pro ověření diferenciální exprese transkriptů pomocí qPCR. Teplota pro nasedání primerů, annealing, je pro všechny primery 58 °C.

Název transkriptu	Forward primer	Reverse primer
Ir-249265	CGAGGCAAATATGTTCACTGG	CGCTCTTTAGTGGACCATCACC
Ir-SigP-242556	GGATATTTCTACGGGATCTAC	TATAACACCAACCACTTCTG
Ir-SigP-241765	CCACCGCTCACTTTACACAG	CGTAGCCACATCCCACACTT
Ir-261824	CGAAGAGTCTCGTCCTGTG	CAGTTATATTCGCCGTGC
Ir-226907	AACGGCGATCATAAAGTTCC	GCAAGCAGATGAGCATTGTG
Ir-SigP-258570	GACGATGTGTTCCACGAAC	GGTTGTGCAAGGGAACCTTG
Ir-237695	AAGCGCGGCTTTGCAACTG	CTCGAGAGCGCGTTCTTG
Ir-1315	ATGCCTGATATGGCGGAG	TTTGGTTTCGGCCAGAAC
Ir-SigP-239926	GTGAACAAGACATGGGAGGG	AGTTGCACATCAACCCAAC
Ir-SigP-241930	ACAGAGCACAAGCAAAGGTG	ATATTCGCCGTGCATTCTTC

Sekundární analýza byla vyhodnocena delta-delta ct metodou (Excel, GraphPad Prism6). Relativní hladina pozorovaných genů byla normalizována pomocí relativní hodnoty referenčního genu, elongačního faktoru (Ir-109631; Perner et al., 2016).

Semikvantitativní PCR proběhla totožně jako qPCR s rozdílem vyhodnocení výsledků. Vzorokly získané po dokončení všech reakčních cyklů byly naneseny do jamek 1% agarózového gelu (1% agaróza v 1x Tris-acetát-EDTA pufru, ethidium bromid 0,5 ug/ml) a rozděleny při 100 V napětí (25 min).

4.4. Amplifikace a izolace genu pro expresi rekombinantního proteinu

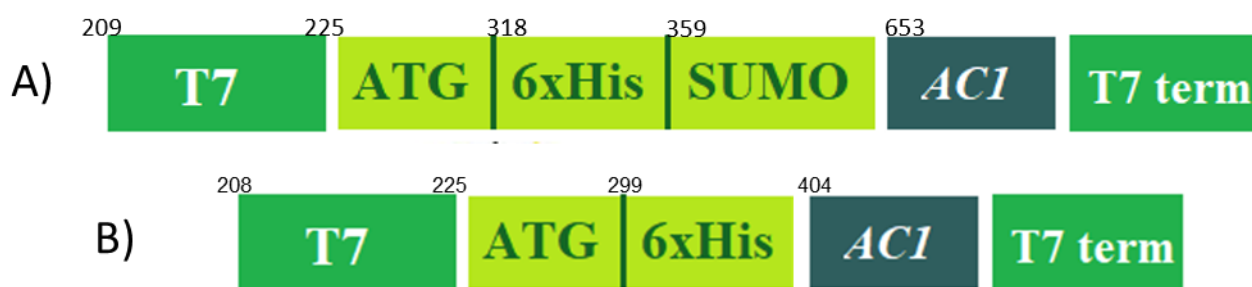
Gen *ac1*, *I. ricinus anticomplement 1*, byl amplifikován z cDNA templátu ze slinných žláz klíštěte, sajících 24 h na králíkovi, pomocí specificky navržených primerů (Tab. 3). Reakce probíhala jako gradient teplot annealingu (53, 55, 58 °C), s 30 cyklovým opakováním. Získaný PCR produkt byl elektroforeticky rozdělen v agarovém gelu (1,5% agaróza v 1x Tris-acetát-EDTA pufru, ethidium bromid 0,5 µg/ml) při 100 V napětí. Separované produkty (inserty) byly vyříznuty a přečištěny pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel). Tyto kroky byly dělány paralelně pro dva expresní vektory SUMO a pET100.

Tab. 3: Sekvence primerů použitých pro amplifikaci *ac1* pomocí PCR.

Název	Sekvence primeru
AC1 SUMO F	CACAGAGAACAGATTGGTGGTTCGTACAGCGAGGATGGC
AC1 SUMO R	GAATAAATACCTAAGCTTGTCTTCATGGGATGGCCTCAGGTTC
AC1 PET F	CACCTCGTACAGCGAGGATGGC
AC1 PET R	TCATGGGATGGCCTCAGGTTC

4.5. Klonování a izolace plazmidové DNA

Pro zaklonování genového úseku byly použity bakteriální vektory pET SUMO a pET100 (Obr. 1). SUMO vektor obsahuje 2 typy proteinových značek, His-tag a SUMO-tag. Pomocí proteázy a afinity k niklu je možné oba tagy od proteinu oddělit.



Obr. 1: Schéma konstruktu použitého SUMO (Obr. A) a pET100 (Obr. B) vektoru s vyznačenými velikostmi jednotlivých částí.

Klonovací reakce byla namíchána v molárním poměru 1:2 (vektor:insert) podle protokolu NEBuilder HiFi DNA assembly of DNA fragments: 10 ng přečištěného insertu pro SUMO vektor, 50 ng linearizovaného vektoru SUMO, 10 µl 2 x NEBuilder HiFi DNA assembly mastermixu a do 20 µl doplněna destilovanou vodou. Reakce byla ponechána po dobu 15 min v 50 °C a poté byla zamražena až do doby transformace. PCR produkt pro pET100 vektor byl s kitem TOPO TA Cloning Kit For Sequencing (Life technologies) klonován do pET100 vektoru. Metodou Heat Shock (teplotní šok, 42°C) byly konstrukty zatransformovány do One Shot TOP10 chemicky kompetentních *E. coli* (Invitrogen). K buňkám bylo přidáno 250 µl S.O.C. média (Invitrogen) a byly inkubovány 1 h ve 37 °C. Poté byly buňky rozetřeny na agarovou plotnu (1% agar v LB médiu, kanamycin/ampicilin 50 µg/ml) a inkubovány přes noc ve 37 °C s antibiotickou selekcí kanamycinem (50 µg/ml) pro SUMO, pro pET100 s ampicilinem (50 µg/ml). Molekulová hmotnost AC1 je 18 kDa, His tagu 5 kDa a SUMO-His tagu 12 kDa.

Úspěšnost transformace byla ověřena pomocí PCR z kolonií na plotně. Bylo vybráno 12 kolonií pro každý typ plazmidu. Jednotlivé kolonie bakterií byly resuspendovány ve 20 µl PCR H₂O, vzorky byly zahřívány na 95 °C po dobu 10 min a poté zcentrifugovány. Z těchto vzorků byl 1 µl použit jako templát do 10 µl PCR reakce o 25 cyklech. Pro PCR reakci byl pro SUMO plazmid použit T7 forward a gen specifický amplifikační reverse primer a pro pET100 plazmid byl použit T7 fwd a T7 rev (Tab. 4). Z pozitivních klonů byly vybrány pozitivní kolonie (5 ml LB media s 50 µg/ml kanamycinem/ampicilinem a 20 µl suspenze buněk) a inkubovány přes noc při 200 RPM a 37 °C. Plazmidová DNA byla získána pomocí kitu High Pure Plasmid Isolation kitu (Roche) a byla odeslána na kontrolní sekvenaci, ověření plazmidové identity a otevřeného čtecího rámce (Open reading frame) DNA.

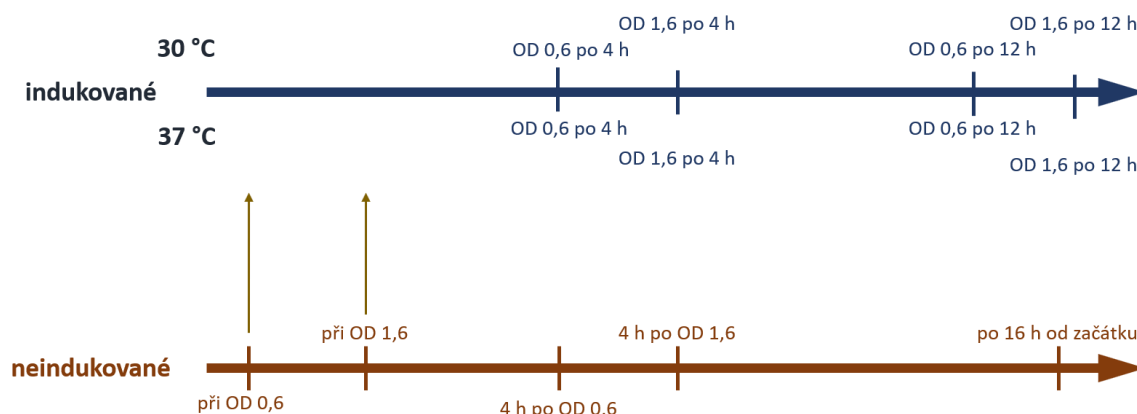
Tab. 4: Sekvence primerů použitých k ověření pozitivních kolonií pomocí PCR.

Název	Sekvence primeru
T7 F	TAATACGACTCACTATAGGG
AC1 SUMO R	GAATAAATACCTAAGCTTGTCTTCATGGGATGGCCTCAGGTTC
T7 R	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

4.6. Pilotní exprese rekombinantu AC1

Plazmidy z ověřených klonů byly zatransformovány do expresních buněk *E. coli* BL21. Proteiny byly exprimovány za: a) v různých OD hodnotách pro indukci, b) v různých délkách exprese, c) v různých teplotách exprese (Obr. 2). Expresní buňky byly inkubovány v LB médiu s příslušným antibiotikem (kanamycin/ampicilin) ve 37 °C. Po nárůstu do OD(600) 0,6 nebo 1,6 byly kultury indukovány IPTG (finální koncentrace 0,1 mM). Dále indukované kultury rostly ve 30 °C nebo 37 °C po dobu 4 nebo 12 h.

Vzorky byly okamžitě po odebrání zcentrifugovány (30 s při 15000 × g) a pelety bakterií byly zamrazeny. Poté byly všechny pelety rozmrazeny, rozsuspendovány ve 100 µl 1x PBS a vortexovány. Pro podpoření narušení buněčné stěny byly vzorky ještě střídavě mrazeny (tekutý dusík) a ohřívány (v termobloku, 40 °C). Homogenát byl poté centrifugačně oddělen (15000 × g, 10 min, 4 °C), a supernatant použit na ověření množství získaného solubilního rekombinantu pomocí western blotu s His-tag specifickou protilátkou.



Obr. 2: Schéma časové osy pro odebrání vzorků během pilotní exprese.

4.7. Western blot

Na neredukující proteinovou elektroforézu byly použity vzorky z pilotní exprese, homogenáty slinných žláz nymf a dospělců. Každý vzorek byl smíchán se 4 µl NuPAGE (LDS Sample Buffer, Invitrogen) a poté v uzavřených zkumavkách povařen (100 °C, 10 min), následně ochlazen na ledu a zcentrifugován (15 000 × g, 30 s). Vzorky byly poté naneseny do jamek gelu Criterion TGX Stain-Free Precast Gel (Bio-Rad) v reakčním pufru (25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1% SDS) v elektroforéze (Bio-Rad) a separovány pod napětím 100 V. Jako proteinový standard velikosti byl použit žebříček (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). Proteiny v gelu byly vizualizovány pomocí navázání

fluoroforu z gelu na molekuly proteinů na přístroji ChemiDoc MP (Bio-Rad). Poté byly proteiny z gelu pomocí blotovacího pufru (Trans-Blot Turbo Trasfer Buffer, Bio-Rad) a blotovacího zařízení (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad) přeneseny (7 min při 25 V) na polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu (Trans-Blot Turbo PVDF Membrane, s 0.2 μm velkými póry, Bio-Rad). Membrána s přenesenými proteiny byla 1 h blokována 3% roztokem odtučněného mléka v PBST (1x PBS; 0,05% Tween) a poté přes noc inkubována v primární myši anti-His protilátce (ředění 1:2000, Monoclonal Anti-polyHistidine, Sigma-Aldrich) nebo AC1 anti-séru (ředění 1:5000). Následně byla membrána promyta pomocí PBST a 1 h inkubována v sekundární protimyši nebo protikráličí protilátce značené peroxidázou (HRP, ředění 1:10000) a po dalším promytí byl k vyvolání membrány použit substrát Luminata Classico (Western HRP Substrate, Millipore). Chemiluminisceční signál byl zachycen pomocí přístroje ChemiDoc MP (Bio-Rad).

4.8. Afinitní purifikace rekombinantního AC1 přes his-tag

Po pilotní expresi byl pro vyšší výtěžek připraven větší objem bakteriální kultury (1 l LB, kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 30 ml rozostlé kultury), která byla indukována při $\text{OD}=0,6$ pomocí IPTG a inkubována ve 30 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 12 h. Poté byla kultura zcentrifugována, pelet rozsuspendován v solubilizačním pufru (viz Tab. 4) a sonikován (Ultrasonic Processor, Hielscher) při 60% amplitudě s cyklem 0,5 po dobu 8 min (15 s ON, 30 s OFF), poté zcentrifugován. Protein byl chromatograficky purifikován (ÄKTA pure chromatography system; GE Healthcare Life Sciences). Jako purifikační kolona byla připravena (HiTrap IMAC FF, GE Healthcare), která byla nabita niklem (0,1 M NiSO_4). Objem kolony (Bed volume) byl 5 ml a kolona byla nejdříve ekvilibrována pomocí solubilizačního pufru (Tab. 5). Poté byl na kolonu nanesen supernatant ze sonikace expresní kultury. Kolona byla poté promyta promývacím pufrem 1 a 2. A na kolonu navázaný produkt byl uvolněn elučním pufrem 1 a navázaný zbytek následně elučním pufrem 2 (viz Tab. 4). Purifikace byla monitorována při 280 nm absorbancí. Frakce byly po 1 ml sbírány do destičky a podle chromatogramu byly vybrány frakce, které byly dále ověřeny pomocí SDS-PAGE.

Tab. 5: Složení pufrů použitých při chromatografické purifikaci proteinu na niklové koloně.

Základ pufrů	Solubilizační pufr	Promývací pufr 1	Promývací pufr 2	Eluční pufr 1	Eluční pufr 2
20 mM MES	+ 0,1% triton x-100	+ 0,1% triton x-100	+ 20 mM imidazol	+ 270 mM imidazol	+ 520 mM imidazol
140 mM NaCl	+ Lysozyme (50 µg/ml)	+ 20 mM imidazol	+ 360 mM NaCl	+ 360 mM NaCl	+ 360 mM NaCl
pH=6,2		+ 360 mM NaCl			

4.9. Specifické proteolytické odštěpení tagů z rekombinantního AC1

Sloučené purifikační frakce byly použity pro proteolytickou reakci, kde pomocí SUMO proteázy byly odděleny SUMO a His-tag. SUMO proteáza (1 U SUMO Protease/ 2 µg protein, Invitrogen) a Dithiotreitol (finální koncentrace 1 mM) byly použity pro reakci ve 30 °C trvající po dobu 5 h. Část reakce byla štípána až do dalšího dne. Následná Ni²⁺ affinitní purifikace odstranila proteinové tagy a sumo proteázu. Beztagová forma AC1 byla tedy obohacena v průtokové frakci.

4.10. Purifikace rekombinantu AC1 pomocí iontové chromatografie

Frakce s rekombinantem byly slity a dočištěny při iontové chromatografii na koloně (Mono Q HR 5/5) equilibrované 20 mM Tris (pH=8) a eluované v gradientu pufru B (20 mM Tris, 1 M NaCl, pH=8). Čistota výsledného rekombinantu byla zkontrolována pomocí SDS gelové elektroforézy a následně identifikována pomocí metody peptidového mapování (Peptide mass fingerprinting). Koncentrace produktu byla změřena Pierce BCA Protein Assay Kitem (Thermo Scientific, jako standard použit BSA - Hovězí sérový albumin).

4.11. Produkce specifické protilátky

Laboratorní králík byl imunizován v 3-imunizačním schématu. Pro každou imunizaci bylo použito 100 µg beztagové formy AC1. První imunizace byla doplněna o Freundovo kompletní adjuvant (Sigma-Aldrich), pro zbylé dvě imunizace bylo použito adjuvant nekompletní. Interval mezi imunizacemi byly 14 dní. Po 2 týdnech od třetí imunizace byl králík vykrven a krev posbírána do 50 ml zkumavek. Zkumavky s krví byly ponechány stát 5 h v pokojové teplotě, dalších 10 h v lednici a poté byla krev zcentrifugována (10 min při 2500 × g) a odebráno a zamraženo sérum. Schopnost protilátek ze séra vázat se na antigeny z rekombinantu byla ověřena metodou western blot.

4.12. Kovalentní interakce AC1 s hostitelskými proteiny

Afinitní pull-down tagované formy proteinu, pre-inkubované s hostitelským sérem nebo plazmou, byl proveden pomocí Ni²⁺ agarózových kuliček (Ni-NTA Agarose, Invitrogen). Pro optimalizaci, množství kuliček a délky vychytávání rekombinantu tímto způsobem, byl udělán pilotní experiment, při němž bylo 20, 50 a 200 µl kuliček smícháno s 50 µg AC1 rekombinantu a 1 ml PBS. Vzorky byly ponechány po dobu 1, 5 a 18 h na otočné plošině v chladové místnosti 4 °C. Poté byl od kuliček odebrán roztok PBS, byly promyty pomocí čistého PBS a produkty eluovány 30 µl 1 M imidazolu. Eluce byly naneseny do jamek SDS-PAGE gelu (NuPAGE, Novex), který byl po rozdělení proteinů při 100 V vizualizován na přístroji ChemiDoc MP (Bio-Rad).

Dvě frakce, zřejmě obsahující monomer (C10) a monomer i dimer (D1), rekombinantního proteinu AC1, v SUMO vektoru s His a SUMO tagy, byly použity pro detekci kovalentních interakcí s hostitelskými proteiny. V reakci bylo smícháno 50 µg proteinu (rozpuštěný v pufru: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH=8) s 1 ml lidské a kravské krevní plazmy.

