

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Molekulární charakterizace NADPH oxidázy
ve střevě klíštěte *Ixodes ricinus*

Bakalářská práce

Matěj Kučera

Školitel: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

Školitel specialista: Mgr. Jan Perner

České Budějovice 2012

Bakalářská práce

Kučera M., 2012: Molekulární charakterizace NADPH oxidázy ve střevě klíštěte *Ixodes ricinus*. [Molecular characterization of NADPH oxidase in the gut of the tick *Ixodes ricinus*. Bc. Thesis, in Czech] - 44 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This thesis focuses on characterization of one member of NADPH oxidases - dual oxidase (DUOX) which has been described as the main factor of epithelial immunity in the gut of model organism *Drosophila melanogaster*. We have identified an orthologous gene coding for DUOX in the tick *I. ricinus* and described its tissue expression profile. The DUOX is mainly expressed in the gut of unfed ticks and seems to be downregulated upon artificial microbial infection. A fragment of tick DUOX was prepared as recombinant protein and used for preparation of specific antibodies to be used for further characterization of the enzyme. Our main aim is to highlight the importance of tick DUOX producing the reactive oxygen species and their role in the defence against pathogenic organisms within the tick gut.

Tato práce byla financována z grantu číslo - P506/10/2136 (GAČR)

Prohlášení:

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

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

V Českých Budějovicích 25. dubna 2012.

Poděkování:

V této části práce bych rád poděkoval některým osobám, bez kterých by tato práce nevznikla. Nejprve bych chtěl poděkovat panu RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc. za přijetí ve své laboratoři a jeho odborné vedení během mých laboratorních pokusů o pokusy. Velké díky patří Mgr. Honzovi Pernerovi za jeho bezbřehou trpělivost při vedení mé bakalářské práce a za neúnavné a sofistikované zodpovídání mých rafinovaných otázek. Dále bych chtěl poděkovat všem ostatním lidem z laboratoře Verče, Zdeňkovi, Danovi, Radkovi a dalším, za příjemnou atmosféru a ochotu kdykoliv pomoci. Obrovský dík patří celé mé rodině, která mě po celou dobu studia neustále psychicky i materiálně podporuje. Děkuji přítelkyni Hance a všem svým přátelům, kteří se korekturou textu nebo svými kritickými názory nepřímo podíleli na vzniku této práce

Obsah

1. Úvod a literární přehled.....	1
1.1. Klíšťata	1
1.2. Mikroby a jejich přenos	1
1.3. Imunita klíšťete.....	4
1.4. Malpighické trubice.....	4
1.5. Imunita slinných žláz.....	4
1.6. Hemocoelová imunita.....	4
1.7. Thioesterové proteiny (TEP).....	5
1.8. <i>I. ricinus</i> α_2 -makroglobulin (IrAM)	5
1.9. Imunita ve střevě	5
1.10. Hemoglobinové fragmenty	6
1.11. Defensiny	6
1.12. Lysozomy.....	7
1.13. Redoxní rovnováha.....	7
1.14. NADPH oxidáza (NOX).....	9
1.15. Duální oxidáza (DUOX).....	11
2. Materiál a metody	13
2.1. Použité chemikálie a primery.....	13
2.2. Získání sekvence DUOX <i>I. ricinus</i>	14
2.3. Izolace totální RNA.....	14
2.4. Tvorba cDNA.....	15
2.5. Polymerázová řetězová reakce.....	15
2.6. Klonování fragmentu do pCR4 vektoru, transformace do One Shot [®] TOP10 chemicky kompetentních <i>E. coli</i> , sekvenace	15
2.7. Zaklonování fragmentu DUOX do expresního vektoru pET100, transformace do One Shot [®] TOP10 chemicky kompetentních <i>E. coli</i>	16
2.8. Zatransformování DUOX fragmentu do expresních BL21 buněk, exprese rekombinantního fragmentu DUOX	17

2.9. Izolace inkluzních tělísek z bakteriální kultury	18
2.10. Purifikace proteinu	18
2.11. Bradford assay.....	18
2.12 Renaturace rekombinantního proteinu	19
2.13. Western blot	19
2.14. Příprava homogenátů ze střev klíštěte <i>I. ricinus</i>	20
2.15. Příprava králičích polyklonálních protilátek a kontrola jejich afinity	21
2.16. Dot blot	22
2.17. Kultivace bakterií	22
2.18. Kapilární infekce klíšťat	22
2.19. Kvantifikace patogenů	23
2.20. Tkáňový profil, Real-time PCR	24
3. Výsledky.....	25
3.1. Identifikace genu pro DUOX v genomu <i>I. scapularis</i> (Is DUOX).....	25
3.2. Identifikace ortologu DUOX v klíštěti <i>I. ricinus</i> (Ir DUOX).....	26
3.3. Tkáňový profil transkripce DUOX ve střevě, slinných žlázách a vaječnicích klíštěte <i>I. ricinus</i>	28
3.4. Exprese rekombinantního proteinu	29
3.5. Detekce rekombinantního proteinu v inkluzních tělískách	29
3.6. Purifikace rekombinantního His-tag fragmentu.....	30
3.7. Kontrola preimunních sér králíků určených pro imunizaci	31
3.8. Příprava králičích polyklonálních protilátek a kontrola jejich specifity	32
3.9. Vliv přítomnosti patogenů na regulaci transkripce genu pro DUOX.....	33
4. Diskuze	34
5. Závěr	37
6. Seznam literatury	38
7. Příloha	42

Cíle práce:

- Identifikace genu pro DUOX u klíštěte *Ixodes ricinus*
- Popsat expresi DUOX v jednotlivých tkáních *I. ricinus*
- Připravit rekombinantní protein DUOX a vytvořit specifické antiDUOX protilátky
- Otestovat expresi DUOX během umělé mikrobiální infekce ve střevě *I. ricinus*

1. Úvod a literární přehled

1.1. Klíšťata

Klíšťata jsou krev sající ektoparazitě, významní přenašeči širokého spektra patogenů lidí, hospodářských i divoce žijících zvířat. Taxonomicky spadají do kmene Arthropoda, třídy Arachnida, podtřídy Acari, řádu Parasitiformes a podřádu Ixodida. Klíšťata řadíme do dvou hlavních skupin: Argasidae ("soft ticks") a Ixodidae ("hard ticks"). Jednou z hlavních morfologických struktur, která odlišuje zástupce těchto dvou skupin, je přítomnost skuta, sklerotizovaného plátu na dorzální straně klíšťat skupiny Ixodidae.

Klíšťata skupiny Ixodidae mají tři aktivní vývojová stádia. Tato stádia jsou larva, nymfa a dospělec. Tříhostitelský cyklus znamená, že každé jednotlivé stádium se odehrává na jiném hostiteli z řad plazů, ptáků nebo savců. Existují ale i dvouhostitelské a jednohostitelské druhy klíšťat (Sonenshine, 1991). Po nasátí krve dochází k metamorfóze ve vyšší stádium. Dospělé a oplodněné samice, po plném nasátí a odpadnutí z hostitele, nakladou velké množství (tisíce) vajec a uhynou. Celý životní cyklus trvá nejméně jeden, ale zpravidla několik let.

Klíšťata se živí krví obratlovců a na tento způsob parazitismu jsou velmi dobře vybavena. Přichycení k hostiteli je zprostředkováno ozubeným hypostomem, který je v těle hostitele ukotven pomocí speciálního proteinu produkovaného slinnými žlázami (Fingerle et Wilske, 2006). Tyto žlázy navíc produkují koktejl bioaktivních sloučenin, které udržují normální fungování hostitelovy homeostáze a působí proti poškození tkáně či pocitu bolesti. Během sání se do těla dostává celá škála patogenů z řad protozoí, bakterií, virů a hub (Jongejan et Uilenberg, 2004).

1.2. Mikroby a jejich přenos

Nasáté mikroorganismy mají různé stupně adaptace: symbionti, komenzálové nebo patogeni. Pokud mají nasáté patogeny vyvinutou strategii, kterou se vyhnou klíšťecím imunitním odpovědím, dojde v tělech klíšťat k jejich proliferaci a klíšťata je dále šíří po přísátí na dalšího obratlovčího hostitele. Přísátím klíšťe ovlivňuje fyziologii hostitele a zvýhodňuje přenos patogenů, tzv. slinami aktivovaný přenos (SAT). V tabulce 1 jsou uvedeny některé příklady klíšťaty přenášených patogenů a jimi způsobených onemocnění (de la Fuente et al., 2008).

Tab. 1. Nemoci přenášené klíšťaty a jejich původci

Nemoc	Patogen	Vektor
Lymeská borelióza	<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato (b)	<i>Ixodes pacificus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i>
Horečka Skalistých hor	<i>Rickettsia rickettsii</i> (b)	<i>Dermacentor andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>Amblyomma</i> <i>cajennense</i> , <i>A. aureolatum</i> , <i>Rhipicephalus sanguineus</i>
Ehrlichioza	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> (b)	<i>I. scapularis</i> , <i>I. pacificus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>I. hexagonus</i>
Recidivující horečka	<i>Borrelia</i> sp. (b)	<i>I. pacificus</i> , <i>I. persulcatus</i> , <i>I. ricinus</i> , <i>I. scapularis</i>
Tularémie	<i>Francisella tularensis</i> (b)	<i>D. variabilis</i>
Meningoencefalitida	TBEV (v)	<i>I. ricinus</i>
Koloradská klíšťová horečka	CTF (v)	<i>D. andersoni</i> , <i>D. occidentalis</i> , <i>D. albipictus</i>
Krymsko-kontská hemoragická horečka	CCHF (v)	<i>Hyalomma</i> sp.
Babesióza	<i>Babesia</i> spp (p)	<i>I. scapulari</i> , <i>Haemaphysalis</i> <i>longicornis</i>

b - bakterie, v - virus, p - prvok; TBEV - "Tick-Borne Encephalitis Virus", CTF - "Colorado tick fever", CCHF - "Crimean-Congo Hemorrhagic Fever"

K rozpoznání mikrobiálních patogenů slouží "pattern-recognition receptors" (PRR), které se běžně vyskytují ve všech eukaryotických organismech, bakteriích a některých virech. Mezi PRR patří hemaglutiny nebo lektiny, které hrají velkou roli ve shlukování a opsonizaci mikroorganismů (Ratcliffe et Rowley, 1987; Vasta, 1991). Jedná se o proteiny nebo glykoproteiny s obsahem tyrosinových a histidinových zbytků, se schopností vazby na cukry, které jsou součástí povrchových struktur patogenů. U klíšťat dochází k syntéze těchto molekul ve slinných žlázách. Popsané lektiny klíšťat jsou: OMFREP (Rego et al., 2005), Omgalectin (Huang et al., 2007) a Ixoderin A a B (Rego et al., 2005). Ixoderin A je kromě slinných žláz exprimován ještě ve střevě. Oba ixoderiny obsahují fibrinogenovou doménu a vykazují vysokou homologii s jediným dostatečně popsaným lektinem klíšťat - Dorin M. Dorin M identifikovaný v plasmě *Ornithodoros moubata* (Kovář et al., 2000) nese výraznou podobnost s fibrinogenem obratlovců a kromě rozpoznávání cizorodých molekul hraje pravděpodobně také svou roli při přenosu patogenů těmito vektory (Rego et al., 2005, 2006).