Plazma byla získána tak, že krev byla odebírána do 3,8% roztoku citrátu sodného (citronan sodný dihydrát, Lachema) v poměru 9:1 (9 ml krve : 1 ml roztoku citrátu). Poté byly zkumavky s krví a citrátem 10 min promíchávány, následně zcentrifugovány (10 min na 2500 × g při 4 °C,) a krevní plazma odebrána od peletu červených krvinek. Získaná plazma byla znovu zcentrifugována (10 min na 10000 × g při 4°C) a přefiltrována (0,22 µm, Millipore).

Vzorky proteinu a plazmy byly promíchávány 5 h v chladové místnosti (4 °C). Pro kontrolu byly připraveny i 3 zkumavky (lidská plazma, kravská plazma, PBS) bez rekombinantu. Ke každému vzorku bylo přidáno 40 µl niklových agarózových kuliček (Ni-NTA Agarose, Invitrogen). Poté byly vzorky dalších 14 h promíchávány v chladové místnosti. Následně byly kuličky promyty PBS a produkty eluovány 40 µl 1 M imidazolu. Výsledné eluce byly naneseny do Criterion TGX Stain-Free Precast Gelu (Bio-Rad) a po vizualizaci gelu byly přeneseny na membránu a inkubovány s anti-His primární protilátkou (1:5000) a protimyšší sekundární peroxidázovou protilátkou (1:10000).

Jako kontrolní rekombinantní protein pro kovalentní interakce byl vybrán klíčecí IRS8 s his-tagem, u kterého jsme znali schopnost vázat enzymy koagulační kaskády. Ten byl stejným postupem jako AC1 inkubován s lidskou a kravskou krevní plazmou. Výsledek byl

vyhodnocen pomocí anti-His western blotu. Následně byl experiment zopakován s rozdílem v inkubaci rekombinantu v krevním séru z člověka a krávy.

5. Výsledky

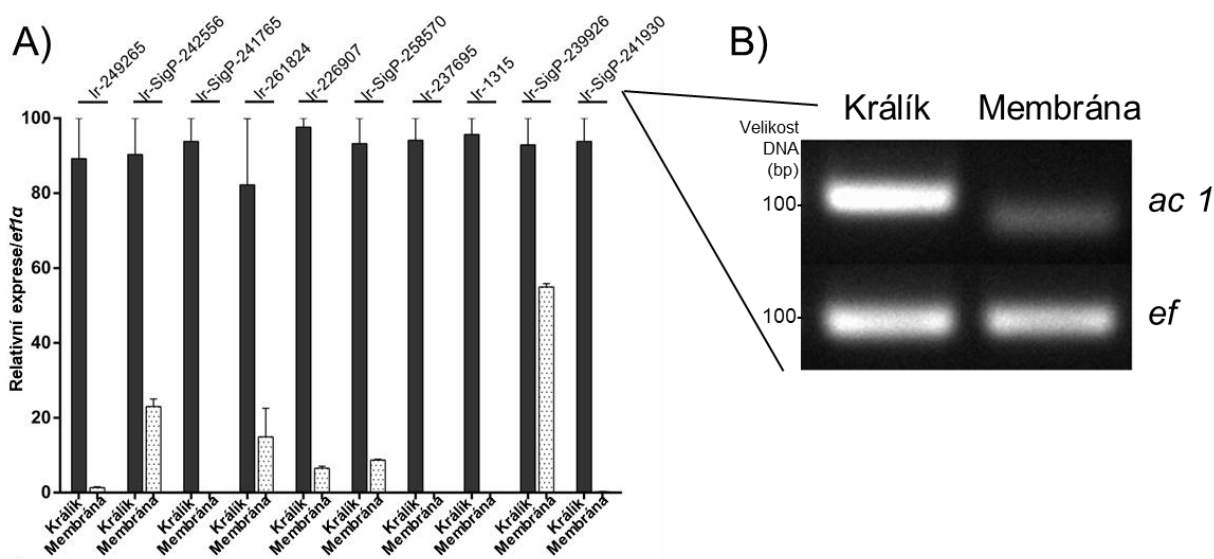
5.1. Ověření diferenciální exprese transkriptů slinných žláz pomocí qPCR

Pomocí transkriptomové analýzy bylo zjištěno, že klíšťata *I. ricinus* exprimují vybrané transkripty slinných žláz v různých hladinách (Tab. 6) v závislosti na tom, zda klíšťata sála králíčí krev z membránového systému, nebo na živém králíkovi s aktivními složkami imunity. V tabulce (Tab. 6) je 15 vybraných klíčecích transkriptů ze slinných žláz s výrazným nárůstem exprese při sání na živém hostiteli.

Tab. 6: Přehled RPKM hodnot se signifikantním nárůstem při sání na králíkovi (K) v porovnání se sáním na membráně (M) u klíšťat krmených po 24h (Perner et al., 2018). AC = anticomplement; BTS = Basic tail superfamily; RPKM = Reads per kilo base per million mapped reads.

Odkaz na peptid	Komentář	E hodnota	Pokrytí %	M24_1 RPKM	M24_2 RPKM	M24_3 RPKM	K24_1 RPKM	K24_2 RPKM	K24_3 RPKM
Ir-SigP-219629	18,3 kda subfamily of the BTS	3,0E-55	99,3	0,4	0,2	0,2	2695,6	987,3	2594,7
Ir-SigP-242556	18,3 kda subfamily of the BTS	2,0E-59	100	3,2	2,4	2,1	17011,5	6302,5	15365,9
Ir-SigP-241930	AC protein 1	0,0E+00	100	0,0	0,1	0,0	2377,0	2011,7	375,2
Ir-261824	AC protein 2	9,0E-92	91,5	0,0	0,1	0,1	91,5	32,2	91,2
Ir-SigP-229700	ticks ixostatins	3,0E-17	103,1	0,0	0,0	0,1	32,3	17,6	8,6
Ir-SigP-258570	18,3 kda subfamily of the BTS	1,0E-48	100	3,6	3,2	2,9	430,8	166,1	510,8
Ir-SigP-241765	antigen 5 protein	2,0E-90	86	2,4	6,4	0,2	77,2	202,6	141,6
Ir-1315	secreted protein precursor	0,0E+00	85,6	2,2	6,0	0,1	98,1	60,6	34,9
Ir-369	secreted metalloprotease	0,0E+00	95,7	44,9	0,0	5,2	156,2	132,5	296,7
Ir-SigP-369	secreted metalloprotease	0,0E+00	100	48,8	0,1	7,2	172,3	145,1	319,6
Ir-249265	secreted metalloprotease	0,0E+00	100	31,2	13,4	8,6	175,6	125,4	87,7
Ir-226907	secreted metalloprotease	0,0E+00	85,2	4,9	0,1	5,7	20,1	15,9	33,0
Ir-SigP-239926	AC protein IxAC-B5 precursor	8,0E-67	70,3	337,0	87,9	109,7	1444,0	1074,8	479,2
Ir-237695	secreted metalloprotease	0,0E+00	89,8	9,7	0,1	12,3	34,2	29,0	57,8
Ir-249264	secreted metalloprotease	0,0E+00	76,5	7,7	20,5	1,9	47,5	36,3	66,8

Tyto odlišné expresní hladiny byly ještě ověřeny pomocí RT-qPCR. U všech vybraných transkriptů se podařilo ověřit zvýšenou hladinu exprese ve slinných žlázách klíšťat, která sála na králíkovi a značně potlačenou hladinu exprese u klíšťat, která sála králičí krev z umělého membránového systému (Obr. 3A). Transkript kódující AC1 (Obr. 3A, poslední sloupec) byl ještě ověřen porovnáním křivek tání templátu (Příloha 1) a pomocí klasické PCR s následnou detekcí na agarózovém gelu (Obr. 3B). Při tomto experimentu byly relativní hladiny pozorovaných genů normalizovány pomocí relativní hodnoty referenčního genu, elongačního faktoru (*Ir-109631*; Perner et al., 2016).



Obr. 3: Ověření diferenciální exprese transkriptů ve slinných žlázách klíštěte *Ixodes ricinus* pomocí PCR. (A) RT-qPCR ověření diferenciálně exprimovaných transkriptů z transkriptomové analýzy slinných žláz klíšťat, která sála na králíkovi nebo králičí krvi v membránovém krmítku. (B) Ověření rozdílné exprese transkriptu *Ir-SigP-241930* kódující antikomplement 1 pomocí semikvantitativní PCR a separaci na 1% agarózovém gelu.

5.2. Sekvenační alignment

Alignment sekvence proteinu AC1 s dalšími antikomplementy klíštěte *Ixodes ricinus*, u kterých byla prokázána snížená exprese při sání na membránovém systému. Alignment ukázal, že mají sekvence konzervované určité sekvenci úseky (Obr. 4). Větší shoda je u proteinů *IxAC1* a *IxAC2*, než v jejich kombinaci s *IxAC-B5*. U naposledy zmíněného proteinu je sekvence neúplná s chybějícím N-koncem, což snižuje šanci vyhledání podobných částí sekvencí. Očekávaná molekulová hmotnost *IxAC-B5* je 14,7 kDa, *IxAC2* 18 kDa a *IxAC1* 20 kDa. Očekávané pI *IxAC-B5* je 4,61, *IxAC2* 4,59 a *IxAC1* 4,36.

```

IxAC-B5 1 MKTALTCALFGILFFGSLCSSNEEIQEQEPT-PTPQDELYKRNYPQNASGLCGSWYRNESS
IxAC2 1 -----GSPCSSSEDGGERESGVETTTQSLYEHFFRNHSGLCGAQYRNSIY
IxAC1 1 MKTALTCALLAISFLGSCSYSEDGGEQDTGEKSTKEDLYEKYYRND SGLCGAQYRNLSY

IxAC-B5 60 LESIYNCTLKTLDEKNHTIVNKTWEGFRLSQNLTIIPRLVGLMCNFSVAMPDNFTLMFEFE
IxAC2 46 SEPVYNCTLKALP----PIVNQTWEGIRHNISRTIPQFVSLMCNLTVVMPDNFYLLYMGD
IxAC1 61 AEPVYNCTLRALP----PIVNKTWEEIRLNISKSLPDEVKLMCNFTVAMPDSFYLVYTES

IxAC-B5 120 GGLELESAGTF-----
IxAC2 102 QTSNSQNEE-QSTGTS-----EESRPVVRVTEQDITKAE EACTANITGWTTKAPTTLAPME
IxAC1 117 NGNLSPEEDEQSTSKGENSEKVSAAAVTVTTNLIITKVQEECTANITGWTTTEAPTNL EPT E

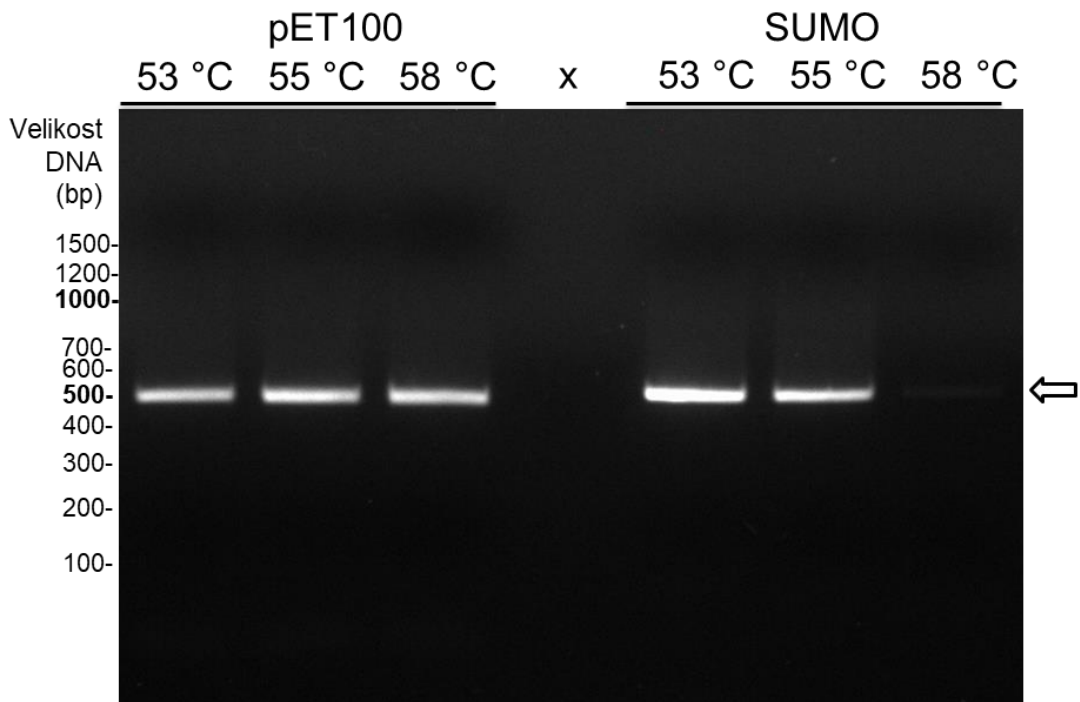
IxAC-B5 -----
IxAC2 156 TSELEAIA
IxAC1 177 TPEPEAIP

```

Obr. 4: Sekvenční alignment vybraných antikomplementových proteinů. Porovnání sekvencí IxAC-B5 (*Ixodes ricinus* antikomplementový proteinový IxAC-B5, Ir-SigP-239926), IxAC2 (*Ixodes ricinus* antikomplementový protein 2, Ir-261824) a IxAC1 (*Ixodes ricinus* antikomplementový protein 1, Ir-SigP-241930), (Perner et al., 2016). Kurzívou je naznačený signální peptid.

5.3. Amplifikace *ac1* z cDNA slinných žláz

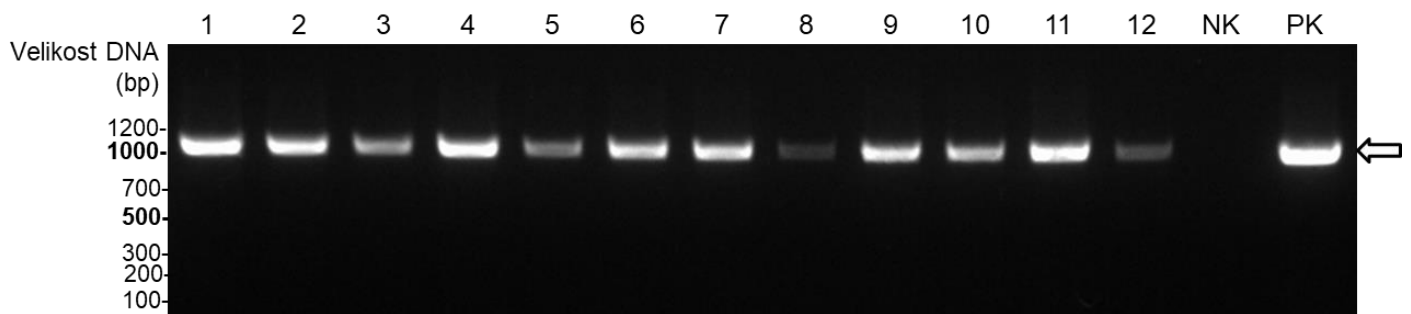
Abych zjistila nejvhodnější teplotu pro nasedání primerů, udělala jsem PCR s gradientem teplot annealingu. Vhodné teploty pro nasedání primerů, při amplifikaci *ac1* pomocí PCR, byly 53, 55 a 58 °C pro pET100 vektor a 53 nebo 55 °C pro SUMO vektor. Pro amplifikaci *ac1* pomocí PCR byla použita annealingová teplota 55 °C. Tato teplota byla vhodná pro oba klonovací vektory.



Obr. 5: PCR optimalizace annealingové teploty pro *acI* insert do expresních vektorů. PCR amplifikace *acI* úseku cDNA z templátu slinných žláz klíštěte sajícího 24 h na králíkovi. Teploty pro nasedání primerů, určených k amplifikaci úseků pro zaklonování do expresních plazmidů pET100 a SUMO, na templát byly zvoleny 53, 55 a 58 °C. PCR produkty byly rozděleny na 1% gelu. Šipka označuje očekávanou velikost pozitivního amplikonu.

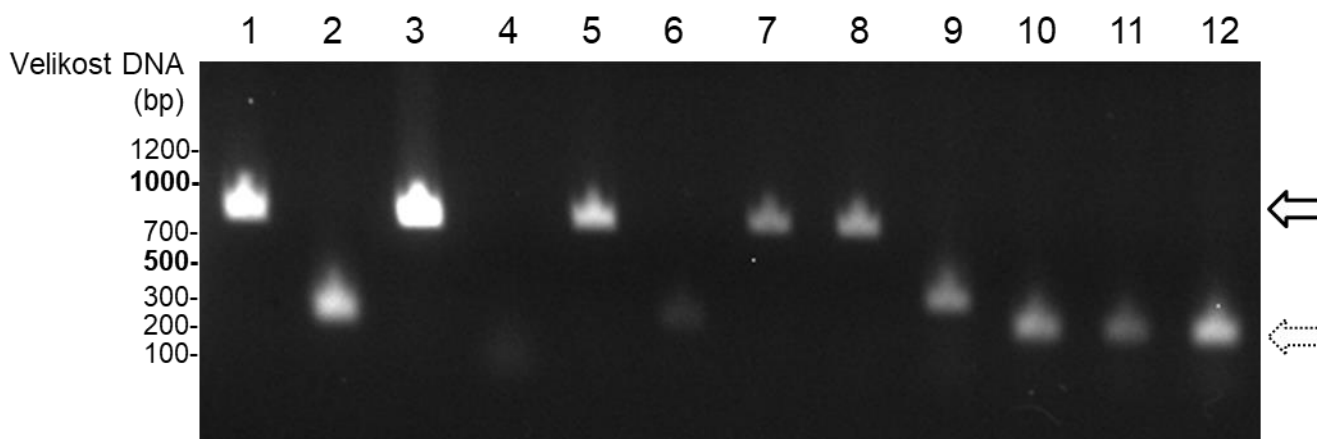
5.4. Ověření úspěšnosti klonování a transformace

Úspěšně zaklonovaný úsek *acI* do plazmidu a správná transformace takového plazmidu do expresních buněk byla ověřena pomocí PCR. Správné zaklonování a transformace do buněk bylo potvrzeno u všech vybraných kolonií se SUMO vektorem (Obr. 6). Očekávaná délka amplikonu byla 1000 bp, z důvodu nasedání T7 plazmidového primeru před 5' koncem genu, oproti očekávané délce zaklonovaného *acI* 500 bp.



Obr. 6: Kontrola pozitivních kolonií se SUMO vektorem. Selektivně narostlé kolonie *E. coli* BL21 byly analyzovány PCR pomocí T7 forward plazmidového primeru a gen specifického primeru *acI*-reverse a rozděleny v 1% agarózovém gelu. Jako negativní kontrola (NK) byl templát kus kultivační agarové půdy z místa, kde nenarostla žádná kolonie. Jako pozitivní kontrola (PK) byla použita rekombinanční směs použitá pro transformaci. Šipka naznačuje velikost pozitivního amplikonu.

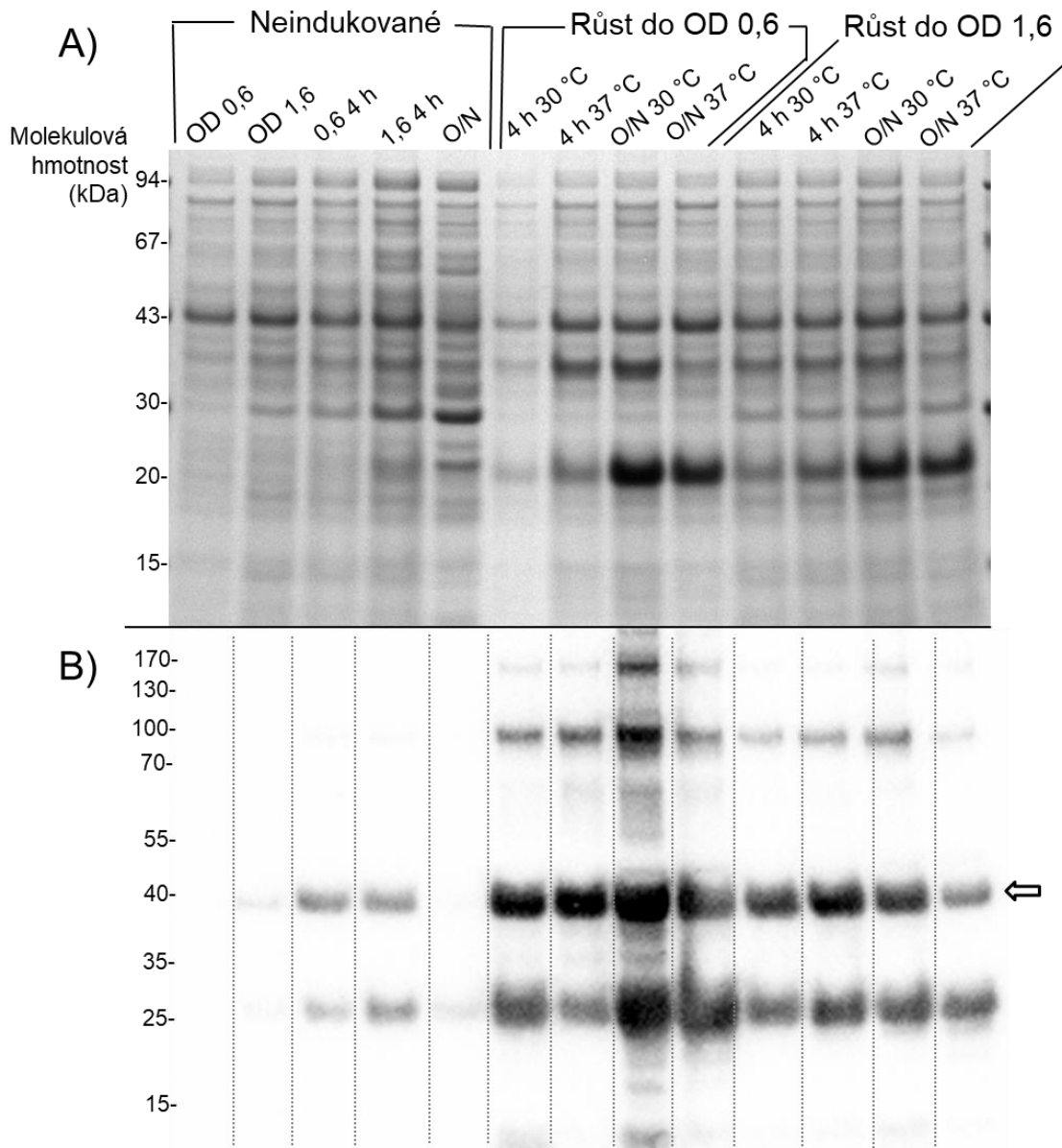
Úspěšně zaklonovaný úsek *acI* do plazmidu a správná transformace takového plazmidu do expresních buněk byla, pomocí PCR, potvrzena u pěti (č. 1, 3, 4, 7 a 8) z vybraných kolonií s pET100 vektorem (Obr. 7). Očekávaná délka amplikonu byla cca 800 bp, přičemž délka prázdného plazmidu byla cca 300 bp. Proužky ve velikosti označené šipkou plnou čarou jsou pozitivní kolonie. Proužky ve velikosti označené šipkou přerušovanou čarou jsou zřejmě prázdné plazmidy, u nichž nedošlo ke správnému klonování.



Obr. 7: Kontrola pozitivních kolonií s pET100 vektorem. Selektivně narostlé kolonie *E. coli* BL21 byly analyzovány přes PCR pomocí T7 forward a reverse plazmidového primeru a rozdělěny v 1% agarózovém gelu. Šipka plnou čarou naznačuje velikost pozitivního amplikonu. Šipka přerušovanou čarou označuje velikost prázdného plazmidu pET100.

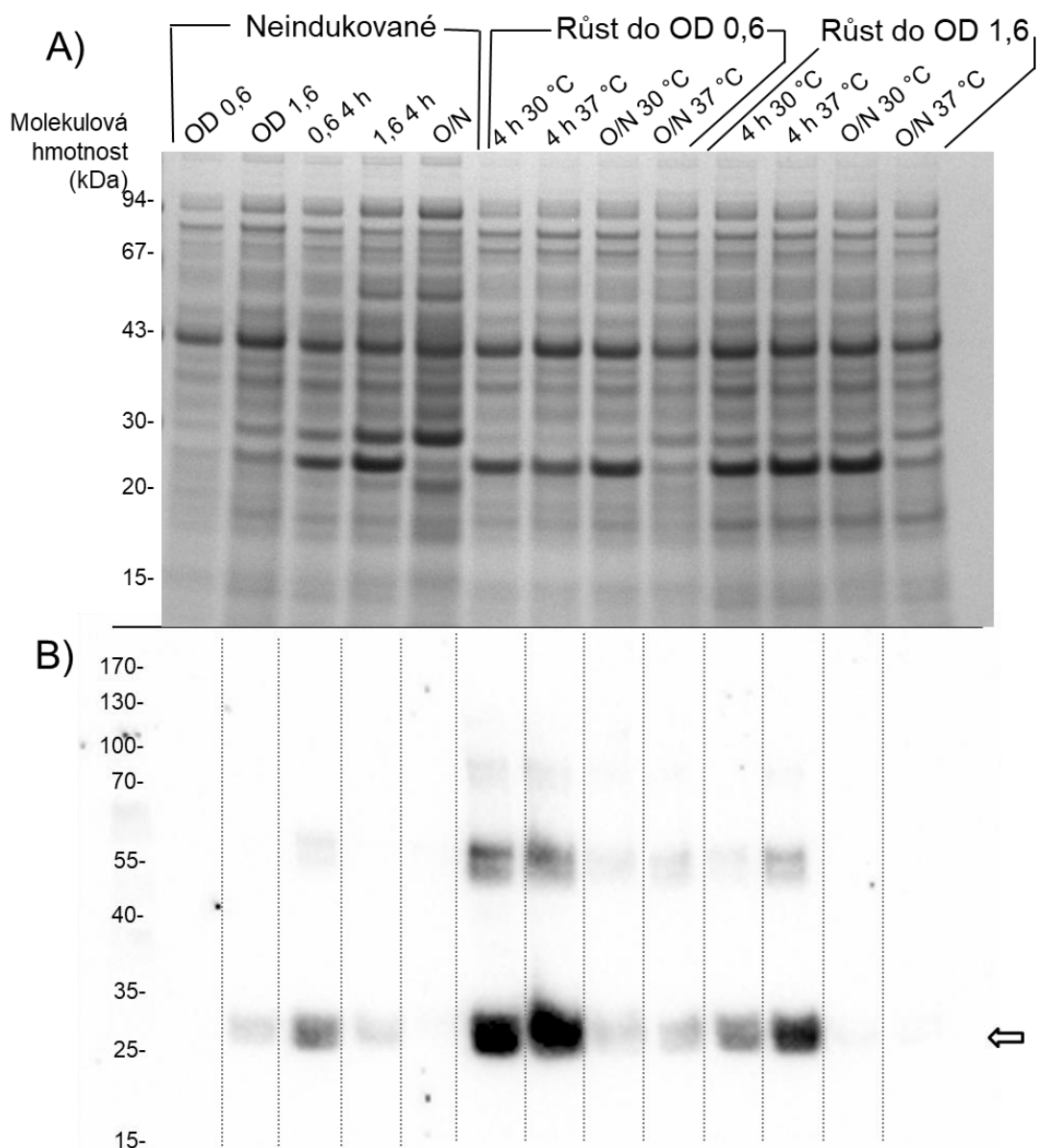
5.5. Pilotní exprese rekombinantu AC1 a western blot

Predikovaná molekulová hmotnost AC1 v SUMO vektoru je 30 kDa. Pilotní exprese v *E. coli* sloužila k vybrání nejvhodnějších podmínek k produkci rozpustného rekombinantního proteinu. K větší hladině exprese v SUMO vektoru vedla indukce IPTG za nižší hladiny OD (0,6) oproti vyšší (1,6) (Obr. 8). Rozdílné hladiny teplot (30 °C vs 37 °C) vedly k rozdílným hladinám exprese, ačkoli nižší teplota vedla v některých případech dokonce k vyšší hladině exprese (viz. Obr. 8, indukce při OD 1,6 a O/N expresi). Pro délku exprese platí, že v případě zaindukování při nižším OD (0,6) je déle trvající exprese výtěžnější, při vyšším OD (1,6) je tomu opačně. Nejvýtěžnější byla exprese při indukci OD 0,6, O/N a 30 °C.



Obr. 8: SDS-PAGE a western blot vzorků z pilotní exprese AC1 v SUMO vektoru. Vzorky sesbírané v proměnných faktorech po indukci byly rozděleny pomocí neredukující SDS-PAGE (Obr. A) a přebílotování. Proměnné faktory zahrnovaly rozdílné OD (optické density) 0,6 a 1,6, rozdílné délky exprese po inkubaci 4 hodiny a celonoční inkubaci (O/N) a rozdílné inkubační teploty 30 a 37 °C. Přebílotované vzorky byly inkubovány s anti-His primární protilátkou a protimýš sekundární protilátkou konjugovanou s HRP. Signál byl vyvolán chemiluminiscenčním substrátem Classico Luminata a vizualizován (Obr. B) na Chemidoc. Délka expozice fotky membrány byla 1 s. Šipka naznačuje očekávanou velikost pozorovaného proteinu.

Predikovaná molekulová hmotnost AC1 v pET100 vektoru je 23 kDa. K větší hladině exprese v pET100 vektoru vedla indukce IPTG za nižší hladiny OD (0,6) oproti vyšší (1,6) (Obr. 9). Rozdílné hladiny teplot (30 °C vs 37 °C) vedly k rozdílným hladinám exprese, přičemž nižší teplota vedla k podobné nebo lehce nižší hladině exprese (viz. Obr. 9, indukce při OD 1,6 a 4 h expresi). Pro délku exprese platí, že kratší (4 h) exprese je výrazně výtěžnější než O/N exprese. Nejvýtěžnější byla exprese při indukci OD 0,6, 4 h a 37 °C.

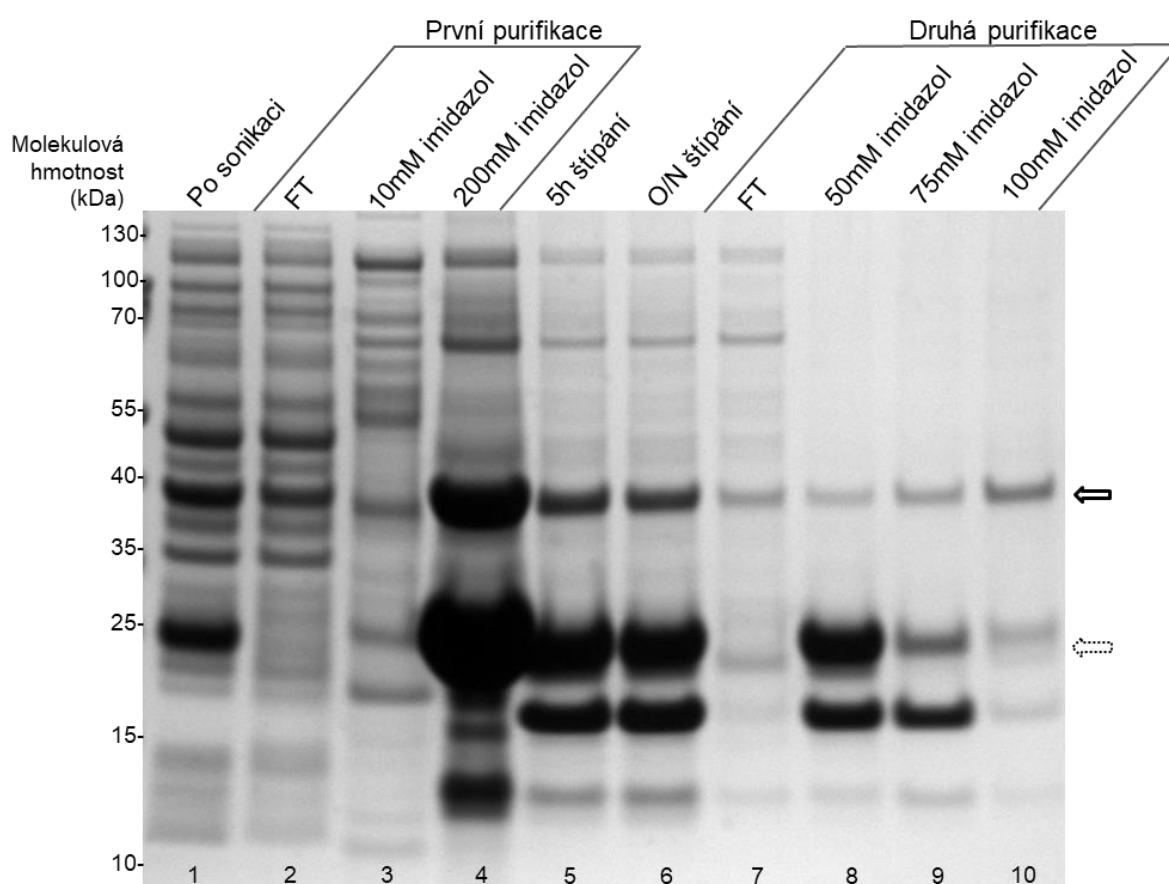


Obr. 9: SDS-PAGE a western blot vzorků z pilotní exprese AC1 v pET100 vektoru. Vzorky sesbírané v proměnných faktorech po indukci byly rozděleny pomocí neredukující SDS-PAGE (Obr. A) a přebílotování. Proměnné faktory zahrnovaly rozdílné OD (optické denzity) 0,6 a 1,6, rozdílné délky exprese po inkubaci 4 hodiny a celonoční inkubaci (O/N) a rozdílné inkubační teploty 30 a 37 °C. Přebílotované vzorky byly inkubovány s anti-His primární protilátkou a protimyšší sekundární protilátkou konjugovanou s HRP. Signál byl vyvolán chemiluminiscenčním substrátem Classico Luminata a vizualizován (Obr. B) na Chemidoc. Délka expozice fotky membrány byla 13 s. Šipka naznačuje očekávanou velikost pozorovaného proteinu.

Pro následující expresi proteinu AC1 byl z důvodu výrazně vyšší výtěžnosti rozpustného proteinu, vezmeme-li v úvahu délky expozic při pořizování snímků, vybrán vektor SUMO. Indukce IPTG proběhla za nižší hladiny OD (0,6) a exprese byla udržována při nižší teplotě (30 °C) přes noc (O/N).

5.6. Afinitní purifikace rekombinantního AC1 přes his-tag

Solubilizovaný extrakt z *E. coli* v solubilizačním pufru (Tab. 4) byl nanesen na ekvilibrovanou kolonu a po promytí byl specificky eluován imidazolem. Po celou dobu purifikace bylo monitorováno množství odtékajících proteinů z kolony pomocí absorbance (Příloha 2). Při monitorování byly vybrány frakce, ze kterých byly odebrány vzorky na SDS-PAGE (Obr. 10). Při porovnání 1. a 2. sloupce gelu (Obr. 10) vidíme, že z homogenátu expresních buněk se na purifikační kolonu navázal protein. Tento protein byl zakoncentrován a uvolněn z kolony pomocí 200mM imidazolu (Obr. 10, 4. sloupec).