Nejzkoumanějším patogenem přenášeným klíšťaty je původce boreliózy, bakterie *Borrelia burgdorferi*. Během životního cyklu klíšťat se spirochéty *B. burgdorferi* přesouvají ze střev do slinných žláz, odkud jsou slinami přeneseny na hostitele. Borélie přežívají v klíštěcím střevě díky produkci dvou proteinů - OspA a OspB, které zajišťují adhezi v klíštěcím střevě. Geny pro tyto 2 proteiny jsou lokalizovány na plasmidu lp54

(Fraser et al., 1997). Jejich domnělá funkce při přežívání spirochét ve střevě vedla k vytvoření OspA a OspB deficientních mutantů a jejich nezbytná role v životě těchto bakterií byla potvrzena (Yang et al., 2004). Snížení exprese OspA a OspB vede k uvolnění spirochét ze stěny střev a k indukci exprese genu pro OspC, zajišťující migraci spirochét ke slinným žlázám (Schwan et Piesman, 2002), odkud přechází do těla hostitele. Přenos této bakterie je usnadněn složkami klišťecích slin, které ovlivňují mimo jiné i bílé krvinky hostitele. V přítomnosti slin klišťete *I. scapularis* dochází u polymorfonukleárních leukocytů (PMN) k redukci β_2 integrinů, zhoršení přilnavosti PMN a ke snížení schopnosti eliminace *B. burgdorferi* těmito buňkami. Takové vlastnosti byly potvrzeny u klišťecích proteinů ISL 929 a ISL 1373 (Guo et al., 2009). Tyto a další proteiny obsažené ve slinách zabraňují PMN buňkám fagocytovat patogeny, jak bylo potvrzeno pro *B. burgdorferi* (Barthold et al., 1992), a produkci superoxidových radikálů těmito buňkami (Ribeiro et al., 1990).

Nedávno provedená studie potvrdila, že klišťata přenášejí i bakterii *Bartonella* sp. (Reis et al., 2011). Do popředí vědeckého zájmu rovněž vstupuje parazitický prvok *Babesia* sp. Jedná se o parazita krve způsobujícího hemolytickou chorobu babesiózu. Víme, že se jedná převážně o parazity dobytka, nicméně minimálně dva z nich, *B. microti* a *B. divergens*, způsobují nemoc podobnou malárii i u člověka (Bonnet et al., 2007, Hoch et al., 2012).

Napadený hostitel není zcela bezbranný. Jednu z prvních imunitních reakcí při napadení klišťetem zajišťují dendritické buňky hostitele, patřící mezi antigen prezentující buňky (Guo et al., 2009). Dendritické buňky obratlovců neškodí klišťatům přímo, ale zdá se, že mají důležitou roli při formování získané imunity, která vede k rezistenci proti klišťatům. Interakce klišťecích slin s dendritickými buňkami byla předvedena ve studii, kde byly Langerhansovy buňky (nezralé dendritické buňky) inkubovány in vitro v přítomnosti klišťecích slin. V takovém případě docházelo ke stimulaci proliferace T lymfocytů získaných z lymfatických uzlin z jinak klišťatům rezistentních morčat. Dendritické buňky jsou tedy pravděpodobně schopné zahájit imunitní odpověď in vivo během klišťecího sání (Nithiuthai et al., 1985).

1.3. Imunita klíštěte

Podobně jako u ostatních bezobratlých je i imunita klíštěte zajištěna nespecifickými imunitními mechanismy, které efektivně odpovídají na cizorodé látky. Imunita bezobratlých není schopná tvorby imunologické paměti pro důraznou a efektivní odpověď při budoucím vystavení stejné mikrobiální hrozbě. Na rozdíl od získané imunity obratlovců, která je založena na antigen-specifických T a B lymfocytech, jsou mechanismy vrozené imunity bezobratlých a obratlovců podobné (Bilej et al., 2010). Hlavními oblastmi antimikrobiální obrany klíšťat jsou Malpighické trubice, slinné žlázy, hemolymfa a střevo.

1.4. Malpighické trubice

Malpighické trubice jsou exkreční a osmoregulační orgány vzdušnicovců a pavoukoců, které odvádějí odpadní látky v podobě pevných dusíkatých sloučenin. Dochází zde k expresi cytochromů P450, zásadních hemoproteinových enzymů xenobiotického metabolismu (Yang et al., 2007). Důležitost v imunitě bezobratlých dokazuje stálá hladina antimikrobiálních peptidů (AMP), které jsou složkou první obranné linie organismů proti infekčním mikroorganismům (Davies et Dow, 2009).

1.5. Imunita slinných žláz

Slinné žlázy jsou klíčecí orgány nezbytné při příjmu potravy. Během sání se uplatňují zejména v ovlivňování hostitelovy imunity. Sliny všech krevsajících členovců obsahují protisrážlivé, antiagregační, vasodilatační, protizánětlivé a imunitu regulující komponenty. Pro minimalizování kontaminace bakteriemi během sání, slinné žlázy ihned po přisátí zahájí produkci dvou antimikrobiálních peptidů ixosinu (Yu et al., 2006) a ixodidinu (Fogaca et al., 2006), které mají pravděpodobně klíčovou roli v inhibici bakteriálního růstu zejména na rozhraní klíště-hostitel, kde je imunita hostitele už výrazně oslabena dalšími složkami klíštěcích slin (Wikel et Bergman 1997).

1.6. Hemocoelová imunita

Důležitou složkou bezobratlých v obraně proti mikrobům jsou složky tělní tekutiny - hemolymfy, a fagocytující buňky hemolymfy - hemocyty. Jakmile jsou mikroby opsonizovány pomocí PRR, dojde kaskádou serinové proteázy k zesílení signálu, který aktivuje efektorové mechanismy jako koagulaci, enkapsulaci, nodulaci, syntézu antimikrobiálních peptidů (AMP) a melanizaci, zodpovědné za eliminaci patogenů.

Fagocytóza je u klíšťat zajištěna plasmocyty a granulocyty I (Kuhn et Haug, 1994). Tyto hemocyty se podílejí i na procesu obklopení velkých cizorodých částic, které nemohou být fagocytovány. Tento děj se nazývá enkapsulace. U klíštěte *D. variabilis*, naočkovaným *Escherichia coli*, byl vznik shluku pozorován pomocí fluorescenční mikroskopie už po 1 hodině od očkování (Ceraul et al., 2002).

1.7. Thioesterové proteiny (TEP)

TEP proteiny jsou součástí proteinové rodiny α_2 -makroglobulinů a patří mezi nejstarší a nejkonzervovanější komponenty vrozené imunity. Znakem těchto proteinů je thio-esterový můstek, ačkoliv některé hmyzí TEP proteiny toto kritérium nespĺňují. Mezi TEP proteiny patří univerzální proteázové inhibitory a proteiny C3, C4, C5 složek komplementu (Kopáček et al., 2012). Přímou spojitost s antimikrobiální imunitní odpovědí prokázala Levashina et al. Po nakažení komára *A. gambiae Plasmodium berghei*, TEP1 proteiny zlyzovaly 80% ookinetů plasmodií (Levashina et al., 2001). V genomu *I. scapularis* bylo detekováno 9 odlišných TEP proteinů označených IsAM1–9, které byly ověřeny programem BLAST v dostupných databázích. Byl zjištěn charakter těchto látek, které odpovídají složkám komplementu u obratlovců. Doposud nebyl znám zástupce bezobratlých, který by disponoval zástupci všech hlavních skupin TEP proteinů. (Burešová et al., 2011).

1.8. *I. ricinus* α_2 -makroglobulin (IrAM)

Tento protein patří do skupiny α_2 -makroglobulinů chránící organismus před proteázami cizího původu. IrAM je exprimován ve všech vývojových stádiích a tkáních, kromě střeva. Jeho přítomnost byla detekována převážně v hemolymfě. Po dsRNA interferenci IrAM byla značně redukována fagocytóza *Chryseobacterium indologenes in vivo* i *in vitro*, zatímco fagocytóza *B. burgdorferi* a neškodné bakterie *Staphylococcus xylosum* touto interferencí ovlivněny nebyly. Fagocytóza *Ch. indologenes* je závislá na aktivitě metalloproteázy, produktu této bakterie, což dokazuje interakce buněčného imunitního systému s produkty sekretovanými bakteriemi (Burešová et al., 2009).

1.9. Imunita ve střevě

Slizniční epitel organismů jsou neustále v přímém kontaktu s mikroby. Organismy proto musely vyvinout systém, který by toleroval vlastní a symbiotické buňky a zároveň efektivně eliminoval patogenní mikroorganismy. Imunitní reakce ve střevě mají hlavní

úlohu v kontrole infekčních chorob obratlovců (Bevins et al., 1999). Střevo bezobratlých je nezbytné rozhraní pro parazity během jejich vývoje. První obrannou linii epitelu střeva bezobratlých tvoří konstitutivně exprimované antimikrobiální peptidy (AMP) (Lehane et al., 1997). U *D. melanogaster* bylo ukázáno, že klíčovým mechanismem epiteliální imunity je produkce ROS (Ha et al., 2005). Hlavními producenty ROS u bezobratlých jsou nikotinamid adenin dinukleotid fosfátové (NADPH) oxidázy a duální oxidázy (DUOX). Dynamická produkce a eliminace ROS je efektivním antimikrobiálním mechanismem ve střevě tohoto organismu. Tato tvrzení byla potvrzena na muškách postrádajících DUOX, které v přítomnosti patogenů vykazovaly markantní zvýšení mortality (Ha et al., 2005). Tyto pokusy jsou více popsány v kapitole 1.15.

1.10. Hemoglobinové fragmenty

Trávením hemoglobinu vznikají fragmenty, u kterých byla dokázána antimikrobiální aktivita spojená s rozrušováním membrán G^+ bakterií (Parish et al., 2001). Antifungální aktivita těchto fragmentů byla potvrzena ve střevě klíštěte *B. microplus* (Fogaca et al., 1999).

1.11. Defensiny

Defensiny jsou nejrozšířenější skupinou antimikrobiálních peptidů vyskytujících se u mnohých organismů (Johns et al., 2001). Tyto AMP jsou kationtové peptidy o délce 4 kDa, které obsahují 6 cysteinových zbytků a tvoří disulfidické můstky (Kopáček et al., 2010). Mají anti G^+ aktivitu, kterou perforují fosfolipidové membrány (Gillespie et al., 1997). Jejich synergistický efekt zvyšuje účinnost i proti spirochetám borrelie (Johns et al., 2001, 1998). Mikroby s narušenou membránou jsou lyzovány. První defensiny u bezobratlých byly objeveny u mušky *Sarcophaga peregrina* (Matsuyama et Natori, 1988). Jejich aminokyselinová sekvence vykazuje podobnost v širokém fylogenetickém spektru. To potvrzuje, že se jedná o velmi staré efektoři vrozené imunity. Klíštěcí defensiny jsou převážně exprimované ve střevě po nasátí krví nebo po invazi patogenů (Nakajima et al., 2002). Nejznámějším klíštěcím defensinem je varisin identifikovaný u klíštěte *D. variabilis* (Hynes et al., 2008). U *I. ricinus* identifikovala Chrudimská et al. 2 geny pro defensiny - *def1* a *def2*. Expres obou genů byla indukována sáním nebo injekcí patogenu. Byla prokázána inhibice G^+ bakterií (*Staphylococcus xylosum*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus aureus*), navíc bylo objeveno, že *def1* i *def2* lyzují lidské erytrocyty (Chrudimská et al., 2011). Jsou popsány rozdíly mezi defensiny u Ixodidae a Argasidae

a míní se, že tyto rozdíly mohou definovat, proč je jedna skupina klíšťat schopná přenášet určité parazity, zatímco druhá skupina nikoliv.