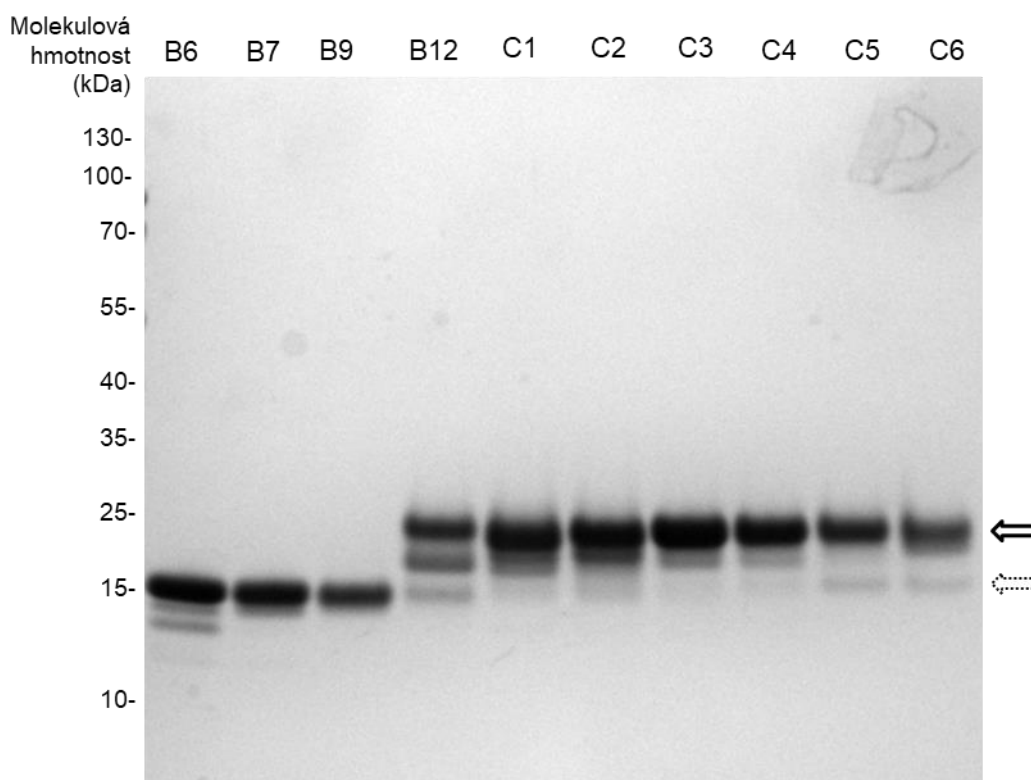


Obr. 10: SDS-PAGE vybraných frakcí po purifikaci proteinu pomocí Ni-NTA afinitní chromatografie. Na gel byl použit supernatant ze sonikace a následné centrifugace exprimujících buněk *E. coli* BL21, dále odebraný vzorek po průtoku nasazovaného vzorku kolonou (flow-through, FT) a eluční frakce vybrané podle chromatogramu z průběhu první purifikace, popsané finální koncentrací imidazolu (10mM a 200mM imidazol). Poté byl protein z eluce 200mM imidazolem štípán SUMO proteázou po dobu 5 h a přes noc (O/N) a z obou inkubací byl nanesen vzorek do gelu. Protein po celonočním štípání byl purifikován přes niklem nabitou kolonu, kdy byl odebrán na gel vzorek průtoku při nanášení proteinu na kolonu. Dále byly na gel použity eluční frakce s finální koncentrací imidazolu 50mM, 75mM a 100mM. Proteiny byly rozděleny pomocí redukující elektroforézy. Šipka plnou čarou naznačuje očekávanou velikost zkoumaného proteinu ve vektoru s tagy. Šipka přerušovanou čarou označuje očekávanou velikost čistého zkoumaného proteinu, bez vektoru.

Ve vybraných frakcích přečištěného rekombinantu byly specificky proteolyticky odštěpeny tagy od rekombinantního proteinu pomocí SUMO proteázy (Obr. 10, 5. a 6. sloupec). Insert byl oddělen afinitní purifikací přes niklem nabitou kolonu. Po celou dobu purifikace bylo monitorováno množství odtékajících proteinů z kolony pomocí absorbance (Příloha 3). Vzorky odebrané v průběhu štípání a následné purifikace byla vyhodnoceny pomocí SDS-PAGE (Obr. 10). V 7. sloupci gelu (Obr. 10) vidíme, že zde nejsou přítomny protein AC1 ani tagy, navázaly se na kolonu a většina se uvolnila s 50 mM imidazolem (Obr. 10, 9. sloupec). V dalším sloupci je možné vidět převážně oddštípnuté tagy (Obr. 10, 10. sloupec).

5.7. Purifikace rekombinantu AC1 pomocí iontové chromatografie

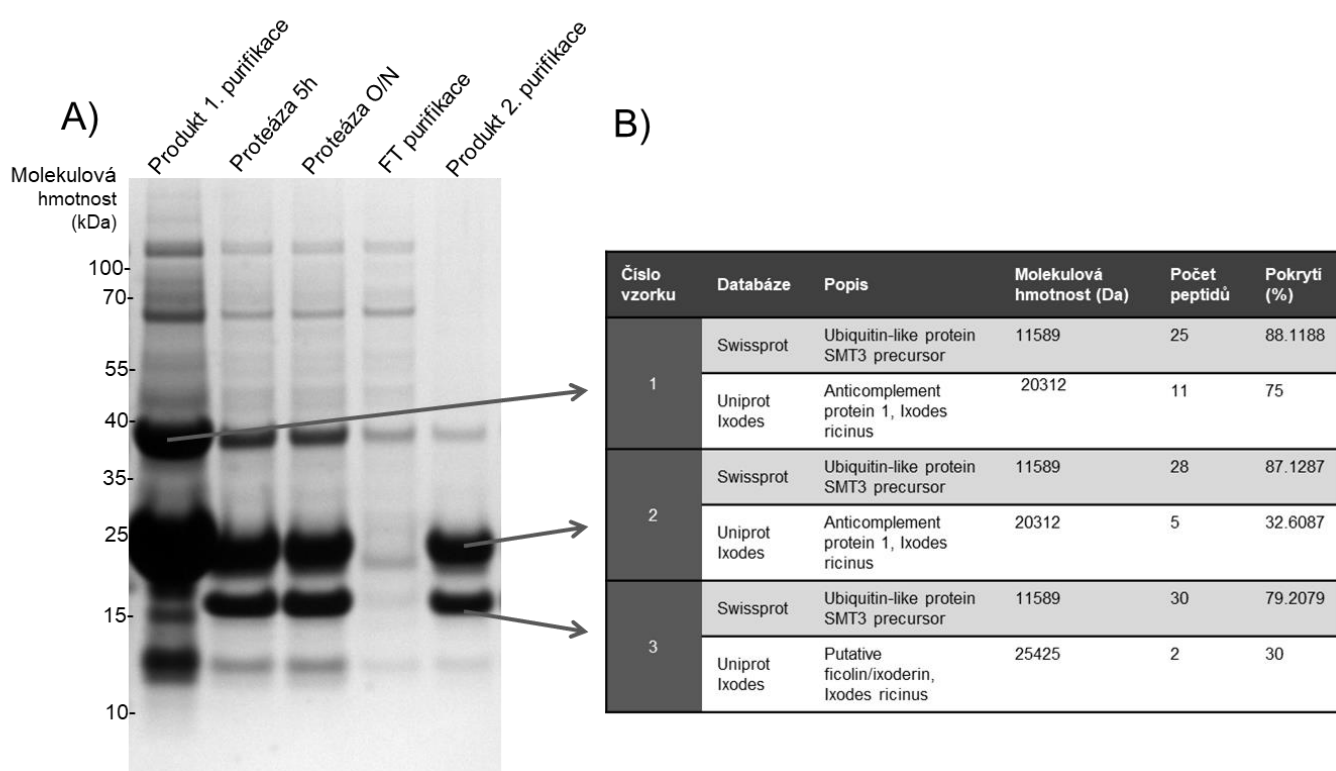
Získaný rekombinantní protein AC1 oddělený od vektoru a většiny tagů byl dočištěn pomocí iontové chromatografie přes Mono Q kolonu. Po celou dobu purifikace bylo monitorováno množství odtékajících proteinů z kolony pomocí absorbance (Příloha 4). Na gelu je vidět oddělení tagů od rekombinantu v jednotlivých frakcích purifikace (Obr. 11). Koncentrace produktu byla 1 mg/ml, změřena Pierce BCA Protein Assay Kitem.



Obr. 11: SDS-PAGE vybraných elučních frakcí z purifikace proteinu pomocí iontové chromatografie. Produkt, z Ni-NTA purifikace proteinu po štípání, byl dočištěn pomocí iontové chromatografie s využitím MonoQ kolony. Eluční frakce iontové chromatografie, označené B6–C6, byly použity na redukující proteinovou elektroforézu. Frakce byly vybírány v průběhu purifikace vyhodnocením chromatogramu. Šipka plnou čarou naznačuje očekávanou velikost zkoumaného proteinu. Šipka přerušovaná čarou označuje očekávanou velikost tagu.

5.8. Identifikace rekombinantního proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie

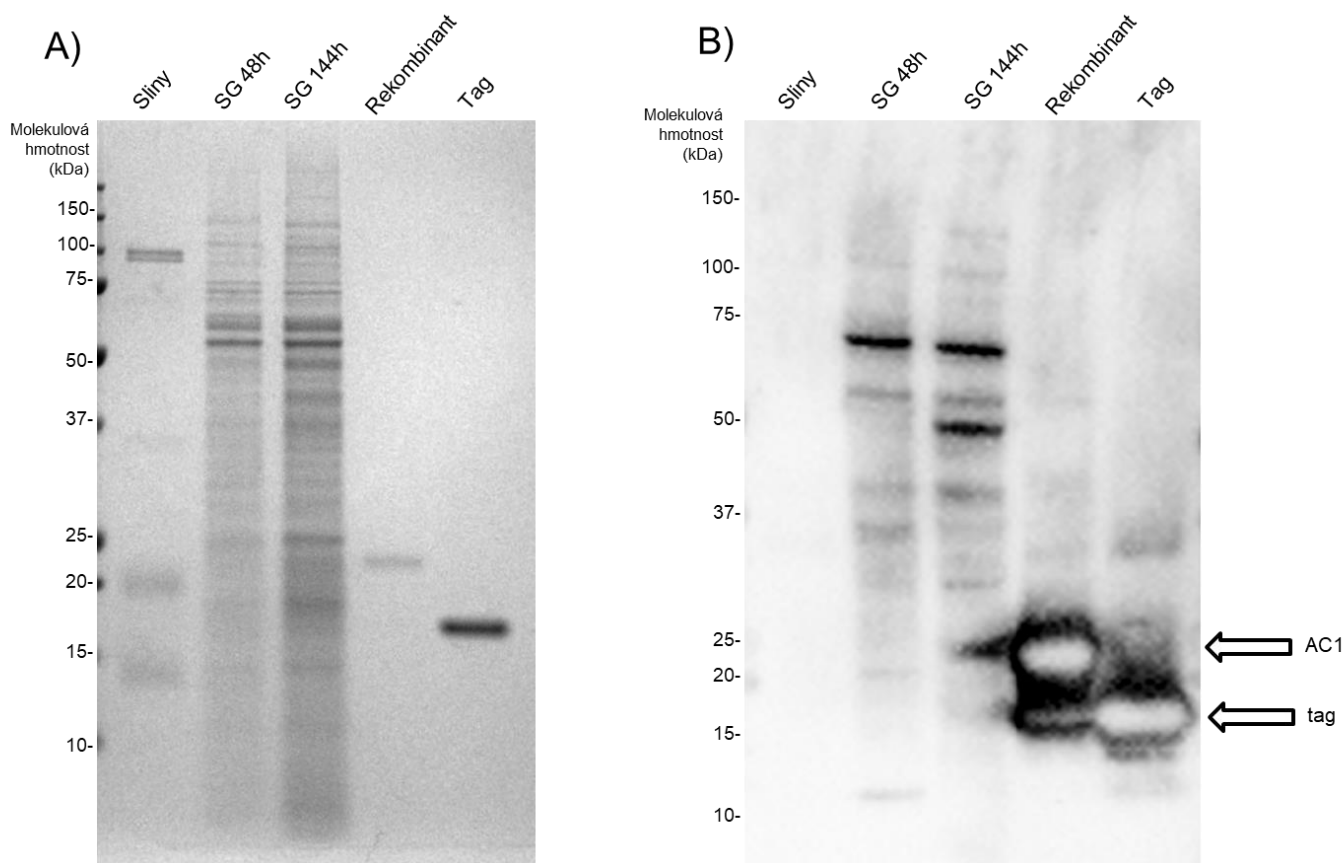
Přítomnost získaného rekombinantu byla ověřena hmotnostní spektrometrií (Obr. 12), která identifikovala protein o molekulové hmotnosti cca 38 kDa a 25 kDa jako protein AC1 (Ixodes-specifická databáze Uniprot) a SUMO protein (nespecifický Swissprot). Odečtené molekulové hmotnosti neodpovídají predikovaným teoretickým hodnotám, pro AC1 18 kDa a pro SUMO tag 17 kDa. Mohlo by se jednat o dimer a monomer, který se elektroforeticky pohybují rychleji než použité standardy. Molekulová hmotnost samostatného tagu už migruje dle očekávání okolo molekulové hmotnosti 17 kDa.



Obr. 12: Ověření izolace a purifikace proteinu AC1 pomocí hmotnostní spektrometrie. Eluce z obou afinitních purifikací, produkt po 5h a celonočním (O/N) štípání sumoproteázou a průtok při nanášení vzorku na kolonu při druhé purifikaci, byly použity na SDS-PAGE. Gel byl vizualizován pomocí UV (ultrafialového) světla a proužky označené šipkami byly vyříznuty (Obr. A) a odeslány na analýzu hmotnostní spektrometrie. Vzorky byly analyzovány podle Swissprot všeobecné genové knihovny a Uniprot klíčící genové knihovny (Obr. B).

5.9. Produkce specifické protilátky

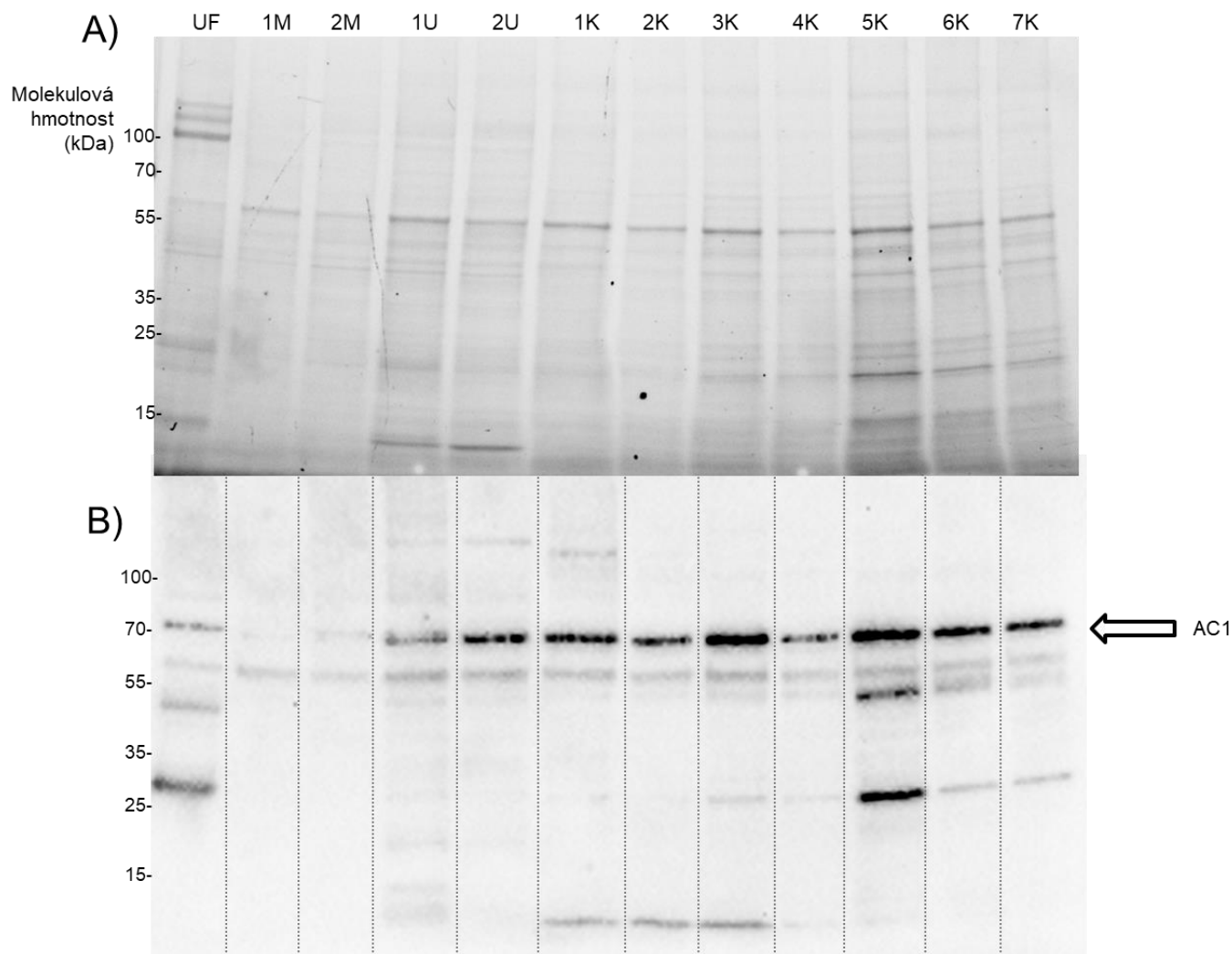
Imunizací laboratorního králíka bylo získáno specifické anti-sérum. Schopnost protilátek z krevního séra vázat se na antigeny z rekombinantu byla ověřena metodou western blot, která ukázala značení rekombinantu i tagu a nativního AC1 z klíštěcích slinných žláz. Králíčí anti-sérum neznačí proteiny z klíštěcích slin (Obr. 13).



Obr. 13: Ověření specifity AC1 protilátky pomocí western blotu. Při kontrole AC1 protilátky byly použity vzorky klíštěcích slin (po 6 dnech sání, slinění vyvoláno pilocarpinem), homogenáty klíštěcích slinných žláz (salivary glands, SG) z dospělých samic sajících 48 h a 144 h na králíkovi, rekombinant AC1 a SUMO tag. Vzorky byly naneseny do gelu a pomocí redukující SDS-PAGE rozděleny podle své molekulové hmotnosti (Obr. A). Přeblované vzorky byly inkubovány s AC1 primární protilátkou a protikrálíčí sekundární protilátkou konjugovanou s HRP. Signál byl vyvolán chemiluminiscenčním substrátem Classico Luminata a vizualizován (Obr. B) na Chemidoc.

Následně byla porovnána exprese AC1 ve slinných žlázách klíšťat, která sála na různých hostitelích, pomocí anti-séra se specifickými protilátkami a western blotu (Obr. 14). Největší exprese AC1 byla zjištěna při sání klíšťat na králíkovi. Slabý signál byl zaznamenán u klíšťat sajících na membráně a klíšťatech nesajících, u nichž se objevil proužek o molekulové hmotnosti cca 28 kDa, který se objevil i ve vzorcích klíšťat sajících na králíkovi

v delším časovém úseku. U klíšťata sajících na morčeti nebyla zaznamenána žádná AC1 exprese.

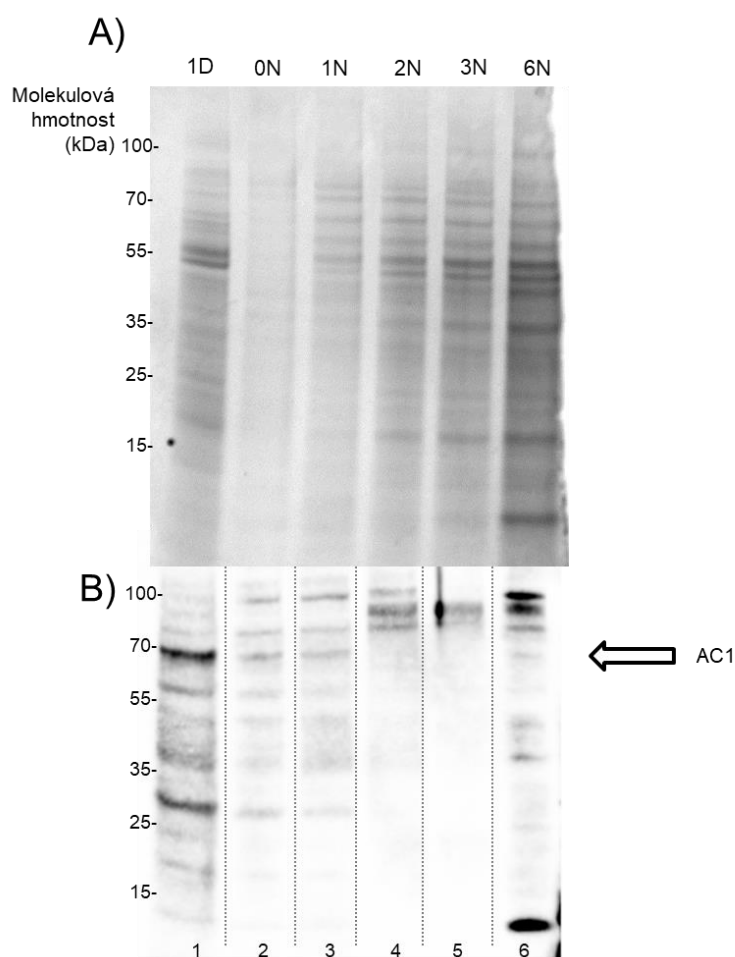


Obr. 14: Stanovení exprese AC1 ve slinných žlázách klíšťat po sání na různých hostitelích pomocí western blot analýzy. Pro experiment byly vybrány slinné žlázy nenasátých klíšťat (UF), klíšťat sajících 1 nebo 2 dny na morčeti (M), 1 nebo 2 dny krmených uměle přes membránu (U) a sajících 1–7 dní na králíkovi (K). Vzorky byly naneseny do gelu a pomocí redukující SDS-PAGE rozděleny podle své molekulové hmotnosti (Obr. A). Přebílotované vzorky byly inkubovány s AC1 primární protilátkou a protikráličí sekundární protilátkou konjugovanou s HRP. Signál byl vyvolán chemiluminiscenčním substrátem Classico Luminata a vizualizován (Obr. B) na Chemidoc.

Použitím dvou stejně připravených membrán, se vzorky homogenizovaných slinných žláz klíšťat a vzorkem králíčího AC1 anti-séra, bylo inkubací první membrány s kombinací primární (AC1 anti-sérum, 1:1000) a sekundární protikráličí protilátky (1:5000), a druhé membrány pouze se sekundární protilátkou (1:5000), vyloučeno, že by protikráličí sekundární protilátka tvořila nespecifické vazby s proteiny ze slinných žláz klíšťat sajících na králíkovi (Příloha 5).

5.10. Ověření exprese AC1 v nymfách

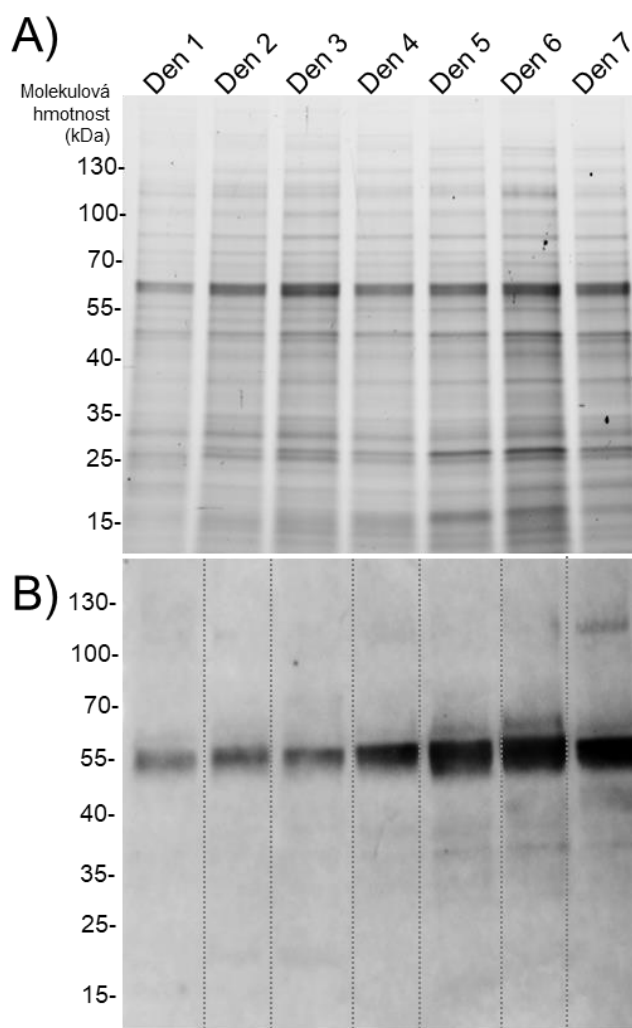
AC1 byl jasně prokázán ve slinných žlázách dospělých samic klíšťat. Jestli je ale exprimován i ve slinných žlázách nymfálního stádia klíštěte *I. ricinus*, které hraje důležitější roli v přenosu borrelií, nebylo zřejmé. Proto byly, pomocí western blot analýzy, otestovány homogenáty slinných žláz vypitvaných z nymf, které byly odebírány v denních intervalech sání. Ve vzorku slinných žláz klíšťat, která sála 24 h na králíkovi (Obr. 15, sloupec 1) se nám opět podařilo detekovat nativní AC1 o molekulové hmotnosti cca 70 kDa a další proužek o molekulové hmotnosti cca 28 kDa. Bohužel se ale u nymf nepodařilo potvrdit expresi tohoto proteinu (Obr. 15). Tento výsledek vyvrací expresi AC1 ve slinných žlázách nymf *I. ricinus*. Výsledek může být ale ovlivněn různorodostí laboratorního zvířete, na němž nymfy sály.



Obr. 15: Stanovení exprese AC1 ve slinných žlázách nymfálního stádia klíštěte. Porovnání exprese AC1 ve slinných žlázách dospělých samic sajících 1 den na králíkovi (1D) a nymf nesajících (0N) nebo sajících 1, 2, 3 a 6 dní na králíkovi (1–6N). Homogenáty slinných žláz byly v gelu rozděleny podle své molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE (Obr. A). Přebílotované vzorky byly inkubovány s AC1 primární protilátkou (ředění 1:5000) a protikráličí sekundární protilátkou (ředění 1:20000) konjugovanou s HRP. Signál byl vyvolán chemiluminiscenčním substrátem Classico Luminata a vizualizován (Obr. B) na Chemidoc.

5.11. Detekce proteinů ze slinných žláz pomocí séra z opakovaného sání

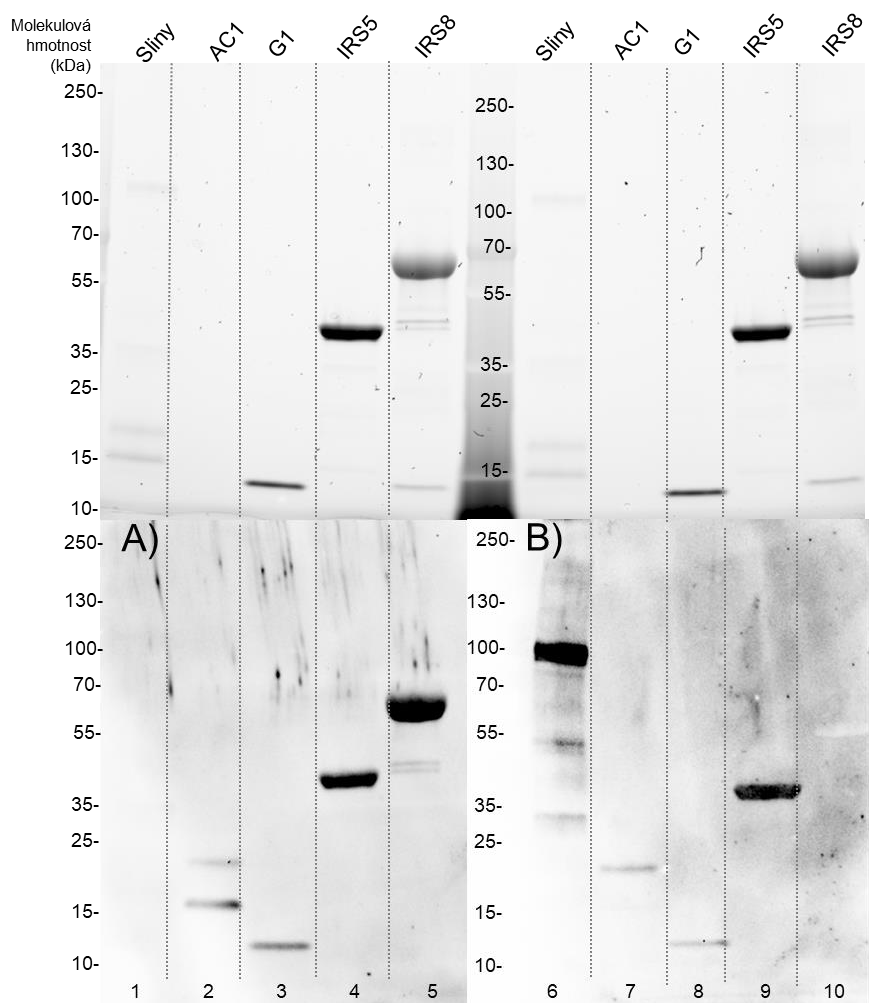
Klíště využívá slinné žlázy k výrobě slin, které potlačují imunitní odpověď hostitele a usnadňují klíštěti sání. Exprese imunogenních proteinů ve slinných žlázách klíštěte postupně roste, čím déle klíště saje (Obr. 16). Sérum z králíka, na němž opakovaně sála klíšťata značí dominantně jeden protein o molekulové hmotnosti cca 55 kDa (Obr. 16B). Některé proteiny, značí i sérum z králíka, na němž klíšťata někdy nesála (Příloha 6). Tento protein se po vizualizaci objevuje ve větší molekulové hmotnosti než protein detekovaný sérem z opakovaného sání.



Obr. 16: Detekce proteinů ve slinných žlázách pomocí séra z králíka, na němž opakovaně sála klíšťata, pomocí western blot analýzy. Porovnání exprese proteinů ve slinných žlázách dospělých samic sajících 1–7 dní na králíkovi. Homogenáty slinných žláz byly v gelu rozděleny podle své molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE (Obr. A). Přeblované vzorky byly inkubovány se sérem z králíka, na němž opakovaně sála klíšťata (ředění 1:1000) a protikráličí sekundární protilátkou (ředění 1:20000) konjugovanou s HRP. Signál byl vyvolán chemiluminiscenčním substrátem Classico Luminata a vizualizován (Obr. B) na Chemidoc.

5.12. Testování detekce AC1 pomocí séra z opakovaného sání

Klíšťata během sání sekretují velké množství proteinů do hostitele. Některé z těchto proteinů jsou imunogenní a indukují v hostiteli expresi specifických protilátek proti těmto klíštěcím slinným proteinům (obr. 17B, sloupec 1). Pokud je slinný protein imunodetekován, může tato detekce sloužit jako důkaz toho, že je protein skutečně sekretován do hostitele *in vivo* během sání klíštěte. Byly vybrány 4 slinné proteiny, včetně AC1, které byly podrobeny redukující SDS-PAGE a western blotu (Obr. 17). Přebílotované proteiny byly inkubovány se sérem, které pocházelo z králíka, na němž opakovaně sála klíšťata, a to s IG frakcí (ředění 1:100) v kombinaci s anti-sérem (1:1000). Jako kontrolní sérum bylo použito sérum z naivního králíka (ředění 1:1000). Zatímco G1 a IRS5 jsou detekovány i přirozenými protilátkami králíka, detekční imunoglobuliny detekující AC1 a IRS8 zřejmě mizí ze séra během opakovaného sání klíšťat. Tyto proteiny jsou sérem z opakovaného sání neimunodetekovatelné. Některé proteiny z klíštěcích slin jsou ale zřejmě imunogenní, protože jsou detekovatelné sérem z opakovaného sání klíšťat (Obr. 17).



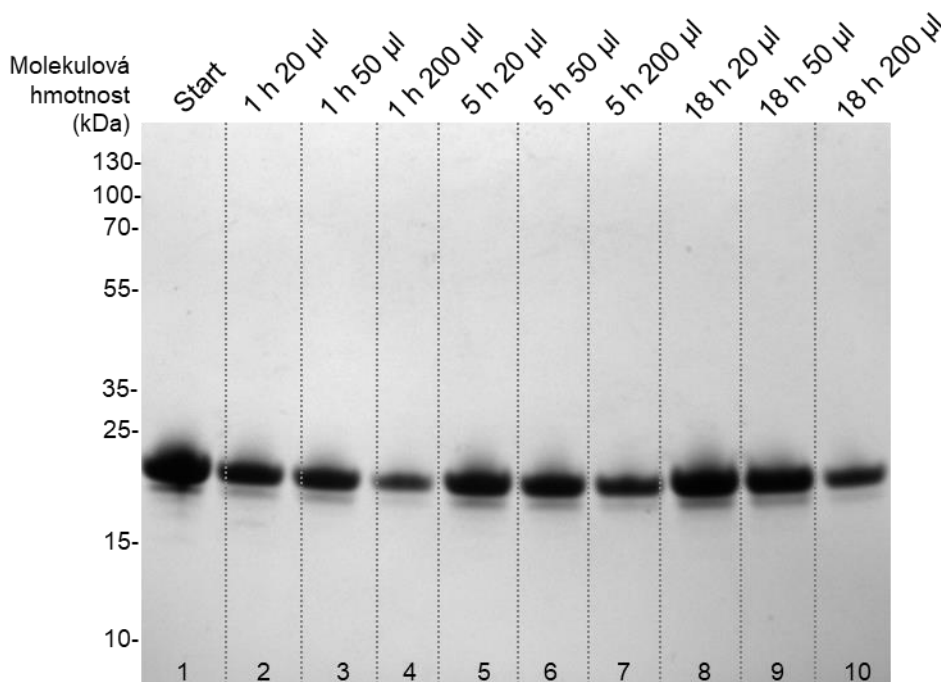
Obr. 17: Detekce AC1 pomocí séra z králíka, na němž opakovaně sála klíšťata pomocí western blot analýzy. Vzorek AC1 rekombinantu byl inkubován s králíčím sérem z králíka na němž opakovaně sála klíšťata a se sérem z králíka, na němž klíšťata nikdy nesála. Vzorky byly naneseny do gelu a pomocí redukující SDS-PAGE rozděleny podle své molekulové hmotnosti (horní obrázek). Po přeblování byla membrána rozdělena, první půlka inkubována s králíčím sérem z klíšťaty netknutého králíka (Obr. A), druhá půlka se sérem po opakovaném sání klíšťat (Obr. B). Následně byly obě části membrány inkubovány s protikrálíčí peroxidázovou protilátkou. Signál byl vyvolán chemiluminiscenčním substrátem Classico Luminata a vizualizován na Chemidoc.

5.13. Kovalentní interakce AC1 s hostitelskými proteiny

Jelikož některé serpiny, inhibitory serinových proteáz, tvoří kovalentní vazebné partnery s cílenými proteázami, bylo testováno i AC1, zda-li má kovalentního vazebného partnera v lidském a kravském séru či plazmě.

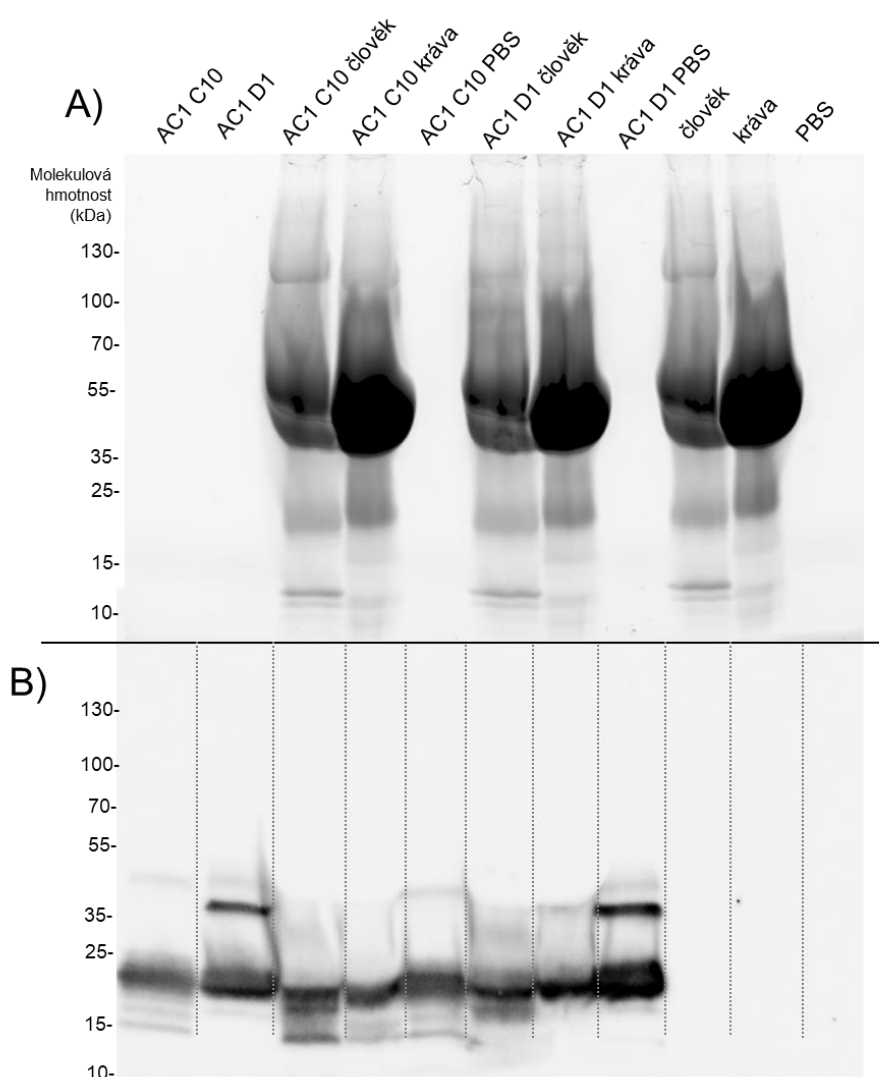
Pro optimalizaci metody vychytávání rekombinantu AC1 pomocí niklem nabitých agarózových kuliček byl udělán pilotní experiment. Bylo zjišťováno jaké množství kuliček (20, 50 nebo 200 μ l) a za jak dlouhou dobu (1, 5 a 18 h) bude nejvýhodnější použít pro vychytání co největšího množství rekombinantu. S růstem času vychytávání rostlo i

množství vychytaného proteinu (Obr. 18). Nejvýhodnější byl nejdelší časový interval 18 h (Obr. 18, sloupce 8–10). U množství kuliček byl efekt opačný. S větším objemem kuliček klesalo množství vychytaného proteinu. A tak použitím nejmenšího množství kuliček, které byly s rekombinantem inkubovány nejdelší zvolenou dobu, bylo možné vychytat největší množství rekombinantu z roztoku (Obr. 18, 18 h 20 μ l, sloupec 8).