1.12. Lysozomy

Lysozomy jsou antibakteriální enzymy, které katalyzují hydrolýzu 1,4- β -D vazby mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminovými zbytky v peptidoglykanové vrstvě bakteriálních membrán. Tímto mechanismem účinně brání proti infekcím způsobenými G^+ bakteriemi (Bilej et al., 2010). Lytická aktivita proto G^+ *M. luteus* byla potvrzena u lysozymu izolovaného ze střevního obsahu klíšťáka - *O. moubata* (Kopáček et al., 1999). Jedná se o lysozym c-typu, který obsahuje stejné motivy jako lysozomy nalezené v trávicím traktu přežvýkavců. Jejich exprese je silně up regulována sáním krve (Grunclová et al., 2003).

1.13. Redoxní rovnováha

Reaktivní kyslíkové radikály (ROS) jsou deriváty kyslíku s volným valenčním elektronem. Základem pro vznik dalších ROS je kyslíkový radikál ($O_2^{\cdot -}$), který je uvolňován mitochondriemi při respiraci u všech aerobních organismů nebo jako imunitní odpověď na přítomnost patogenů (Beutler, 2004). Dalším zdrojem ROS jsou NADPH oxidázy, a enzymy, jejichž fungováním vznikají ROS jako meziprodukty (Lambeth, 2004). Do této skupiny enzymů patří acyl-CoA oxidáza, xantin oxidáza, systém cytochromu p450, cyklooxygenáza a lipoxygenáza (Wanders et Waterham, 2006; Soberman et Christmas, 2003).

$O_2^{\cdot -}$ vzniká redukcí O_2 a jeho regulací dochází ke vznikům dalších ROS. V přítomnosti superoxidové dismutázy je $O_2^{\cdot -}$ konvertován na H_2O_2 . H_2O_2 je důležitou mikrobicidní látkou v imunitě krevsajících bezobratlých (Molina-Cruz et al., 2008). V případě krev sajících parazitů může dojít k reakci H_2O_2 s železnatými ionty a vzniku hydroxylových radikálů. Vznik hydroxylových radikálů je umožněn schopností železa uvolnit jeden elektron a nazývá se Fentonova reakce. Hydroxylové radikály jsou velmi reaktivní. Po zformování způsobují řetězovou reakci a jejich přítomnost v buňce znamená buněčnou smrt. Neexistuje žádný enzymatický mechanismus pro odbourávání hydroxylových radikálů. U obratlovců je H_2O_2 využit myeloperoxidázou jako substrát pro vznik kyseliny chlorné, silné antimikrobiální sloučeniny (Hampton et al., 1998).

Akumulace a nadměrná koncentrace ROS se označuje jako oxidativní stres – dochází k poškození DNA, proteinů a lipidů (Covarrubias et al., 2008). Poměr produkce

a degradace ROS je stěžejní pro správné fungování buněčných redoxních dějů. Pro svou potenciální toxicitu je důležitá přechodná produkce ROS, která musí být přesně lokalizována (Bae et al., 2010). Buňky hostitele jsou před škodlivými účinky kyslíku chráněny enzymy, které detoxifikují ROS. Tyto enzymy jsou superoxidové dismutázy regulující $O_2^{\cdot -}$. Dále pak katalázy, glutation peroxidázy a thioredoxinové peroxidázy, které odbourávají H_2O_2 .

Jak již bylo zmíněno, ROS jsou využívány hostitelskými organismy jako antimikrobiální zbraň při vlastní obraně proti mikrobům. Spoluúčast ROS v imunitě komárů proti bakteriím a plasmodiím byla zkoumána u přenašeče malárie, komára *Anopheles gambiae*. Vyšší hladina ROS při přítomnosti patogenů ukázala vyšší míru přežití komárů, než u těch, kterým podáváním antioxidantů byla míra přežití výrazně snížena (Molina-Cruz et al., 2008). Expresí ROS detoxikačních enzymů se po nasátí krví zvyšuje ve střevě a tukovém tělese (Molina-Cruz et al., 2008). Expresí těchto enzymů, jako peroxidázy, se u komárů zvýšila i během sání krve infikovanou parazitem *Plasmodium berghei*. To dokazuje zvýšení oxidativního stresu po infekci *P. berghei*. U komárů nakažených *P. berghei* byla paradoxně pozorována naprostá ztráta indukce mRNA pro katalázu a snížená aktivita katalázy ve střevě. Suprese katalázy ve střevě je specifická odpověď na přítomnost ookinetů a vede ke zvýšení koncentrace H_2O_2 v místě výskytu patogenů. Vypnutí genu pro katalázu pomocí dsRNA interference umožňuje odstranění parazitů lytickými mechanismy a značné snížení infekce. Následně byla ale pozorována zvýšená úmrtnost komárů jako výsledek zvýšené hladiny ROS. Po podání kyseliny močové, která je silným antioxidantem, se mortalita snížila. Byla prokázána důležitá role ROS v imunitě *A. gambiae*, která je zprostředkována produkcí a následnou detoxifikací H_2O_2 (Molina-Cruz et al., 2008).

Největší produkce ROS je zaznamenána u fagocytujících buněk. To bylo potvrzeno u plasmocytů a granulocytů klíštěte *Boophilus microplus*. Tyto hemocyty byly inkubovány v přítomnosti bakterií a zymosanu. Pomocí luminiscence (luminol-amplified) a oxidace fenolové červeně byla prokázána zvýšená produkce ROS během fagocytózy, podobně jako je tomu u fagocytů obratlovců (Pereira et al., 2001). Přítomnost mikrobů zvyšuje produkci ROS přímou aktivací oxidáz nebo zvýšenou indukcí exprese oxidázových genů (Leto et Geiszt, 2006).

ROS se nepodílejí pouze na imunitních odpovědích souvisejících s přítomností patogenů v těle. Regulují i fyziologické funkce související s vývojem organismů

(Regulski et al., 2004). V reakci na různé signály prostředí se ROS tvoří za účelem dosažení buněčné homeostázy zahrnující buněčný růst, diferenciaci nebo apoptózu (Rhee et al., 2000).

1.14. NADPH oxidáza (NOX)

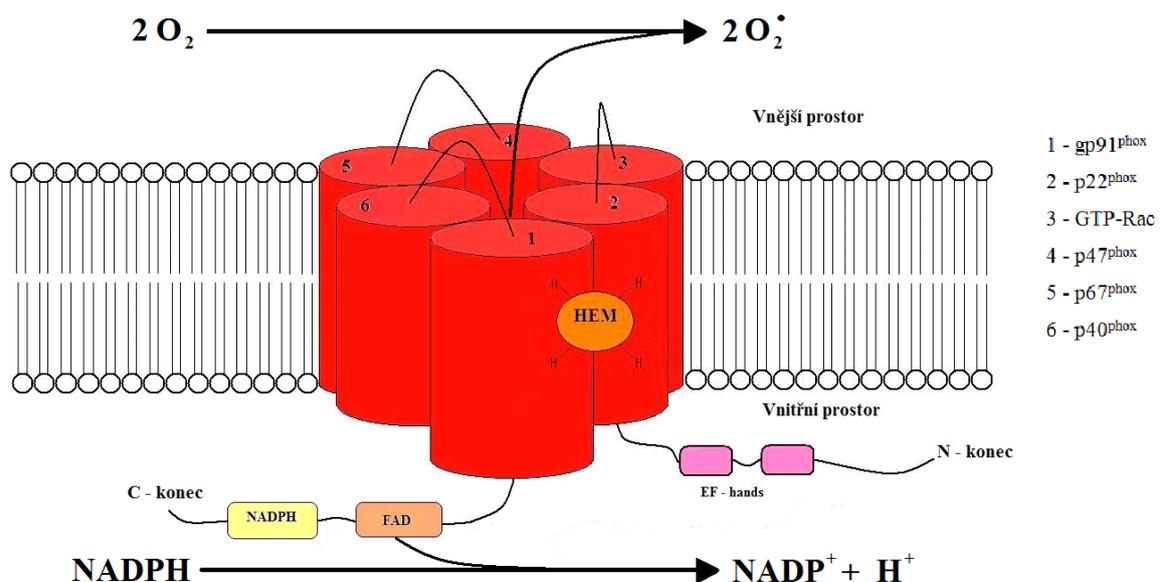
Tyto enzymy patří mezi nikotinamid adenin dinukleotid fosfátové oxidázy (NADPH oxidázy). NOX jsou membránově vázané enzymy u fagocytujících buněk i buněk nemajících tuto schopnost. Umožňují fungování procesům vyžadujících ROS - procesům jako antimikrobiální obrana, biosyntetické procesy, buněčná signalizace založená na redoxních reakcích a další. Členové NOX/DUOX (duální oxidáza) rodiny byli identifikováni u mnohých organismů zahrnujících savce, nematoda, hmyz, rostliny i houby (Kawahara et al., 2007) a jsou téměř výhradně privilegiem mnohobuněčných organismů (Lalucque et Silar, 2003).

NADPH oxidázy jsou tvořeny 6 podjednotkami (Obr. 1). Členové této enzymatické rodiny přenášejí elektron přes membránu do extracytoplazmatického prostoru nebo buněčných organel jako fagozomy, endozomy, ER a jiné. Kompletní oxidativní komplex umožňuje katalýzu elektronového přenosu z NADPH na kyslík za uvolnění volného radikálu $O_2^{\cdot-}$, základu pro tvorbu dalších ROS. Schopnost fagozomů přijímat uvolněné superoxydy není neomezená, proto ROS produkující buňky disponují velkým množstvím superoxidových dismutáz, které přeměňují superoxidový radikál na stabilnější a membránou propustný H_2O_2 , ačkoli současné studie potvrdily transport superoxidů skrz membránu přes CIC-3 aniontové kanály (Leto et al., 2009, Moreland et al., 2006). Do chemické reakce vstupuje jedna molekula redukčního činidla NADPH, která je oxidována za uvolnění 2 elektronů (Cross et Segal, 2004). Reakce vypadá následovně:



Rodina NOX genů je 5ti-členná. Strukturně jsou si podobné, nicméně vykazují odlišnosti v rozsahu tkáňové exprese, potřebných kofaktorů, produktivitě superoxidových radikálů i ve fyziologických funkcích. Podle funkčních skupin a celkového uspořádání enzymatického komplexu můžeme NOX rozdělit do tří skupin: a) NOX1, NOX2 a NOX3 - vícesložkové komplexy vyžadující regulační proteiny, b) NOX4 s konstitutivní aktivitou nevyžadující pro své fungování žádné regulační proteiny, c) NOX5, DUOX1 a DUOX2 regulované vápníkem díky přítomnosti vápník vázající EF-hand doméně (Lambeth et al., 2007; Sumimoto, 2008). EF-hand je složena ze dvou α -helixů E a F propojených smyčkou

(Bae et al., 2010). EF-hand NOX5 tvoří dva páry: N-terminální pár má na rozdíl od C-terminálního konce relativně nízkou afinitu k Ca^{2+} . C-terminální konec váže Ca^{2+} a způsobuje konformační změny N-konce, čímž odkryje hydrofóbní jádro, na které se může navázat melitin (peptid pro vazbu kalmodulinu). Pomocí „pull-down“ testu bylo demonstrováno, že interakce N-terminálního konce a katalytického C-konce u NOX5 je ovlivněna Ca^{2+} dependentními drahami (Bánfi et al., 2004). Molekulární interakcí indukovanou Ca^{2+} dochází ke konformačním změnám NOX5 a aktivaci enzymu (Bánfi et al., 2004). Je známo, že NOX5 a DUOX enzymy jsou pečlivě kontrolovány tkáněmi i na úrovni exprese a doposud nejsou přesně známy regulační mechanismy. Známé regulační složky a mechanismy jsou vápník, fosforylace, výměna Rac nukleotidu a přesné sestavení regulačních podjednotek (Lambeth et al., 2007). Na regulaci NOX se pravděpodobně podílí i alternativní splicing NOX kofaktorů (Clark et al., 2004), který je důležitý pro zaměřování membrán (jaderná nebo plasmatická), do kterých se NOX enzym začleňuje (Leto et al., 2009).