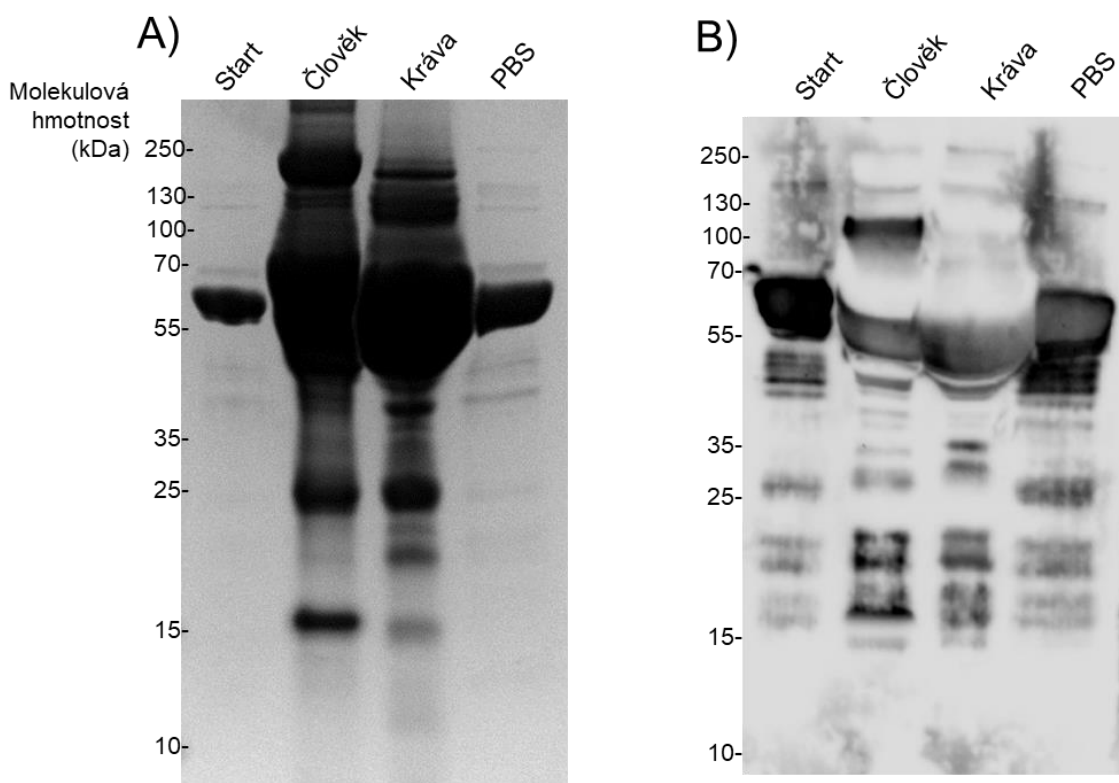
Obr. 18: Optimalizace metody vychytávání rekombinantu pomocí agarózových kuliček, nabitých niklem, analyzované pomocí western blotu. Pro oddělení proteinu od krevní plazmy byl využit vektorový his-tag úsek, který byl navázán na niklem nabitě agarózové kuličky. Při optimalizaci byly zvoleny dvě proměnné, množství použitých kuliček (20, 50 a 200 μ l) a doba inkubace (1, 5 a 18 h). Předem zvolený objem kuliček byl smíchán s 50 μ g AC1 rekombinantu (Start) a 1 ml PBS. Inkubace probíhala v chladové místnosti (4 $^{\circ}$ C) po předem zvolený časový interval. Poté byl od kuliček odebrán roztok PBS, byly promyty pomocí čistého PBS a produkty eluovány 30 μ l 1 M imidazolu. Eluce byly nanášeny do jamek SDS-PAGE gelu (NuPAGE, Novex), který byl po rozdělení proteinů při 100 V vizualizován na přístroji ChemiDoc.

Byla využita afinitní precipitace tagovaných proteinů pre-inkubovaných s hostitelskou plazmou či sérem. Vznik vazby byl vyhodnocen následným western blotem na his-tag. Byly použity dvě purifikační frakce AC1, zřejmě obsahující monomer (C10) a monomer i dimer (D1) AC1. Po inkubaci s hostitelskou plazmou se ukázalo, že mizí proužek ve velikosti cca 40 kDa (Obr. 19, sloupce 2 a 6–8). Dimerová forma AC1 je zřejmě degradována a netvoří žádný kovalentní komplex s hostitelskými proteiny (Obr. 19, sloupce 6–7). Ani monomerová forma AC1 neukázala žádné kovalentní interakce s proteiny v hostitelově plazmě (Obr. 19, sloupce 3–4).



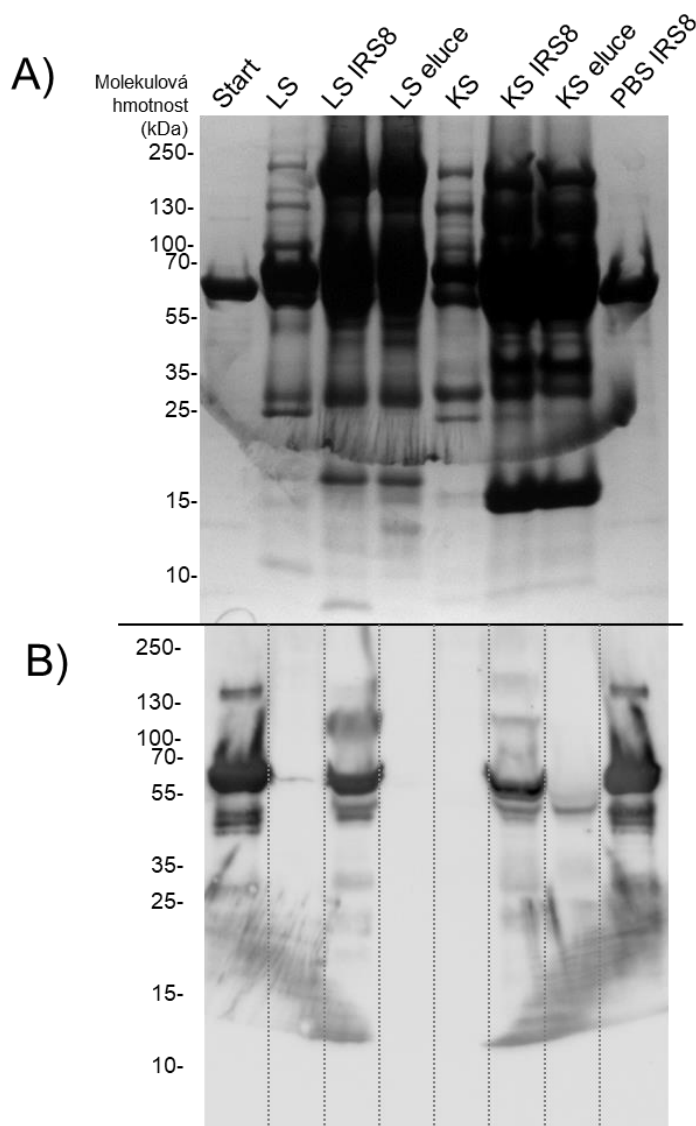
Obr. 19: Kovalentní interakce rekombinantu AC1 s proteiny v hostitelské plazmě analyzované pomocí western blotu. Dvě eluční frakce rekombinantního proteinu AC1 s his-tagem (C10 a D1) byly inkubovány s lidskou a kravskou krevní plazmou a PBS. Ke vzorkům byly přidány niklem nabitě agaróзовые kuličky a vzorky byly dále inkubovány. Poté byly kuličky promyty pomocí PBS a produkty eluovány 1M imidazolem. Proteiny z eluce, proteiny před inkubací a sérum z člověka a krávy byly rozděleny podle své molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE (Obr. A). Po přebílení byla membrána inkubována s anti-His primární protilátkou a protimyšší sekundární protilátkou konjugovanou s HRP. Signál z membrány byl vyvolán chemiluminiscenčním substrátem Classico Luminata a vizualizován (Obr. B) na Chemidoc.

Jako pozitivní kontrola byl použit klíčecí serpin, protein IRS8. U něho bylo ověřeno, že tvoří kovalentně vázaný komplex s molekulou v lidské plazmě (Obr. 20). Posun v molekulové hmotnosti proteinu IRS8 po inkubaci v lidské plazmě je o cca 50 kDa. Při inkubaci v krevní plazmě z krávy nebyly zaznamenány žádné interakce (Obr. 20).



Obr. 20: Kovalentní interakce rekombinantu IRS8 s proteiny v hostitelově plazmě analyzované pomocí western blotu. Rekombinantní protein IRS8 s his-tagem byl inkubován s lidskou a kravskou krevní plazmou a PBS. Ke vzorkům byly přidány niklem nabitě agarózové kuličky a vzorky byly dále inkubovány. Poté byly kuličky promyty pomocí PBS a produkty eluovány 1M imidazolem. Proteiny z eluce a protein před inkubací byly rozděleny podle své molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE (Obr. A). Po přebílení byla membrána inkubována s anti-His primární protilátkou a protimýšší sekundární protilátkou konjugovanou s HRP. Signál z membrány byl vyvolán chemiluminiscenčním substrátem Classico Luminata a vizualizován (Obr. B) na Chemidoc.

Protein IRS8 tvoří kovalentně vázaný komplex také s molekulou v lidském séru (Obr. 21). Posun v molekulové hmotnosti proteinu IRS8 po inkubaci v lidském séru je stejně velký jako v případě krevní plazmy, o cca 50 kDa. V krevním séru je kovalentního komplexu méně než v krevní plazmě. Při inkubaci v krevním séru z krávy nebyly zaznamenány žádné interakce (Obr. 21).



Obr. 21: Kovalentní interakce rekombinantu IRS8 s proteiny v hostitelově séru analyzované pomocí western blotu. Rekombinantní protein IRS8 s his-tagem byl inkubován s lidským sérem (LS), kravským krevním sérem (KS) a PBS. Ke vzorkům po inkubaci a ke vzorkům séra z člověka a krávy byly přidány niklem nabitě agarózové kuličky. Vzorky byly dále inkubovány. Poté byly kuličky promyty pomocí PBS a produkty eluovány 1M imidazolem. Proteiny z eluce, protein před inkubací a vzorky lidského a kravského séra byly rozděleny podle své molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE (Obr. A). Po přebílení byla membrána inkubována s anti-His primární protilátkou a protimýšší sekundární protilátkou konjugovanou s HRP. Signál z membrány byl vyvolán chemiluminiscenčním substrátem Classico Luminata a vizualizován (Obr. B) na Chemidoc.

6. Diskuze

Cílem mé práce bylo porovnat expresi deseti různých proteinů ve slinných žlázách klíštěte *I. ricinus* při sání na hostiteli s aktivní a inaktivovanou imunitní odpovědí. Expresi těchto proteinů byly porovnávány při sání klíštěte na živém organismu, s aktivními imunitními reakcemi, a na systému umělého sání, s tepelně inaktivovanou imunitou. Rozdíly v expresi genů jsem porovнала pomocí metody kvantitativní PCR (qPCR). Z těchto proteinů byl vybrán antikomplementový protein 1 (AC1), který vykazoval výrazný rozdíl v proteinové expresi při porovnání sání klíštěte na hostiteli s aktivní a inaktivovanou imunitou. Rozdíl v expresi proteinu AC1 jsem ověřila také pomocí semikvantitativní PCR. Tento protein jsem exprimovala jako rekombinant a podrobila důkladnější analýze.

Pro expresi samotného proteinu AC1 byly použity dva expresní vektory pET100, s His tagem, a SUMO, s His a SUMO tagem. SUMO tag je malý modifikátorový protein podobný ubiquitinu, který zvyšuje rozpustnost proteinu. Zvýšení výtěžnosti rozpustného proteinu při použití SUMO tagu jsem ověřila při pilotní expresi. Již dříve bylo u SUMO tagu pozorováno výrazné zvýšení exprese oproti jiným běžně využívaným tagům, jako jsou např. Ub, MBP, GST, TRX a NUS A. Přičemž tagy SUMO a NUS A měly také nejlepší schopnost zachování rozpustnosti proteinu (Semenov et al., 2014). Při použití SUMO vektoru byla výtěžnost rozpustného proteinu zvýšena použitím nižší teploty pro expresi a exprese menšího počtu buněk (nižší OD). Na rozdíl od pET100 vektoru, kdy se exprese rozpustného proteinu zvýšila při vyšší teplotě. Pro zvýšení exprese rozpustného proteinu se používá snížení teploty, což vede k pomalejší expresi proteinu, který má víc času na správné složení do prostorové struktury. Tímto způsobem by mělo být možné zvýšit expresi rozpustných rekombinantních proteinů (Gopal et al., 2011). S touto metodou se mé výsledky shodovaly pouze při použití SUMO vektoru. Exprimovaný protein byl ve dvou krocích purifikován. Při afinitní purifikaci proteinu po odštípnutí tagů se ukázalo, že i samotný protein AC1 má slabou afinitu k niklu. Pro dočištění proteinu byla použita purifikace metodou iontové chromatografie.

Klíště je svými slinami schopné inhibovat alternativní dráhu aktivace hostitelova komplementu, což mu umožňuje dosáhnout plného nasátí (Valenzuela et al., 2000; Ribeiro et al., 1989). Proto jsem testovala přítomnost antikomplementového proteinu AC1 ve slinných žlázách klíšťat označením proteinů sérem se specifickými protilátkami pomocí western blot analýzy. Kromě již testovaného sání, na králíkovi a v systému umělého sání, byla přítomnost

AC1 testována také u morčete a nenasátých dospělých samic klíštěte. U dospělých samic sajících na králíkovi byla detekována zvýšená exprese proteinu AC1 oproti nenasátým klíšťatům a u klíšťat sajících na umělých membránách byla hladina proteinu stejná jako u nenasátých jedinců. Naopak u dospělců klíšťat sajících na morčatech došlo ke snížení množství signálu proteinu AC1. To naznačuje, že aktivita AC1 může být ovlivněna typem hostitele. Při porovnání slinných proteomů z nymf *I. scapularis* sajících na morčeti nebo myši byly zjištěny rozdíly ve složení proteinů (Narasimhan et al., 2019). Část proteázových inhibitorů a kolagenních sekretovaných proteinů bylo výrazně více exprimováno při sání klíšťat na morčeti, oproti sání na myši. U klíštěcích antikomplementů IRAC I a IRAC II byly porovnávány inhibiční aktivity proti komplementu různých hostitelských druhů (Schroeder et al., 2007). Při testování na lidském komplementu byl IRAC I o něco aktivnější než IRAC II a srovnatelně inhibovaly psí komplement. Při testování na ovčích, prasečích a koňských sérech byl IRAC I lepší inhibitor než IRAC II, ale opačný výsledek byl pozorován u bažantího séra. To naznačuje, že rozsah hostitelů klíštěte *I. ricinus* koreluje se schopností slin klíštěte inhibovat aktivaci alternativní cesty komplementu právě podle hostitelského druhu (Lawrie et al., 1999). Při porovnání dvou vývojových stádií, nymf a dospělých samic, kdy obě skupiny sály na králíkovi, nebyla u nymf zjištěna žádná exprese proteinu AC1, a to i během delšího časového intervalu sání (až 6 dní). Domnívám se, že konkrétně AC1 není u nymf dominantně exprimovaný nebo je dominantní při sání nymf na jiném druhu hostitele. Jeho funkci v tomto případě může zastupovat některý z AC paralogů. Nepřítomnost AC1 u nymf potvrzuje také studie Kotsyfakise et al. (2015), který provedl transkriptomový rozbor slinných žláz jak dospělců, tak nymf klíšťat sajících na králíkovi. Naopak dominantnějším u nymf byl prokázán antikomplement IxAC-B5 (Kotsyfakis et al., 2015).

Klíštěcí sliny obsahují látky regulující zánět v hostitelově těle a potlačující vrozenou i získanou imunitu (Wikel, 1996). U *R. appendiculatus* byly detekovány, pomocí metody western blot s použitím králíčího séra, imunogenní proteiny (Willadsen a Jongejan, 1999). Během své práce jsem otestovala schopnost detekce rekombinantních proteinů, AC1, cystatinu G1, serpinů IRS5 a IRS8 ze slin klíštěte *I. ricinus*, imunitním systémem hostele. K testu jsem použila králíka, na kterém opakovaně sála klíšťata a králíka bez předchozího kontaktu s klíštětem. Zjistila jsem, že rekombinantní proteiny AC1, cystatin G1, serpiny IRS5 a IRS8 je možné všechny detekovat sérem z naivního králíka. Ovšem u králíka, na němž opakovaně sála klíšťata, bylo pomocí séra možné detekovat pouze proteiny G1 a IRS5. U proteinů AC1 a IRS8 detekovatelnost po opakovaném sání klíšťat mizí. Imunoglobuliny detekující IRS8 se například mohou navázat na jiný protein obsažený ve slinách klíštěte, jak

bylo popsáno u *R. appendiculatus* (Wang a Nuttall, 1995). Tento protein, který jsem detekovala proužkem o molekulové hmotnosti cca 100 kDa, je výrazně značený sérem z opakovaného sání. Další možností je například, že tento výrazně detekovaný protein je silný antigen. V těle hostitele by tedy docházelo k mohutné tvorbě protilátek a jejich vazba s proteinem by poté přešla signál ostatních proteinů na membráně. Rekombinant AC1 nemusí být sám příliš imunogenní. Jeho homolog IRAC je rozpustný jednovazebný antigen. U něhož je možné, že jednovazebné spojení s receptorem B buněk indukuje aktivaci receptoru, ale nepodporuje prezentaci antigenu. Je to jedinečný jev, o němž se předpokládá, že indukuje stav tolerance B buněk (Kim et al, 2006; Gillet et al., 2009). Tímto mechanismem může dojít ke snížení imunogenicity proteinu AC1 i při opakovaném sání klíšťat na hostiteli. AC1 není detekován, přestože jsem v této práci prokázala zvyšování exprese proteinu AC1 ve slinných žlázách klíštěte při prodlužování doby sání.

Klíšťata aktivně zasahují do hostitelových imunoregulačních drah za účelem utlumení hostitelské imunity. Jeden z možných mechanismů je kovaltní vazba klíštěcích inhibitorových molekul na hostitelské imunitní a koagulační proteiny (Wikel a Bergman, 1997). Serpiny, proteázové inhibitory, tvoří velkou skupinu proteinů, které se uplatňují například při regulaci procesů během zánětu. U serpinu IRS8 jsem testovala přítomnost kovalentních vazeb s molekulami z lidské krevní plazmy i krevního séra. V krevním séru bylo zjištěno méně kovalentního komplexu než v krevní plazmě. Domnívám se, že IRS8 kovalentně váže některou ze složek koagulační kaskády. Možnými kandidáty jsou např. thrombin, prothrombin, fibrinogen, proakcelerin, prokonvertin, Hagemanův faktor nebo antihemofilický faktor (Hořejší a Bartůňková, 2002). Přičemž rozdíl ve velikostech nenávaného a navázaného IRS8 odpovídá velikosti prokonvertinu, neboli Faktoru VII, což je jednořetězcový glykoprotein o MW 50 kDa (Hedner, 2015). Kovalentní interakce serpinů potvrzuje například serpin PC u kraba kamčatského (*Paralithodes camtschaticus*). U rekombinantního serpinu PC byla prokázána inhibiční aktivita proti kravskému proteinu (bovine cationic trypsin), kdy reakce probíhá tvorbou stabilního kovalentního komplexu (Kostin et al., 2018). Oproti serpinům, v případě kovalentních interakcí proteinu AC1 s proteiny z hostitelovy plazmy nebyli objeveni žádní kovalentně vazební partneři. Proto se domnívám, že AC1 váže svého vazebného partnera z hostitelovy plazmy nekovalentně.

7. Závěr

V této práci byla potvrzena rozdílná exprese transkriptů ze slinných žláz *I. ricinus*, při sání na živém hostiteli a v systému umělého sání. Antikomplementový protein AC1 byl dále zkoumán. Jeho rekombinantní forma, exprimovaná v *E. coli*, byla purifikována. Tím byl získán protein o dostatečné čistotě pro imunizační účely. Následně bylo získáno specifické anti-sérum detekující protein AC1. Za pomoci této imunodetekce byla provedena kvantifikační western blot analýza s nymfami klíšťat. Ve slinných žlázách nymf nebyl protein AC1 prokázán. Imunodetekce AC1 ve slinných žlázách dospělých klíšťat, která sála na různých hostitelích, ukázala vyšší expresi AC1 při sání na králíkovi než při sání na membráně nebo v nenasátých klíšťatech. V klíšťatech sajících na morčeti nebyl AC1 exprimován vůbec. Dále bylo zjišťováno, zda má AC1 nějaké kovalentně vazebné partnery v krevním séru nebo plazmě hostitele. Žádné kovalentní interakce AC1 s proteiny z hostitelovy plazmy nebo séra jsme neobjevili. Na závěr byla ověřována imunodetekovatelnost proteinu AC1 pomocí séra z králíka, na němž opakovaně sála klíšťata, přičemž bylo zjištěno, že tímto sérem AC1 detekovatelný není.

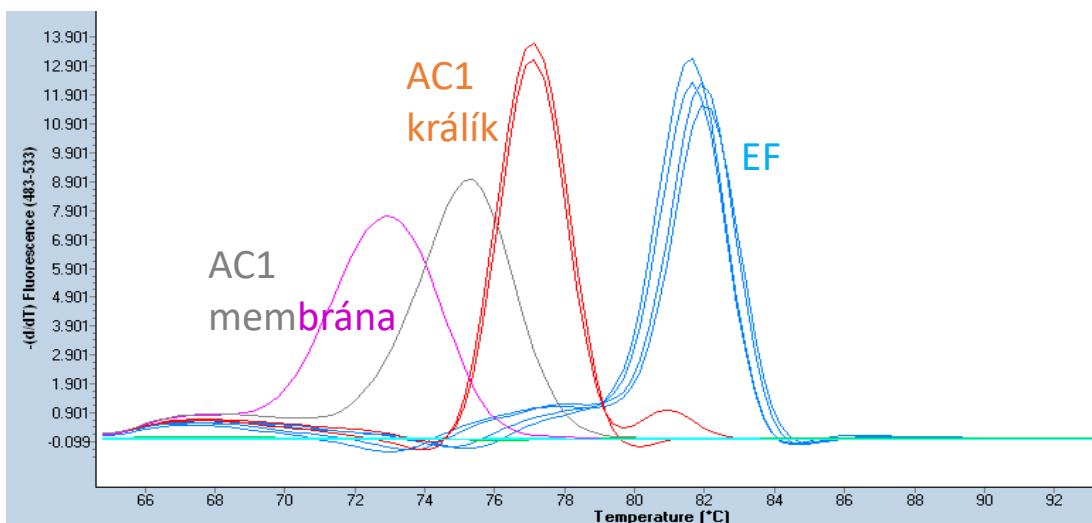
8. Seznam použité literatury

- Barros, V. C., Assumpção, J. G., Cadete, A. M., Santos, V. C., Cavalcante, R. R., Araújo, R. N., Pereira, M. H., Gontijo, N. F. (2009): The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of Triatomines and Mosquitoes. *PLoS ONE* 4: e6047.
- Botto, M., Kirschfink, M., Macor, P., Pickering, M. C., Würzner, R., Tedesco, F. (2009): Complement in human diseases: Lessons from complement deficiencies. *Molecular Immunology* 46: 2774–2783.
- Cavalcante, R. R., Pereira, M. H., Gontijo, N. F. (2003): Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology* 127: 87–93.
- Couvreur, B., Beaufays, J., Charon, C., Lahaye, K., Gensale, F., Denis, V., Charlotteaux, B., Decrem, Y., Prévôt, P. P., Brossard, M., Vanhamme, L., Godfroid, E. (2008): Variability and Action Mechanism of a Family of Anticomplement Proteins in *Ixodes ricinus*. *PLoS ONE* 3: e1400.
- Daix, V., Schroeder, H., Praet, N., Georgin, J. P., Chiappino, I., Gillet, L., de Fays, K., Decrem, Y., Leboulle, G., Godfroid, E., Bollen, A., Pastoret, P. P., Gern, L., Sharp, P. M., Vanderplasschen, A. (2007): *Ixodes* ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex encode a family of anticomplement proteins. *Insect Molecular Biology* 16: 155–166.
- Dörrbecker, B., Dobler, G., Spiegel, M., Hufert, F. T. (2010): Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Medicine and Infectious Disease* 8: 213–222.
- Fearon, D. T., Austen, K. F. (1975): Properdin: initiation of alternative complement pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72: 3220–3224.
- Francischetti, I. M. B., Sá-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M., Ribeiro, J. M. C. (2009): The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 14: 2051–2088.
- George, J. N., Li, X., McMin, J. R., Terrell, D. R., Vesely, S. K., Selby, G. B. (2004): Thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome following allogeneic HPC transplantation: a diagnostic dilemma. *Transfusion* 2: 294–304.
- Gillet, L., Schroeder, H., Mast, J., Thirion, M., Renaud, J. C., Dewals, B., Vanderplasschen, A. (2009): Anchoring tick salivary anticomplement proteins IRAC I and IRAC II to membrane increases their immunogenicity. *Veterinary Research* 40:51.
- Gopal, K., Agarwal, S., Dixit, A. (2011): High level of soluble expression and purification of catalytically active native UDP-galactose 4-epimerase of *Aeromonas hydrophila* in *E. coli*. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 2: 397–403.
- Hedner, U. (2015): Recombinant activated factor VII: 30 years of research and innovation. *Blood Reviews* 1: 4–8.
- Hepburn, N. J., Williams, A. S., Nunn, M. A., Chamberlain-Banoub, J. C., Hamer, J., Morgan, B. P., Harris, C. L. (2007): In vivo characterization and therapeutic efficacy of a C5-specific inhibitor from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of Biological Chemistry* 282: 8292–8299.
- Hovius, J. W. R., Levi, M., Fikrig, E. (2008): Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. *PLoS Medicine* 5: e43.
- Hovius, J. W. R., van Dam, A. P., Fikrig, E. (2007): Tick-host-pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends in Parasitology* 23: 434–438.
- Hořejší, V., Bartůňková, J. (2002): *Základy imunologie* (2. vyd.). Praha: Triton.
- Jongejan, F., Uilenberg, G. (2004): The global importance of ticks. *Parasitology* 129: 3–14.
- Jore, M. M., Johnson, S., Sheppard, D., Barber, N. M., Li, Y. I., Nunn, M. A., Elmlund, H., Lea, S. M. (2016): Structural basis for therapeutic inhibition of complement C5. *Nature Structural and Molecular Biology* 23: 378–386.
- Kim, Y. M., Pan, J. Y. J., Korb, G. A., Peperzak, V., Boes, M., Ploegh, H. L. (2006): Monovalent ligation of the B cell receptor induces receptor activation but fails to promote antigen presentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 3327–3332.
- Kostin, N. N., Bobik, T. V., Shurdova, E. M., Ziganshin, R. H., Surina, E. A., Shagin, D. A., Shagina, I. A., Knorre, V. D., Isaev, V. A., Rudenskaya, G. N., Gabibov, A. G., Smirnov, I. V. (2018): Cloning and characterization of serpin from red king crab *Paralithodes camtschaticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 81: 99–107.

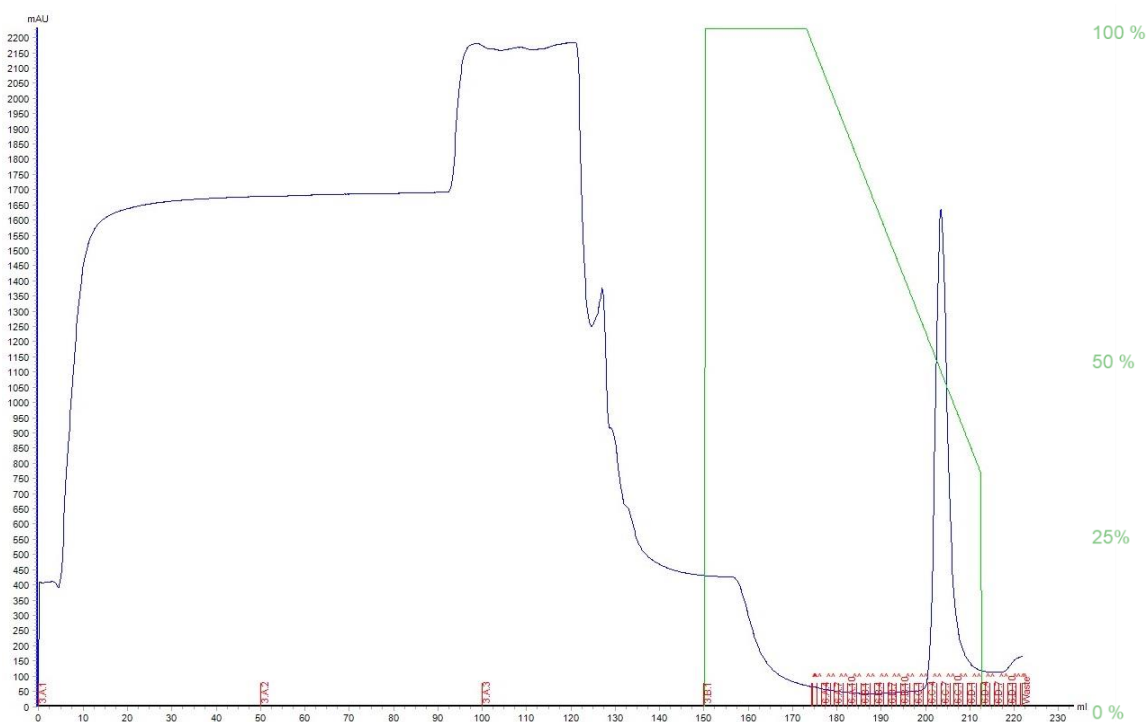
- Kotsyfakis, M., Schwarz, A., Erhart, J., Ribeiro, J. M. C. (2015): Tissue- and time-dependent transcription in *Ixodes ricinus* salivary glands and midguts when blood feeding on the vertebrate host. *Scientific Reports* 5: 1–10.
- Kröber, T., Guerin, P. M. (2007): *In vitro* feeding assays for hard ticks. *Trends in Parasitology* 23: 445–449.
- Kuhn, N., Schmidt, C. Q., Schlapschy, M., Skerra, A. (2016): PASylated Coversin, a C5-Specific Complement Inhibitor with Extended Pharmacokinetics, Shows Enhanced Anti-Hemolytic Activity in Vitro. *Bioconjugate Chemistry* 27: 2359–2371.
- Labuda, M., Jones, L. D., Williams, T., Danielová, V., Nuttall, P. A. (1993): Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *Journal of medical entomology* 30: 295–299.
- Lawrie, C. H., Randolph, S. E., Nuttall, P. A. (1999): *Ixodes* ticks: Serum species sensitivity of anticomplement activity. *Experimental Parasitology* 93: 207–214.
- Lawrie, C. H., Sim, R. B., Nuttall, P. A. (2005): Investigation of the mechanisms of anti-complement activity in *Ixodes ricinus* ticks. *Molecular Immunology* 42: 31–38.
- Liebman, H. A., Feinstein, D. I. (2003): Thrombosis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is associated with markedly elevated plasma levels of leukocyte-derived tissue factor. *Thrombosis Research* 111: 235–238.
- Mansfield, K. L., Johnson, N., Phipps, L. P., Stephenson, J. R., Fooks, A. R., Solomon, T. (2009): Tick-borne encephalitis virus - A review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology* 90: 1781–1794.
- Matsushita, M., Endo, Y., Hamasaki, N., Fujita, T. (2001): Activation of the lectin complement pathway by ficolins. *International Immunopharmacology* 1: 359–363.
- Mendes-Sousa, A. F., Nascimento, A. A. S., Queiroz, D. C., Vale, V. F., Fujiwara, R. T., Araújo, R. N., Pereira, M. H., Gontijo, N. F. (2013): Different host complement systems and their interactions with saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* promastigotes. *PLoS ONE* 8: e79787.
- Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacamu, G., Canto, G. J. (2012): Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry* 19: 1504–1518.
- Munderloh, U. G., Kurtti, T. J. (1995): Cellular and molecular interrelationships between ticks and prokaryotic tick-borne pathogens. *Annual Review of Entomology* 40: 221–243.
- Nangaku, M., Nishi, H., Fujita, T. (2007): Pathogenesis and prognosis of thrombotic microangiopathy. *Clinical and Experimental Nephrology* 11: 107–114.
- Narasimhan, S., Booth, C. J., DePonte, K., Wu, M. J., Liang, X., Mohanty, S., Kantor, F., Fikrig, E. (2019): Host-specific expression of *Ixodes scapularis* salivary genes. *Ticks and Tick-Borne Diseases* 10: 386–397.
- Nunn, M. A., Sharma, A., Paesen, G. C., Adamson, S., Lissina, O., Willis, A. C., Nuttall, P. A. (2005): Complement Inhibitor of C5 Activation from the Soft Tick *Ornithodoros moubata*. *The Journal of Immunology* 174: 2084–2091.
- Ooi, C. P., Haines, L. R., Southern, D. M., Lehane, M. J., Acosta-Serrano, A. (2015): Tsetse GmmSRPN10 Has Anti-complement Activity and Is Important for Successful Establishment of Trypanosome Infections in the Fly Midgut. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9: e3448.
- Perner, J., Kropáčková, S., Kopáček, P., Ribeiro, J. M. C. (2018): Sialome diversity of ticks revealed by RNAseq of single tick salivary glands. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 12: e0006410.
- Perner, J., Provazník, J., Schrenková, J., Urbanová, V., Ribeiro, J. M. C., Kopáček, P. (2016): RNA-seq analyses of the midgut from blood- and serum-fed *Ixodes ricinus* ticks. *Scientific Reports* 6: 1–18.
- Pospíšilová, T., Urbanová, V., Hes, O., Kopáček, P., Hajdušek, O., Šíma, R. (2019): Tracking of *Borrelia afzelii* transmission from infected *Ixodes ricinus* nymphs to mice. *Infection and Immunity*.
- Radolf, J. D., Caimano, M. J., Stevenson, B., Hu, L. T. (2012): Of ticks, mice and men: Understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nature Reviews Microbiology* 10: 87–99.