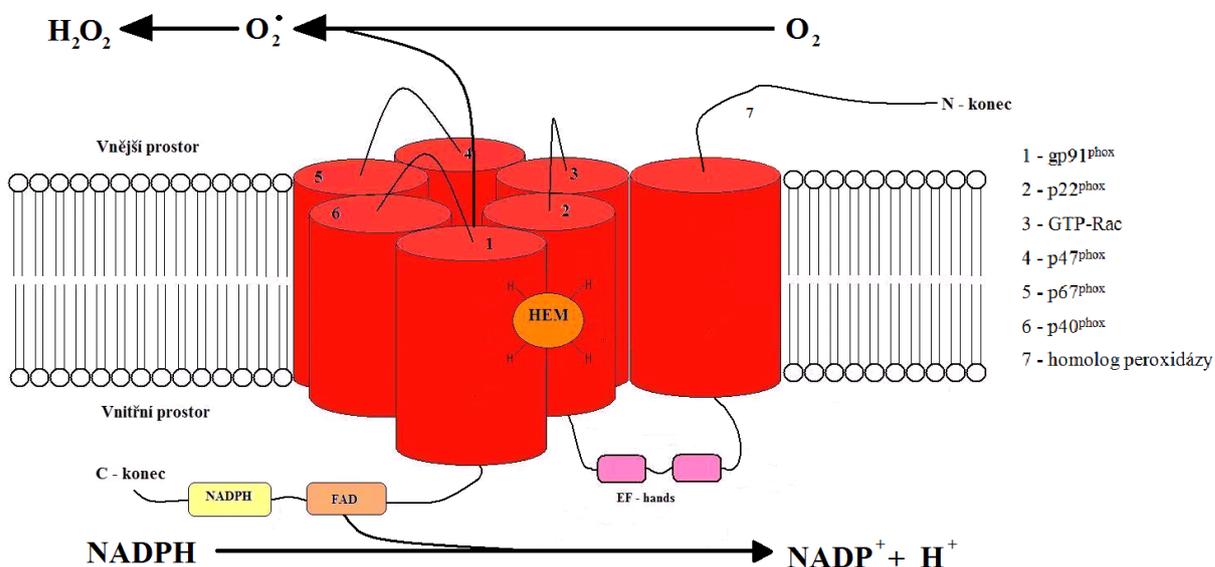
Obr. 1.: Struktura membránového proteinu NOX5 + princip vznik superoxidového radikálu

1.15. Duální oxidáza (DUOX)

Předmětem mého zkoumání je transmembránový enzym klíštěte *I. ricinus* - DUOX, jehož struktura je znázorněna na obrázku 2. Tyto enzymy se vyskytují u širokého spektra organismů - od amoeb po člověka. U těchto enzymů je potvrzena produkce pouze H₂O₂ (Morand et al. 2009; De Deken et al., 2000). DUOX mají podobnou strukturu jako NOX enzymy, ale na prodlouženém N-konci mají navíc transmembránovou doménu (Obr. 2), která je 20% homologem (De Deken et al., 2000) některých hemových peroxidáz (Leto et al., 2009). Funkce těchto enzymů byla prvně popsána u modelového organismu *D. melanogaster*. DUOX *D. melanogaster* má oproti lidské DUOX pouze proximální histidinové konce peroxidázové domény, které umožňují slabou peroxidázovou aktivitu této DUOX (Meitzler et Ortiz de Montellano, 2009).

Studiem genomu modelového organismu *D. melanogaster* byla ověřena přítomnost jedné kopie NOX a jedné kopie DUOX. Dále bylo potvrzeno, že DUOX jsou enzymy, které efektivně eliminují patogenní mikroorganismy, zároveň však tolerují vlastní buňky a symbiotické organismy (Bae et al., 2010). Funkce ROS jako hlavních antimikrobiálních látek ve střevě, byla potvrzena během pozorování much postrádajících sekretovanou formu katalázy (IRC) (Bae et al., 2010) - enzymu, který aktivně reguluje koncentraci ROS ve střevě. Mušky s inaktivovanou IRC (IRC knockdown) vykazovaly vyšší mortalitu po infekci neletálními bakteriemi, zatímco mušky postrádající AMP expresi měly po infekci stejnými druhy bakterií normální míru úmrtnosti. Tento experiment vyloučil AMP jako hlavní složky střevní antimikrobiální imunity (Ha et al., 2005). Po vypnutí DUOX genu nedošlo k produkci ROS a mušky nebyly schopné kontrolovat bakterie ve střevě - to znamená, že DUOX je zdrojem mikrobicidních ROS. Po vypnutí genů pro katalázu (IRC) i DUOX byla pozorována normální hladina ROS (Ha et al., 2005). Úmrtnost je pravděpodobně způsobena redoxní nerovnováhou (Ha et al., 2005). Tyto pokusy potvrdily produkci ROS při přítomnosti mikrobů, nicméně neprokázaly jejich přímý vliv na ně (Bae et al., 2010). Mechanismy regulace DUOX jsou odkryté jen z části, ale je potvrzena důležitost Ca²⁺ iontů při této indukci (Ameziane et al., 2005), funkce fosfolipázy C β (PLC β) při regulaci enzymatické aktivity DUOX i regulaci exprese a přítomnosti mikrobiálních ligandů. Zvýšená exprese DUOX probíhá pak pouze v případě vniknutí velkého množství mikroorganismů do střeva hostitele - předpokládá se, že většina mikroorganismů produkuje tzv. non-PG ligandy, které spouštějí

expresi DUOX. Vlastní a symbiotické buňky tyto ligandy nemají, nebo je jejich množství redukováno, proto jsou organismem tolerovány (Bae et al., 2010).



Obr. 2. Struktura membránového proteinu DUOX + princip vzniku H_2O_2

U komárů *A. gambiae* bylo ukázáno, že sekretovaná peroxidáza a DUOX formují dityrosinovou síť, která snižuje propustnost střev pro patogeny. Tato síť chrání mikroflóru střev tím, že brání aktivaci epiteliální imunity. To ovšem poskytuje vhodné prostředí pro vývoj původce malárie, Plasmodií. Vytvoření dityrosinové sítě znemožňuje indukci tvorby oxidu dusnatého, hlavního opsonizačního mechanismu u komára *A. gambiae* (Oliveira et al., 2012). Přerušením fungování této bariéry dojde k silné a efektivní patogen-specifické imunitní odpovědi (Kumar et al., 2010). Zdá se, že DUOX má ve střevní imunitě *A. gambiae* hned dvojí funkci. Jednak produkce antimikrobiálních ROS a jednak tvorbu dityrosinové sítě, která zabraňuje invazi patogenů a zároveň efektivně chrání vlastní mikroflóru.

2. Materiál a metody

2.1. Použité chemikálie a primery

Tab. 2. Použité chemikálie.

DNA a RNA elektroforéza, PCR	
1× TAE pufr	40mM Tris-acetát, 1mM EDTA, pH 8.0
1× TBE pufr	17.8mM Tris, 17.8mM kys. boritá, 0.4mM Na ₂ EDTA
DEPC H ₂ O	0.1 % (v/v) Dietylpyrokarbonát ředěný v destilované H ₂ O
EtBr	Ethidium bromid 0.5 µg/ml
6× Loading Dye (Fermentas)	10mM Tris/HCl (pH 7.6), 0.03% (w/v) bromfenolová modř, 0.03% (w/v) xylencyanol, 60% (v/v) glycerol, 60mM EDTA
DNA Ladder	GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas) GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (MBI Fermentas)
RNA Ladder	High Range RNA Ladder (MBI Fermentas)
DNA Polymeráza	Taq polymeráza (Top-bio s.r.o.)
dNTPs mix (Fermentas)	Směs dNTPs každý o koncentraci 2.5mM/10mM
Média a chemikálie pro pěstování bakterií	
SOC médium	2% (w/v) trypton, 0.5% (w/v) kvasnicový extrakt, 0.05% (w/v) NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgSO ₄ , 20mM glukóza, pH 7.0, sterilní
LB (Luria-Bertani) médium	1% (w/v) trypton, 0.5% (w/v) kvasnicový extrakt, 0.5% (w/v) NaCl, pH 7.0, sterilní
SB médium	1% (w/v) pepton, 4% glukóza (w/v), pH 5.6
Expres, purifikace a refolding rekombinantního proteinu	
Resuspendační pufr	20mM Tris-Cl, pH 8.0
Izolační pufr	20mM Tris, 2M močovina, 0.5M NaCl, 10mM imidazol, 2% (w/v) Triton X-100, pH 8.0
Solubilizační pufr	20mM Tris, 6M guanidin hydrochlorid, 0.5M NaCl, 10mM imidazol, 1mM β-merkaptóetanol, pH 8.0
Purifikační pufr 1	8M močovina, 0.5M NaCl, 50mM Tris-Cl
Purifikační pufr 2	8M močovina, 0.5M NaCl, 0.5M imidazol
Refold. roztok č.1	4M močovina, 150mM NaCl, 50mM Tris-Cl, 10% (v/v) glycerol, 20mM, merkaptóetanol, pH 9.0
Refold. roztok č.2	2M močovina, 150mM NaCl, 50mM Tris-Cl, 10% (v/v) glycerol, 20mM, merkaptóetanol, pH 9.0
Refold. roztok č.3	1M močovina, 150mM NaCl, 50mM Tris-Cl, 10% (v/v) glycerol, 20mM, merkaptóetanol, pH 9.0
Refold. roztok č.4	150mM NaCl, 50mM Tris-Cl, 10% (v/v) glycerol, 20mM, merkaptóetanol, pH 9.0
Refold. roztok č.5	150mM NaCl, 10mM Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O, 2mM KH ₂ PO ₄ , 3mM KCl

SDS-PAGE a Western blot	
Vzorkový redukující pufr	0.75M Tris-Cl, pH 6.8, 5% SDS, 50% (v/v) glycerol, 32mM dithiotreitol, 0.25% (w/v) bromfenolová modř
Barvicí roztok	0.05% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% (v/v) metanol, 10% (v/v) kyselina octová
Odbarvovací roztok	25% (v/v) metanol, 10% (v/v) kyselina octová
Proteinový standard - LMW	LMW Electrophoresis Calibration Kit (Amersham)
PBS-Tween	1× PBS, 0.05% (v/v) Tween 20
Blotovací pufr	0.125M Tris, 0.96M glycin, 0.1% SDS, 20% metanol
Blokovací roztok	5% (w/v) sušené mléko v PBS Tween
Substrátový roztok	100mM Tris-Cl s přidáním DAB

Název primeru	Sekvence
DUOX F*	5' - CAC CTA CTC GTC GCA GAT GCA CAT C - 3'
DUOX R*	5' - TCA GAT GTC CTC GTC CGT CCA GTC - 3'
Feritin F	5' - CCA AAC GGT TCG CTT TCC TC - 3'
Feritin R	5' - GAG CCC CAC TCG TCC TGG G - 3'
T7F	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'
T7R	5' - TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG - 3'

Primery označené * byly navrženy podle sekvence genu *IscW_ISCW007865 (DUOX) I. scapularis* v programu Oligo Analyzer

2.2. Získání sekvence DUOX *I. ricinus*

Z genomu klíštěte *I. scapularis* byly podle anotovaného genu pro DUOX navrženy odpovídající primery pro fragmenty těchto genů (Tab. 2).

2.3. Izolace totální RNA

Střeva samic klíštěte *I. ricinus* byla zhomogenizována pomocí plastového homogenizátoru a inzulínové stříkačky v RAI roztoku (Machery-Nagel) s β -merkaptoetanolem (128mM). Další kroky izolace byly prováděny podle protokolu z kitu MACHEREY-NAGEL-Nucleospin RNA II. Kvalita výsledné totální RNA byla ověřena elektroforeticky. Koncentrace RNA byla zjištěna z naměřené absorbance při $\lambda = 260$ nm (Tab. 3).

Tab. 3. Koncentrace izolované totální RNA.

	Koncentrace (ng/μl)
RNA _D	55.9
RNA _Ž	77.1
RNA _{PBS}	60.0

D - RNA ze střev samic sajících směs mrtvých mikrobů, Ž - RNA ze střev samic sajících směs živých mikrobů, P - RNA ze střev samic sajících sterilní PBS (více v kapitole 2.18.)

2.4. Tvorba cDNA

RNA izolovaná z tkání *I. ricinus* byla přidána do jednotlivých reakcí tak, aby její finální množství bylo 0.5 μg. cDNA byla syntetizována pomocí oligo (dT)₂₃ primerů kitu Enhanced Avian HS RT-PCR (Sigma).

2.5. Polymerázová řetězová reakce

Jako templát pro PCR byly použity cDNA různých tkání klíštěte *I. ricinus* po různé době sání. Použity byly gen (DUOX, feritin) specifické primery (500nM). PCR program: 95 °C 45 s; 95 °C 30 s; 50 °C 30 s (DUOX i feritin); 72 °C 60s; 72 °C 7 min. Pro DUOX bylo použito 40 cyklů, pro feritin 35 cyklů. Kontrola amplifikace DUOX byla ověřena elektroforeticky na 1% agarózovém gelu. Elektroforéza probíhala při napětí 100 V po dobu 30 min. Fragmenty byly izolovány z gelu a podle návodu z kitu Gel Extraction Kit (Qiagen). Pomocí UV-spektrofotometrie byla stanovena koncentrace DUOX fragmentů.

2.6. Klonování fragmentu do pCR4 vektoru, transformace do One Shot[®] TOP10 chemicky kompetentních *E. coli*, sekvenace

Fragment DUOX byl klonován do pCR4 vektoru (TOPO) podle manuálu TOPO TA Cloning[®] (Invitrogen). Klonovací reakce je naznačena v tabulce 4. Reakce byla dále inkubována 5 min při pokojové teplotě. 1.5 μl klonovací reakce bylo přidáno do 25 μl One Shot[®] TOP10 chemicky kompetentních *E. coli* (Invitrogen) buněk a inkubováno 30 minut na ledě. Následně byl proveden 45s heat shock při t = 42 °C a buňky vráceny na led. Po přidání 250 μl SOC média vytemperovaného na pokojovou teplotu byly buňky umístěny do třepačky při 220 rpm/37 °C/60 min. 50 μl buněk bylo následně rozetřeno na LB misky, zbytek kultury stočen 2300 × g /1 min a pelet resuspendován v 50 μl SOC média a rozetřen na LB misku. Kultury byly dále inkubovány při 37 °C přes noc. Správnost klonování byla ověřena pomocí PCR. Z vybraných kolonií byly izolovány plazmidy pomocí High Pure Plasmid Isolation kitu (Roche). Inzerty byly sekvenovány kombinací DUOX F a R primerů.

Vzorky byly sekvenovány pomocí sekvenátoru Applied Biosystems 3130×1 (HITACHI) v laboratoři genomiky v Biologickém centru AV ČR v Českých Budějovicích.

Tab. 4. Přírava klonovací reakce s vektorem pCR4.

1 µl DUOX (c = 35 µg/ml)
1 µl salt solution
3 µl H ₂ O ₂
1 µl pCR4 vektor (c = 10 µg/ml)

pCR4 TOPO vektor je dlouhý 3957 bp, insert DUOX 771 bp. Klonovací reakce byla vytvořena smícháním insertu vektorem v molárním poměru vektor:insert 1:17.

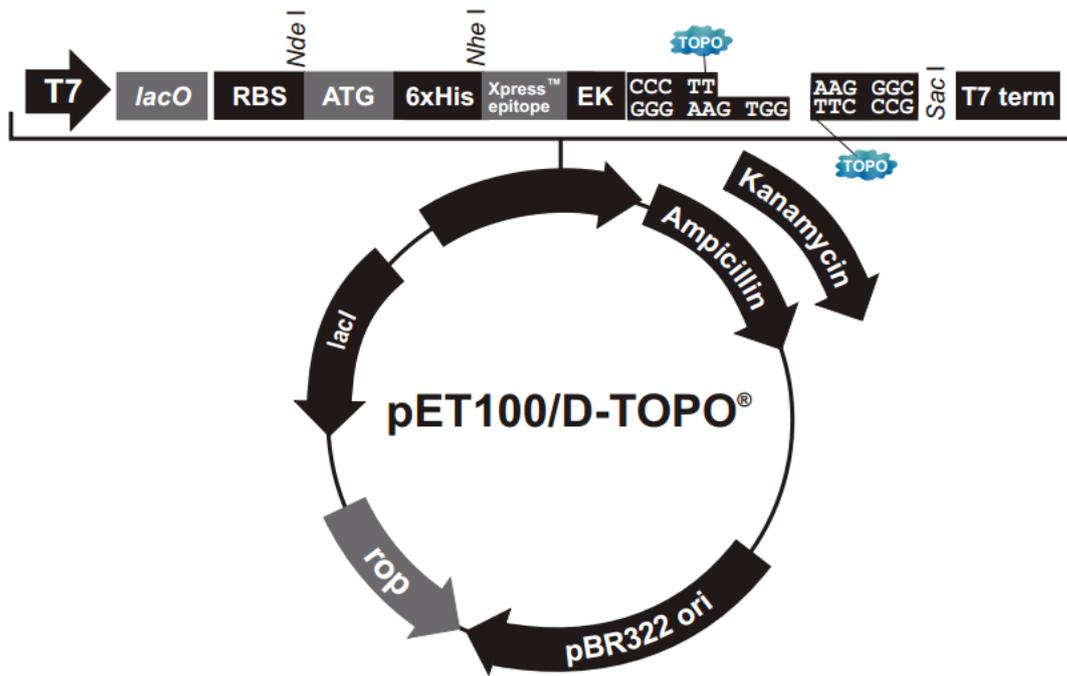
2.7. Zaklonování fragmentu DUOX do expresního vektoru pET100, transformace do One Shot[®] TOP10 chemicky kompetentních *E. coli*

Získaný fragment DUOX byl podle protokolu k Champion[™] pET100 Directional TOPO[®] ligován do expresního vektoru pET100/D-TOPO[®] (Invitrogen) (Obr. 3). Klonovací reakce je uvedena v tabulce 5. Klonovací směs byla inkubována 30 minut při pokojové teplotě a poté umístěna na led. Následovala transformace 1.5 µl klonovací směsi do 25 µl One Shot[®] TOP10 chemicky kompetentních *E. coli* (Invitrogen) a 30 minutová inkubace na ledě. Další postup až k rozetření buněk na LB médium je uveden v kapitole 2.6. Pozitivní bakteriální klony byly ověřeny PCR pomocí kombinace DUOX F/R a T7F/R primerů a následně byla ověřena správnost čtecího rámce insertu. Plazmid pET100 byl izolován z pozitivní kolonie pomocí kitu High Pure Plasmid Isolation (Roche). Plazmidy byly eluovány z kolony 100 µl vody (40 °C) a následně byla opěr UV-spektrofotometricky proměřena jejich koncentrace, která byla stanovena na 37 µg/ml.

Tab. 5. Přírava klonovací reakce s vektorem pET100.

4 µl DUOX (c = 35 µg/ml)
1 µl salt solution
1 µl pET100 TOPO vektor (c = 20 µg/ml)

pET100 TOPO vektor je dlouhý 5741 bp, insert DUOX 771 bp. Klonovací reakce byla vytvořena smícháním insertu vektorem v molárním poměru vektor:insert 1:14.



Obr. 3. Vektor pET100/D-TOPO®.

2.8. Zatransformování DUOX fragmentu do expresních BL21 buněk, exprese rekombinantního fragmentu DUOX

Transformace byla provedena přidáním 10 ng pET100 plazmidů s DUOX fragmentem do expresních buněk BL21 Star (DE3) Oneshot® chemicky kompetentních *E. coli* (Invitrogen). Po 20 minutové inkubaci při pokojové teplotě byl proveden 45s heat shock při $t = 42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dále bylo postupováno podle návodu uvedeného v kapitole 2.7. Z buněk, narostlých na plotně, byla vypíchnuta bakteriální kolonie a přenesena do 10 ml sterilního LB média s ampicilinem (o cílové koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$). V tomto médiu byla kultura inkubována 16 hodin (v třepačce při 37 $^{\circ}\text{C}$). Buňky byly následně stočeny při $2500 \times g/4\text{ }^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$, pelet resuspendován a přenesen do 400 ml LB média s ampicilinem (o cílové koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$) a 1% glukózou, která byla nejprve filtrována skrz 0.22 μm filtr Millex®GP (Millipore). Bakterie byly kultivovány po dobu 2 h do $\text{OD} = 0.6$, stočeny za stejných podmínek a poté přeneseny do 400 ml čistého LB média (bez AMP a glukózy), které bylo umístěno do 37 $^{\circ}\text{C}$ a po 15 minutách byla indukována exprese přidáním IPTG (o cílové koncentraci = 1 mM). Kultura byla inkubována po dobu 6 hodin, při 37 $^{\circ}\text{C}$ a 220 rpm. Buňky byly následně stočeny při $2500 \times g/4\text{ }^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$ a pelet skladován při -20 $^{\circ}\text{C}$.