- Rand, K. N., Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P., Cobon, G. S. (1989): Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 9657–9661.
- Ribeiro, J. M. C. (1989): Role of saliva in tick/host interactions. *Experimental & Applied Acarology* 7: 15–20.
- Ribeiro, J. M. C. (1995): How ticks make a living. *Parasitology Today* 11: 91–93.
- Ribeiro, J. M. C., Alarcon-Chaidez, F., Ivo, I. M., Mans, B. J., Mather, T. N., Valenzuela, J. G., Wikel, S. K. (2006): An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 111–129.
- Ricklin, D., Lambris, J. D. (2007): Complement-targeted therapeutics. *Nature Biotechnology* 25: 1265–1275.
- Schroeder, H., Daix, V., Gillet, L., Renaud, J. C., Vanderplasschen, A. (2007): The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species. *Microbes and Infection* 9: 247–250.
- Schwarz, A., Von Reumont, B. M., Erhart, J., Chagas, A. C., Ribeiro, J. M. C., Kotsyfakis, M. (2013): De novo *Ixodes ricinus* salivary gland transcriptome analysis using two next-generation sequencing methodologies. *FASEB Journal* 27: 4745–4756.
- Semenov, S. V., Nikhamkin, M. S., Korepanova, O. V., Berendorf, Y. A. (2006): Experimental investigation of rotor dynamics in aircraft engine with two-axis stiffness anisotropy of supports. *Protein Science* 15: 182–189.
- Smith, L. C., Azumi, K., Nonaka, M. (1999): Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways. *Immunopharmacology* 42: 107–120.
- Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Caffrey, C. R., Mareš, M., Kopáček, P. (2013): New insights into the machinery of blood digestion by ticks. *Trends in Parasitology* 29: 276–285.
- Sojka, D., Pytelková, J., Perner, J., Horn, M., Konvičková, J., Schrenková, J., Mareš, M., Kopáček, P. (2016): Multienzyme degradation of host serum albumin in ticks. *Ticks and Tick-borne Diseases* 7: 604–613.
- Sonenshine, D. E. (1991): *Biology of Ticks* (1. vyd.). New York: Oxford university Press.
- Tyson, K. R., Elkins, C., Patterson, H., Fikrig, E., de Silva, A. M. (2007): Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect Molecular Biology* 16: 469–479.
- Tyson, K. R., Elkins, C., de Silva, A. M. (2008): A Novel Mechanism of Complement Inhibition Unmasked by a Tick Salivary Protein That Binds to Properdin. *The Journal of Immunology* 180: 3964–3968.
- Valenzuela, J. G., Charlab, R., Mather, T. N., Ribeiro, J. M. C. (2000): Purification, Cloning, and Expression of a Novel Salivary Anticomplement Protein from the Tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry* 275: 18717–18723.
- Wang, H., Nuttall, P. A. (1995): Immunoglobulin G binding proteins in male *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Parasite immunology* 17: 517–524.
- Weston-Davies, W., Coullin, I., Schnyder, S., Schnyder, B., Moser, R., Lissina, O., Paesen, G. C., Nuttall, P., Ryffel, B. (2005): Arthropod-derived protein EV131 inhibits histamine action and allergic asthma. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1056: 189–196.
- Wikel, S. K. (1996): Host immunity to ticks. *Annual Review of Entomology* 41: 1–22.
- Wikel, S. K., Bergman, D. (1997): Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities. *Parasitology Today* 13: 383–389.
- Willadsen, P., Jongejan, F. (1999): Immunology of the Tick–Host Interaction and the Control of Ticks and Tick-borne Diseases. *Parasitology Today* 15: 258–262.
- Willadsen, P., Riding, G. A., McKenna, R. V., Kemp, D. H., Tellam, R. L., Nielsen, J. N., Lahnstein, J., Cobon, G. S., Gough, J. M. (1989): Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *The Journal of Immunology* 143: 1346–1351.

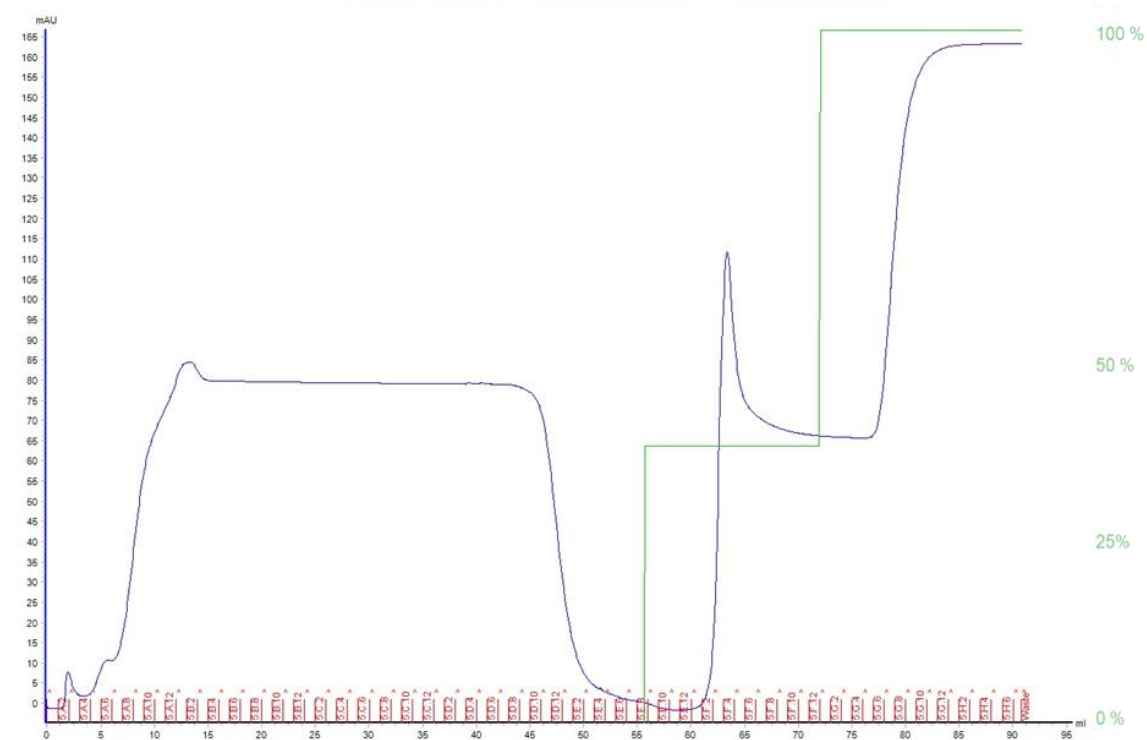
9. Příloha



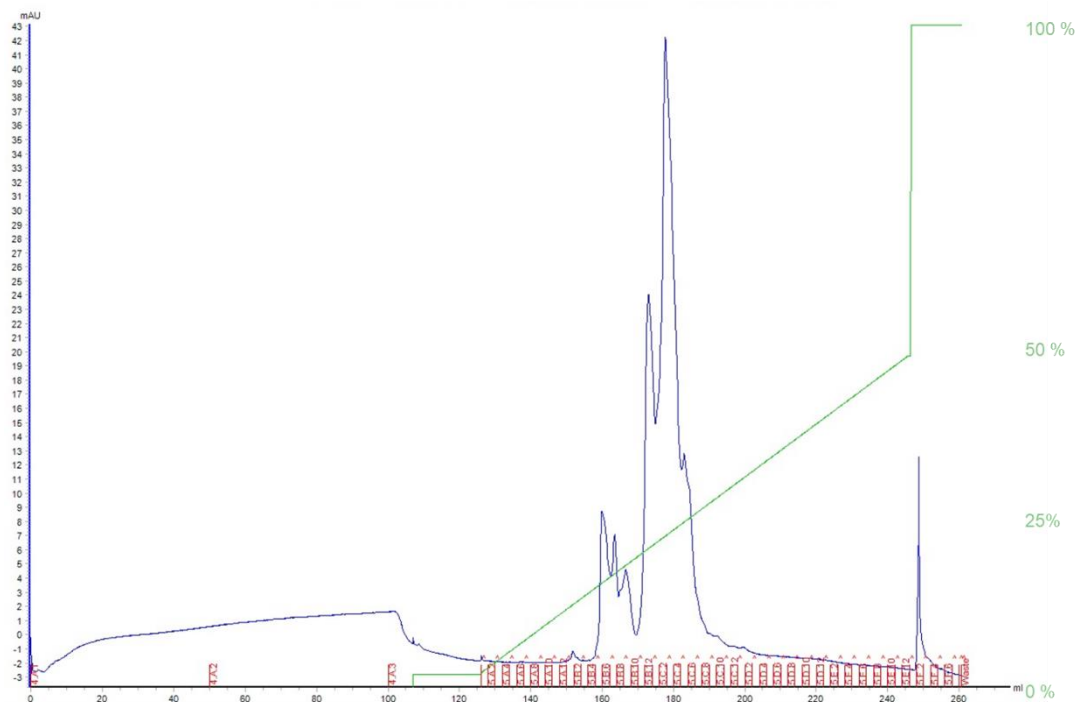
Příloha 1: Srovnání křivek tání PCR ampliconů ze slinných žláz klíštat, která sála na králíkovi a na umělé membráně, metodou PCR. Byly použity specifické primery pro elongační faktor (EF, modrá čára) a pro antikomplement 1 (AC1, červená, šedá a fialová čára). Rozdílné křivky tání, při použití AC1 primerů, z templátu ze slinných žláz klíštat sajících na králíkovi (červená čára) a na systému umělého sání (šedá a fialová čára). V systému umělého sání byla králičí krev tepelně imunitně inaktivována. Při použití EF primerů jsou křivky tání téměř shodné. Doplnkový obrázek k Obr. 3B.



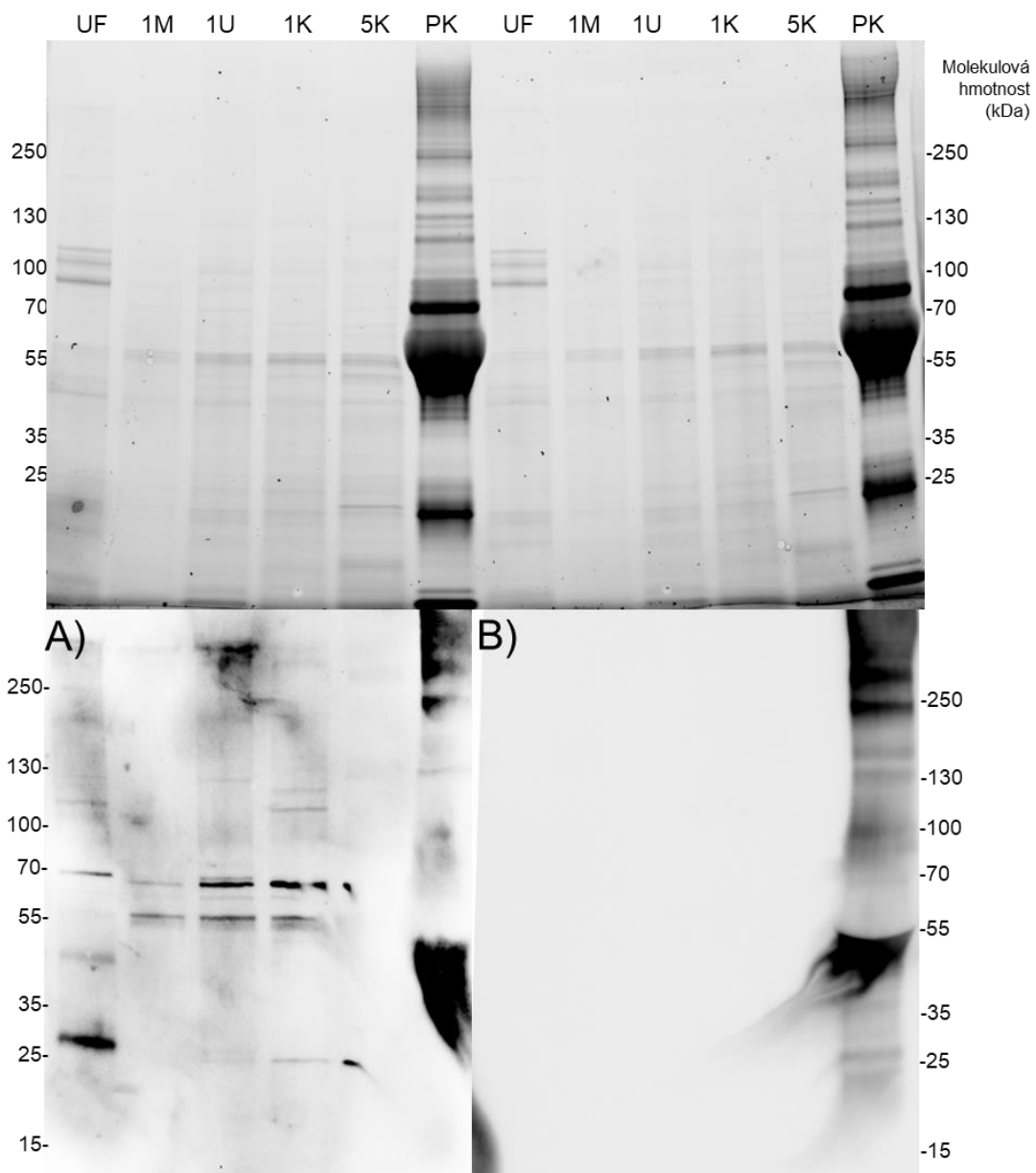
Příloha 2: Chromatogram afinitní purifikace rekombinantu AC1 na niklové koloně. Graf závislosti absorbance (Milli absorbance unit, mAU) na objemu kapaliny (ml), která protekla, niklem nabitou, purifikační kolonou. Modrá čára označuje absorbanci, červené značky označují sbírané frakce a zelená čára ukazuje procento promývacího pufru 2 vůči elučnímu pufru 1 (Tab. 5). Při zhruba 200 mM imidazolu dochází k eluci rekombinantu, vrchol při cca 290 ml. Doplnkový obrázek k Obr. 10.



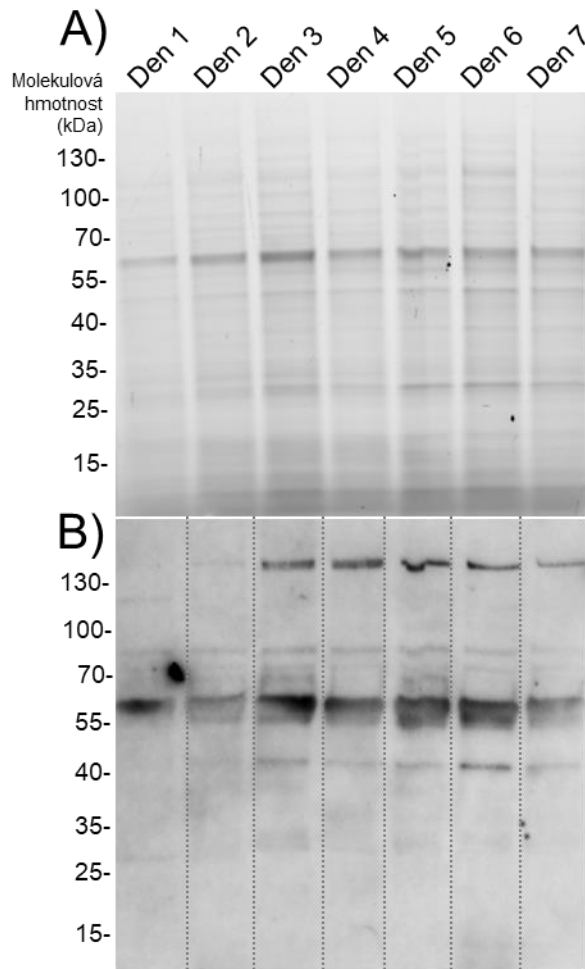
Příloha 3: Chromatogram z afinitní purifikace rekombinantu AC1, po štípání proteázou, na niklové koloně. Graf závislosti absorbance (Milli absorbance unit, mAU) na objemu kapaliny (ml), která protekla, niklem nabitou, purifikační kolonou. Modrá čára označuje absorbanci, červené značky označují sbírané frakce a zelená čára ukazuje procento elučního pufru 2 (Tab. 5). Doplnkový obrázek k Obr. 10.



Příloha 4: Chromatogram z iontové purifikace rekombinantu AC1. Graf závislosti absorbance (Milli absorbance unit, mAU) na objemu kapaliny (ml), která protekla miliQ purifikační kolonou. Iontové chromatografii proběhla s použitím kolony (Mono Q HR 5/5) equilibrované 20 mM Tris (pH=8) a eluované v gradientu elučního pufru (20 mM Tris, 1 M NaCl, pH=8). Modrá čára označuje absorbanci, červené značky označují sbírané frakce a zelená čára označuje gradient elučního pufru (0-50% a poté 100%). Doplnkový obrázek k Obr. 11.



Příloha 5: Ověření specifity sekundární protikráličí protilátky pomocí western blotu. Pro experiment byly použity homogenáty slinných žláz z nenasátých (UF) klíšťat, která sála 1 den na morčeti (M), byla 1 den krmena přes membránu (U), sála 1 nebo 5 dní na králíkovi (K). Jako pozitivní kontrola (PK) byla použita primární AC1 protilátka. Vzorky byly nanášeny do gelu dvakrát za sebou a pomocí redukující SDS-PAGE rozděleny podle své molekulové hmotnosti (horní obrázek). Po přebílení byla membrána rozdělena napůl. První půlka (Obr. A) byla inkubována s AC1 primární protilátkou a protikráličí sekundární protilátkou konjugovanou s HRP. Druhá půlka byla inkubována pouze se sekundární protikráličí protilátkou (Obr. B). Signál z obou půlek membrán byl vyvolán chemiluminiscenčním substrátem Classicco Luminata a vizualizován na Chemidoc.



Příloha 6: Detekce proteinů ve slinných žlázách pomocí séra z králíka, na němž nikdy nesála klíšťaťata, pomocí western blot analýzy. Porovnání exprese proteinů ve slinných žlázách dospělých samic sajících 1–7 dní na králíkovi. Homogenáty slinných žláz byly v gelu rozděleny podle své molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE (Obr. A). Přebílotované vzorky byly inkubovány se sérem z králíka, na němž nikdy nesála klíšťaťata (ředění 1:1000) a protikráličí sekundární protilátkou (ředění 1:20000) konjugovanou s HRP. Signál byl vyvolán chemiluminiscenčním substrátem Classico Luminata a vizualizován (Obr. B) na Chemidoc. Kontrolní obrázek k Obr. 16.