2.9. Izolace inkluzních tělísek z bakteriální kultury

Bakteriální pelet byl resuspendován v resuspendačním pufru (Tab. 2), sonikován 8 × po 10 s při amplitudě 40 % a centrifugován při 10000 × g/4 °C/15 min. Získaný pelet byl resuspendován v izolačním pufru (Tab. 2), sonikován a stočen za stejných podmínek. Promývání izolačním pufrem bylo 2 × opakováno. Výsledný pelet byl rozpuštěn v solubilizačním pufru (Tab. 2) do úplného rozpuštění frakce inkluzních tělísek. Následně byl roztok stočen 10000 × g/4 °C/15 min, supernatant odebrán, stočen a filtrován skrz 0.22μm filtr Millex[®]GP (Millipore). Část frakce inkluzních tělísek byla 2 × po 10 minutách dialyzována proti vodě a následně analyzována pomocí SDS-PAGE. Vzorek DUOX + vzorkový redukující pufr s DTT byl povařen při 100 °C/5 min a 20 μl tohoto vzorku nanášeno na gel. Pro ověření molekulových hmotností bylo nanášeno 15 μl LMW markeru (20 mg/ml). Elektroforéza probíhala při napětí 100 V, po 15 minutách bylo napětí zvýšeno na 200 V. Po ukončení elektroforézy byl gel 15 minut barven v Coomassie Brilliant Blue barvivu a poté odbarven v odbarvovacím roztoku.

2.10. Purifikace proteinu

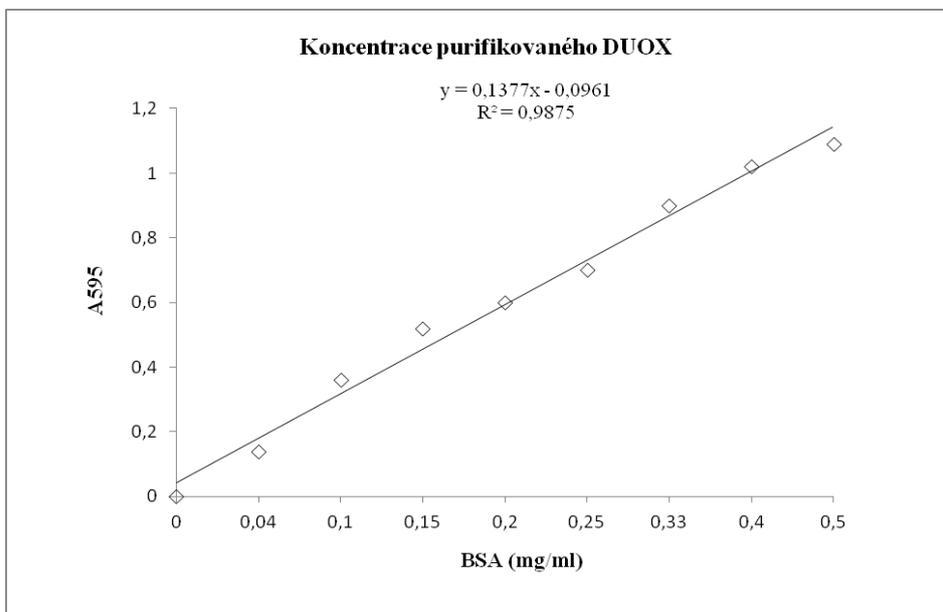
Co²⁺ kolona - 5ml (HiTrap[™] IMAC FF, GE Healthcare) byla nejprve promyta 2% purifikačním pufrem č. 2 (ředěným v purifikačním pufru č. 1). Pomocí 10ml injekční stříkačky byl na kolonu nanášen DUOX. Kolona byla dále 2 × promyta 2% purifikačním pufrem 2 v purifikačním pufru 1 (10mM imidazol), flow through bylo shromažďováno. Následně byla kolona 2 × eluována 50% purifikačním pufrem č. 2 (250mM imidazol) a získaná frakce opět shromažďována. 3. eluát byl získán promytím kolony 100% purifikačním pufrem č. 2 (0.5M imidazol). Po ukončení purifikace byla kolona 3 × promyta destilovanou vodou a jednou 20% etanolem. Purifikovaný protein byl analyzován pomocí SDS-PAGE.

2.11. Bradford assay

Na 96jamkovou transparentní destičku s plochým dnem (Corning) byly v duplikátech nanášeny naředěné vzorky BSA (kalibrace) a vzorky purifikovaného DUOX. Každého vzorku bylo nanášeno 5 μl. Po přidání 200 μl Bradfordu proběhla 5 minutová inkubace při pokojové teplotě. Vzorky byly proměřeny na přístroji TECAN Infinite M200 při vlnové délce 595 nm. Naměřené hodnoty pro BSA jsou uvedeny v tabulce 6. Podle získané standardní křivky byly odečítány koncentrace měřených proteinů.

Tab. 6. Použité koncentrace BSA a naměřené absorbance.

BSA[mg/ml]	0	0.04	0.1	0.15	0.2	0.25	0.33	0.4	0.5
I ₅₉₅	0.00	0.15	0.41	0.51	0.64	0.69	0.89	1.00	1.06
II ₅₉₅	0.00	0.12	0.31	0.52	0.56	0.71	0.91	1.04	1.12
AVRG	0.00	0.14	0.36	0.52	0.60	0.70	0.90	1.02	1.09



Obr. 4. BSA kalibrace Bradfordovy metody pro zjištění koncentrace purifikované DUOX. DUOX obsahující histidinovou kotvu byl purifikován přes chelatační kolonu. Kolona byla následně eluována 250mM imidazolem pro uvolnění DUOX z kolony. Získaný vzorek DUOX v eluátu byl použit pro měření koncentrace Bradfordovou metodou.

2.12 Renaturace rekombinantního proteinu

Z purifikovaného proteinu bylo odebráno 3 mg a vyředěno pufrém A na konečný objem 10 ml o koncentraci 250 µg/ml. Protein byl postupně dialyzován v refoldovacích roztocích se snižující se koncentrací močoviny (Tab. 2), které byly obměňovány každých 12 hodin. K dialýze bylo použito dialyzační střevo VISKING® (Serva) o průměru 16 mm. Mezi čtvrtým a pátým roztokem bylo dialyzační střevo vyměněno za nové.

2.13. Western blot

Proteiny byly rozděleny pomocí SDS-PAGE v gradientovém gelu (4 – 17.5%). Před vytvořením sendviče pro Western blot byly gel a PVDF membrána (polyvinyliden diflorid) ponořeny do metanolu. Pokud byla použita nitrocelulózkové membrány, byla ekvilibrována v blotovacím pufru s metanolem. Proteiny byly blotovány po dobu 2 h

při konstantním proudu 150 mA. Membrána s markerem byla barvena 5 minut v amidoblacku (nitrocelulóza) nebo Coomassie (PVDF membrána) a poté odbarvena v odbarvovacím roztoku. Membrány byly 2 h blokovány v 5% roztoku sušeného mléka v PBS Tween. Dále byla membrána inkubována 2 h v roztoku primární His-tag protilátky (1:2000 vyředěné 1% mlékem v PBS Tweenu). Po trojnásobném promytí (po 5 min) v PBS Tween proběhla inkubace membrány v roztoku sekundární protilátky SwAM/Px (1:1000 × vyředěné 1% mlékem v PBS Tweenu) po dobu 1 hodiny. Následně byla membrána promyta v PBS Tween za stejných podmínek. Proteiny byly obarveny pomocí substrátového roztoku 3,3'-diaminobenzidinu (DAB), který se během reakce peroxidázy s H₂O₂ oxiduje a barví do hněda. Reakce byla zastavena promytím membrány v destilované vodě.

2.14. Příprava homogenátů ze střev klíštěte *I. ricinus*

Střeva nenasátých samic klíštěte *I. ricinus* byla vypitvána a umístěna do 130 μ l PBS + 1% Triton X-100 s inhibitory proteáz (CompleteTM protease inhibitor tablets, Roche + EDTA; 1 tableta do 25 ml roztoku), zhomogenizována mechanicky a trojnásobným zmražením/rozmražením v tekutém dusíku. Po stočení 10000 × g/4 °C/10 min byl odebrán a uschován supernatant. Pomocí Bradford assay byla změřena koncentrace střevních proteinů (Tab. 7). Celková koncentrace byla stanovena na 410 mg/ml.

Tab. 7. Bradford assay – proměření standardů a vzorku DUOX.

BSA ($\mu\text{g/ml}$)	A595	II	III	avrg	Δ avrg
0	0.34	0.32	0.34	0.33	0
10	0.37	0.37	0.37	0.37	0.04
25	0.42	0.42	0.42	0.42	0.09
100	0.68	0.73	0.71	0.71	0.37
330	1.19	1.2	1.2	1.2	0.86
400	1.3	1.32	1.36	1.33	0.99
500	1.42	1.47	1.51	1.47	1.13
Střevní proteiny	1.35	1.38	1.36	1.36	1.03

2.15. Příprava králíčích polyklonálních protilátek a kontrola jejich afinity

Nejprve bylo třeba vybrat vhodného králíka pro imunizaci ověřením crossreakivity králíčích naivních protilátek proti exprimovaným proteinům z klíštěcího střeva. Králíkům zamýšlených pro imunizaci bylo odebráno 3 ml krve. Krev byla ponechána 30 minut při pokojové teplotě a poté stočena $2000 \times g/4 \text{ } ^\circ\text{C}/10 \text{ min}$. Toto sérum bylo dále použito jako primární protilátka. 2 μg vzorku klíštěcích střevních proteinů byly separovány redukcí SDS-PAGE. Následně byly proteiny z gelu přebíly na PVDF membránu. 1 vzorek byl obarven v Coomassie. 3 další vzorky byly vyblokovány 5% mlékem v PBS Tweenu/2 h a následně $3 \times$ po 10 min promyty v PBS Tweenu. Jako primární protilátka bylo použito králíčího preimunního séra, vyředěného 1:50 1% mlékem v PBS Tweenu. V tomto roztoku byly vzorky inkubovány 1 h a následně $3 \times$ po 10 minutách promyty v PBS Tweenu. Vzorky byly umístěny do 1:1000 vyředěné (1% mlékem v PBS Tweenu) SwAR/Px sekundární protilátky, kde byly inkubovány 45 minut a poté opět $3 \times$ po 10 minutách promyty v PBS Tweenu. Vyvolání vzorku proběhlo podle postupu uvedeném v kapitole 2.13.

Pro imunizaci byl vybrán králík o $m = 2200 \text{ g}$. Byl $4 \times$ imunizován pod kůži suspenzí precipitátu DUOX v PBS ($2/5$ DUOX v roztoku, $3/5$ nerozpuštěné) vždy po 14 – 21 dnech. Imunizační schéma je uvedeno v tabulce 8. 1 imunizační dávka obsahovala 25 μg proteinu. 1. dávka byla obohacena Freundovo adjuvants, zbylé 3 o nekompletní Freundovo adjuvans. Po 14 dnech od 4. imunizační dávky bylo odebráno 3 ml králíčí krve, která byla ponechána 10 minut při pokojové teplotě a poté stočena $2000 \times g/4 \text{ } ^\circ\text{C}/10 \text{ min}$. Metodou Dot blot byla ověřena přítomnost protilátek v séru imunizovaného králíka proti DUOX.

Tab. 8. Imunizační schéma.

Č. imunizační dávky	Datum imunizace
1	13.12.2011
2	5.1.2012
3	20.1.2012
4	9.2.2012

2.16. Dot blot

Vzorkem pro Dot blot analýzu byl DUOX v 8M močovíně o koncentraci 530 ng/μl. Na nitrocelulózovou membránu bylo nanášeno v šesti 20μl kapkách 5 μg tohoto vzorku. Jeden ze vzorků byl poté vyvolán v barvivu amidoblack a odbarven v odbarvovacím roztoku. Další tři vzorky byly inkubovány v přítomnosti získaných králíčích antiDUOX protilátek o různém stupni ředění. Poslední dva vzorky byly inkubovány v přítomnosti králíčího preimunního séra o různé koncentraci. Po 120 minutách inkubace v primárních protilátkách byly oba vzorky promyty 3 × po 10 minutách promyty v PBS Tweenu a následně umístěny na 60 minut do 1:1000 vyředěné SwAR/Px (1% mlékem v PBS Tweenu) sekundární protilátky. Po promytí v PBS Tween byly vzorky vyvolány v roztoku 100mM Tris-Cl s DAB přidáním 50 μl H₂O₂.

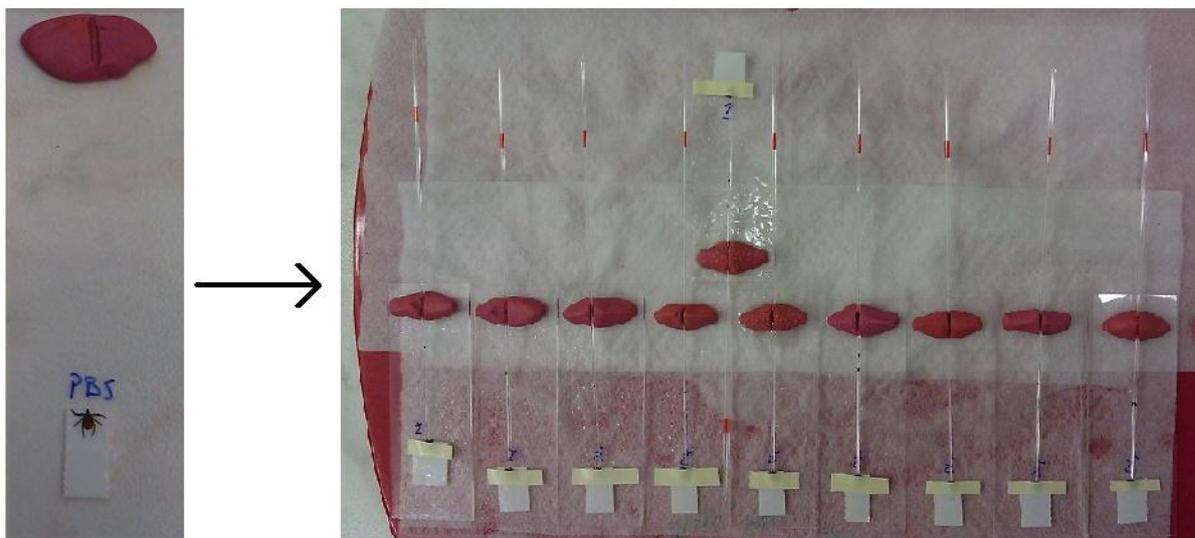
2.17. Kultivace bakterií

E. coli (SBS 363) a *S. aureus* byly v 6 ml LB média inkubovány 12 hodin při 37 °C. *C. albicans* byla rovněž inkubována po dobu 12 hodin, ale v 6 ml SB média a při 27 °C. Buňky byly spektrofotometricky proměřeny a vyředěny v PBS tak, aby každá kultura obsahovala cca 1000 buněk/μl. Vycházel jsem z faktu, že OD = 1 odpovídá u *E. coli* 1 × 10⁹ buněk/ml a podle tohoto modelu jsem připravil i ostatní dvě kultury. Vyředěním jednotlivých kultur na stejnou hodnotu OD bylo dosaženo stejné koncentrace buněk v jednotlivých kulturách.

2.18. Kapilární infekce klíšťat

30 samic *I. ricinus* bylo infikováno směsnou suspenzí *E. coli*, *S. aureus* a *C. albicans* v poměru 1:1:1. 10♀ sálo směs živých buněk, 10♀ směs mrtvých buněk (usmrcené teplotou - 100 °C/15 min) a 10♀ sálo pouze PBS. Na hypostom a jednu palpu byla nasazena kapilára s příslušnou suspenzí (Obr. 5). Klíšťata sála při 37 °C a byla odstrojena po nasátí

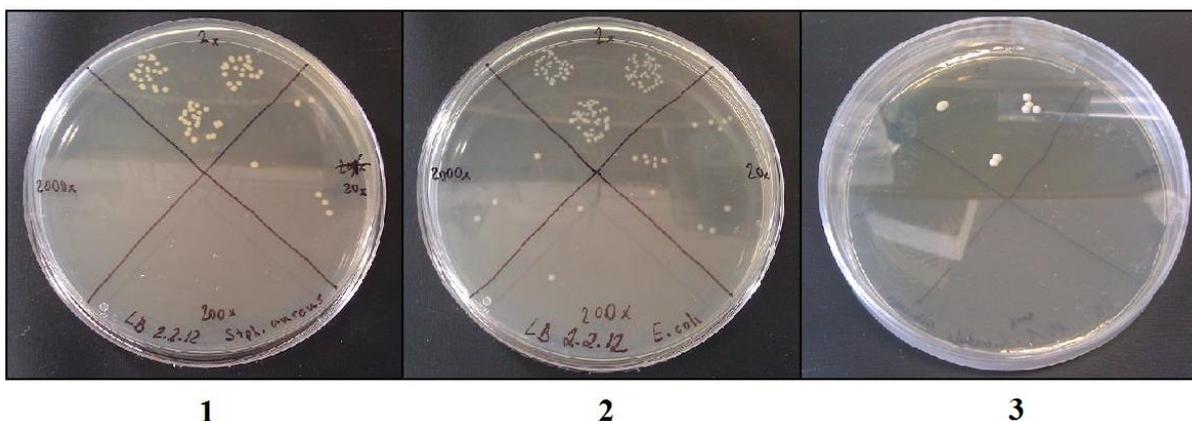
4 μ l suspenze. Po infekci byla klíšťata ponechána 12 hodin při 25 °C. Vypreparovaná střeva byla přenesena do roztoku RAI pufru (Machery-Nagel) a β -merkaptoetanolu (128 mM).



Obr. 5. Strojění klíšťat na sání patogenů z kapilár.

2.19. Kvantifikace patogenů

Množství buněk obsažených v kultuře bylo zpětně stanoveno pomocí Miles and Misra metody. Krátce: jednotlivým buněčným kulturám byla proměřena jejich optická densita a tyto kultury byly vyředěny v PBS na $OD = 0.1$. Kultury byly dále ředěny na $OD = 0.1 \times 10^{-5}$. Desítkovým ředěním ($2\times, 20\times, 200\times, 2000\times$) byly připraveny zásobní roztoky, které byly ve třech 20 μ l kapkách nanášeny na danou čtvrtinu LB nebo SB misky. Plotny s kulturami byly inkubovány přes noc (Obr. 6) a poté vypočítán přibližný počet buněk v 1 ml (Tab. 9).



Obr. 6. Určení počtu buněk v buněčné kultuře Miles and Misra metodou. 1 - *S. aureus*, 2 - *E. coli*, 3 - *C. albicans*. Plotny byly rozděleny na kvadranty. Na horní kvadrant byly nanášeny 2× vyředěné kultury, na pravý 20×, na dolní 200× a na levý 2000× vyředěné kultury

Tab. 9. Počet buněk v 1 ml.

Buněčná kultura	Počet buněk/ml
<i>E. coli</i>	$4 \cdot 10^6$
<i>S. aureus</i>	$10 \cdot 10^6$
<i>C. albicans</i>	$0.6 \cdot 10^6$

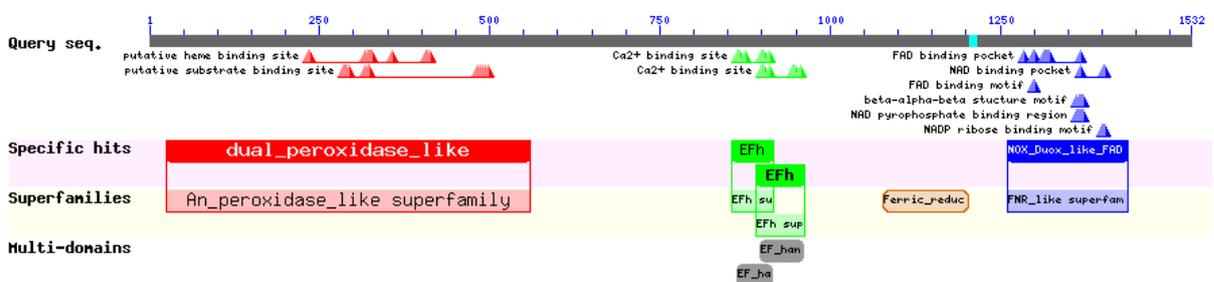
2.20. Tkáňový profil, Real-time PCR

Templátem pro RC-PCR byla cDNA získaná z izolovaných střev. Byly použity primery DUOX F a DUOX R a pro kontrolu primery pro feritin, jehož exprese je ve všech tkáních konstantní (Kopáček et al., 2003). Vybrané úseky byly amplifikovány při teplotě annealingu $t = 50.1 \text{ }^\circ\text{C}$ pro DUOX a $t = 54.8 \text{ }^\circ\text{C}$ pro feritin pomocí Taq Purple DNA polymerázy (Invitrogen). Bylo provedeno 40 cyklů PCR pro DUOX, 35 cyklů pro feritin. PCR program: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 60s, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30s, $50.1 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s pro DUOX i feritin, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 60s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 7 min. PCR produkty byly rozděleny na 1% agarózovém gelu s EtBr při $U = 100 \text{ V}$, $t = 30 \text{ min}$.

3. Výsledky

3.1. Identifikace genu pro DUOX v genomu *I. scapularis* (Is DUOX)

Pomocí sekvence genu pro DUOX u *D. melanogaster* (FlyBase: NM_134871) byl programem BLAST nalezen jeden ortolog v genomu *I. scapularis* (VectorBase: ISCW007865). Provedený proteinový alignment ukázal značnou konzervovanost tohoto genu mezi bezobratlými živočichy (Tab. 10). DUOX je multidoménový protein o molekulové hmotnosti 176 kDa, složený ze 4 domén. Proteinová sekvence a uspořádání domén jsou uvedeny na obrázku 8. Barevné označení jednotlivých domén odpovídá barevnému označení v proteinové sekvenci. Nukleotidová sekvence je znázorněna v příloze.



MGVSP IWFLEEEPYSSQMHI EKQR YD GWYNNLAHQDWGAVESQLVLRKAPSSYADGVYMI AEGRPS PRSLSQDLFKGEDGL
PSTRNLT VLVFVFFGQVISSEVLMASEPGCPIEFHRIPI SRCDEMYDSKCTGQRYMPFHRAHYDVKTGQS PNNPREQTNL A
TSWIDASYVYSTSETWANTMRSFENGTFRTADTDSRLPPKNKERVPLFNSPPARYLGLIMNPERMFI LGDPRTNQNPGLLA
FGILFFRYHNVAHLRIKNTHPDWTDEDI FLHARRYVIAAMQNVIVYEVVPTLLGENVTEYTGYPKDVHPGISHFQAAAF
RFPHTSIPPPIYRRDRSCNFDLTKNGFKALRLCSTWWLSEELVPSAGVDEFLGMAEQIAEKEDQILCSDVDRDKLFGPME
FTRRDLAALDIMRGRDNGLPDYNVTRRHFGLEPAITTTWTQINEKLARSNPEIFEKLRKLYHDNLDNDVDFVGGMLSEDEGR
FGPLFRKIITREQFERLRDADRFWFENVHNGPRARADRYLSFQPAEAVDIP LGVSSPQQINSSVLEPCMI LDGWDFRGN
EVAYIYSCLVLAFIPISEHPPTLPGQAVNRVPPFLIRRKGPLPQFQQINSSVLEPCMI LDGWDFRGNVAYIYSCLVL
AFIPIICAGLGYGVIKLQNRNRNIIKAKKEINIGKNYDKLYVKEWLHQNHKRFVVKIGPDESLSTVNRKGEVLRKVDFK
SVAALVVEISTMAKKPMCLVRS PRDHDLVLQFDSVHSRKKFLTKLESFLVNRKKTLESIDTTRDTMIANAETKEKRQKR
LEHFFREAYALTFLGLKPGEKRLLEDVGNVIMVMRTSLSKQEF AEALGMKPD SLFVKQMFNCVDKDKDERISFQEF LDTV
VLFTRGKSEDKFRIIFDMCDKNGNGMIQKQELTKMLRSLVDIAKTNSLSEYETTDIISGMYASAGLDNTEELNYEDFKKM
MKEHRGDFIAIGLDCKGANQNFLDTS SNVARMTSFQINQPAEDPPSWTIQKWNQVTFLEENRQHVYFLVYFVVTIVLF
IERFI FYSYMAEHMDLRHVMGIGIAITRGSAA SLSFCYS LLLLTMCRNLITKIRELPLQQYIPLDSHVQFHKIVALTALE
FSLVHTVGHYINFYHVSTQPAEHLRCMTKEMHFDSEFKSTITFWVFQTVTGITGVCLFVVMCII FIFAHPKIRQKAYSF
WMTHSLYILLYILCLLHGQAKLTGT PRFWMFFVGPAAIIFTLDKVVS LQTKYMELDILDTELLPSDVTRVKFTRPPNFKYL
SGQWVRLGCTGFRASEYHSLTTSAPHENYLSVHVKAQGPWTWKL RNYFDPNNLHEGMLPKVRLGEGPFGGNGQDWYKFEI
AVMVGGGIGVTPYASILNDLVFGTSTNRYSGVACKKVYFMWICP SHRHF EWFIDVLRDVERKDVTNVLEIHFITQF EHK
FDLRTTMLYICENHFQRI SNRSMTGLKAINHFGRPDMTAFLKVFVQQHHSYVSKVGVFSCGSPALTKSVSSACETVNNNR
KLPYFIHHYENF

Obr. 7. Doménová struktura membránového proteinu Is DUOX. NADPH oxidáza je enzymatický transmembránový komplex sestávající ze 4 domén, katalyzující vznik ROS. Duální peroxidáza je největší doménou sekvence, kde dochází k produkci ROS. 2 EF domény indukují navázáním Ca^{2+} iontů konformační změny EF motivu, které vedou k aktivaci nebo inaktivaci DUOX proteinu. Fe^{3+} reduktáza je FAD dependentní dehydrogenáza mající přenosovou aktivitu elektronů, které redukují kyslík na superoxidové anionty, prekurzory pro vznik mikrobicidních oxidantů.

Tab. 10. Porovnání proteinové homologie DUOX mezi jednotlivými organismy (%).

	<i>Homo sapiens</i>	<i>Apis mellifera</i>	<i>A. gambiae</i>	<i>D. melanogaster</i>
<i>I. scapularis</i>	57	84	84	77
<i>D. melanogaster</i>	58	87	94	
<i>A. gambiae</i>	57	90		
<i>Apis mellifera</i>	59			

3.2. Identifikace ortologu DUOX v klíštěti *I. ricinus* (Ir DUOX)

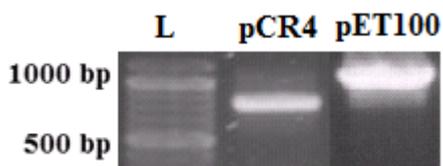
Na základě nukleotidové sekvence ISCW007865 byly navrženy primery pro identifikaci ortologu N-terminální části domény DUOX klíštěte *I. ricinus* (Tab. 11). Podle doménové predikce odpovídá tato oblast peroxidázové doměně.

Tab. 11. Sekvence navržených primerů pro Ir DUOX podle sekvence Is DUOX.

DUOX F	5' - cac cTA CTC GTC GCA GAT GCA CAT C - 3'
DUOX R	5' - tcA GAT GTC CTC GTC CGT CCA GTC - 3'

Malými písmeny jsou vyznačeny nukleotidy přidávané pro zaklonování do vektoru, resp. pro zajištění stop-kodonu na C- konci

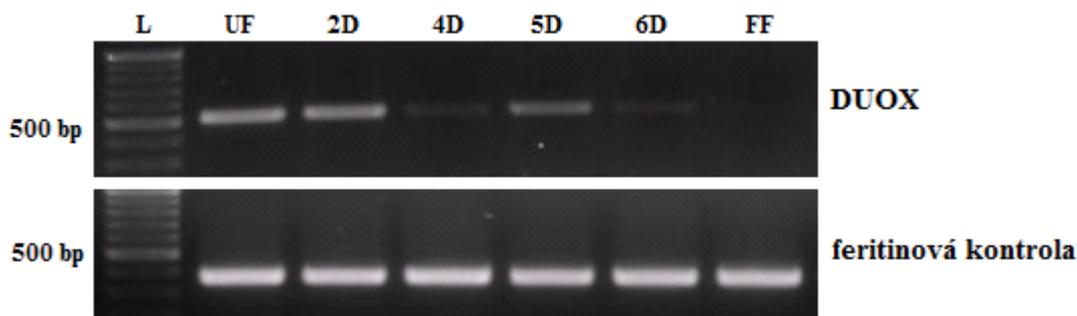
Templátem pro amplifikaci byla cDNA izolovaná ze střev samic klíštěte *I. ricinus*. Byl amplifikován produkt o velikosti ~ 750 bp, který byl izolován z gelu a následně zaklonován do 2 typů vektorů. Pro sekvenaci byl použit vektor pCR4 (Obr. 8), který byl po zaklonování fragmentu DUOX transformován do One Shot® TOP10 chemicky kompetentních *E. coli*. Sekvenací bylo potvrzeno, že se jedná o gen pro DUOX. Se získanou sekvencí fragmentu genu pro DUOX bylo provedeno srovnání nukleotidových sekvencí (alignment) proti genu pro DUOX klíštěte *I. scapularis* (Obr. 9). Tento alignment ukázal 98% homologii mezi DUOX geny těchto dvou blízké příbuzných klíšťat. Pro expresi N-terminálního fragmentu DUOX byl použit pET100 (Invitrogen), který byl transformován do expresních BL21 buněk chemicky kompetentní *E. coli*.



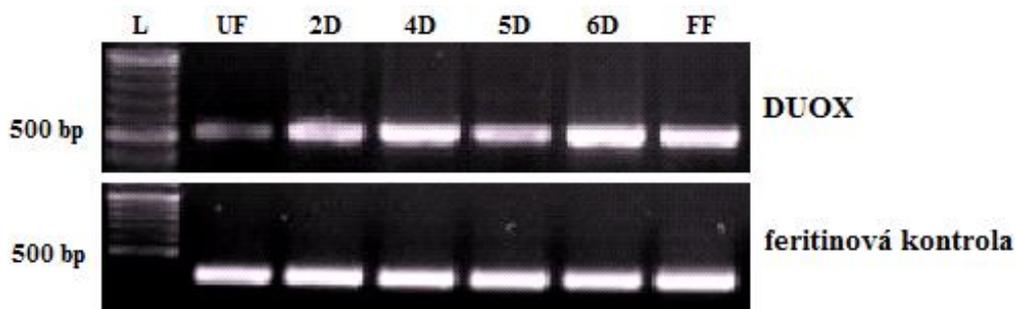
Obr. 8. Zaklonování fragmentu do 2 typů vektorů. L - ladder, pCR4 - fragment DUOX zaklonovaný v plazmidu pCR4 (DUOX F – DUOX R - 771 bp), pET100 - fragment DUOX zaklonovaný v expresním plazmidu pET100 (T7F – T7R - 1051 bp)

3.3. Tkáňový profil transkripce DUOX ve střevě, slinných žlázách a vaječnicích klíštěte *I. ricinus*

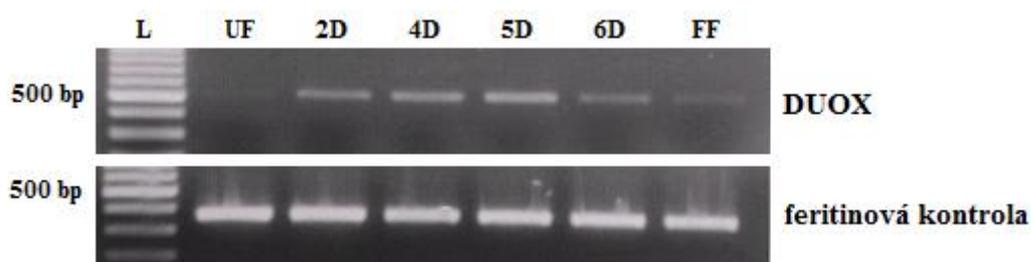
Metodou RT-PCR byla prověřena míra exprese Ir DUOX v jednotlivých tkáních *I. ricinus* v průběhu sání (dynamický profil). Hlavním záměrem provedeného pokusu byla identifikace rostoucí/klesající tendence transkripce Ir DUOX. Templátem pro RT-PCR byla cDNA izolovaná ze střev, slinných žláz a vaječníků vypitvaných ze samic *I. ricinus* v různém stádiu sání na morčeti. Výsledky pokusu ukázaly, že Ir DUOX je exprimována ve všech testovaných tkáních, ale dynamika exprese v průběhu sání je rozdílná. Ve střevě se zdá být Ir DUOX nejvíce exprimována u nenasátých klíšťat a v průběhu sání jeho exprese (s výjimkou 5. dne) klesá (Obr. 10). Opačný trend byl pozorován u slinných žláz, kde exprese Ir DUOX byla u nenasátých klíšťat nejnižší, ale již od druhého dne sání byly hladiny mRNA výrazně zvýšeny na konstantní úroveň (Obr. 11). Ve vaječnicích byla od 2–5. dne pozorována zvýšená exprese Ir DUOX, po 5. dni došlo k down regulaci až na minimální hladinu mRNA (Obr. 12). Tyto zajímavé rozdíly v dynamice exprese DUOX v různých tkáních bude nutné v budoucnu potvrdit pomocí kvantitativní real-time PCR.



Obr. 10. Dynamika exprese Ir DUOX ve střevě v průběhu sání. Sloupce znázorňují cDNA z různých fází sání. L - ladder, UF - cDNA z nenasátých samic, 2D - po 2 dnech sní, 4D - po 4 dnech sání, 5D - po 5 dnech sání, 6D - po 6 dnech sání, FF - úplné nasátí



Obr. 11. Dynamika exprese Ir DUOX ve slinných žlázách v průběhu sání. Sloupce znázorňují cDNA z různých fází sání. L - ladder, UF - cDNA z nenasátých samic, 2D - po 2 dnech sní, 4D - po 4 dnech sání, 5D - po 5 dnech sání, 6D - po 6 dnech sání, FF - úplně nasátí



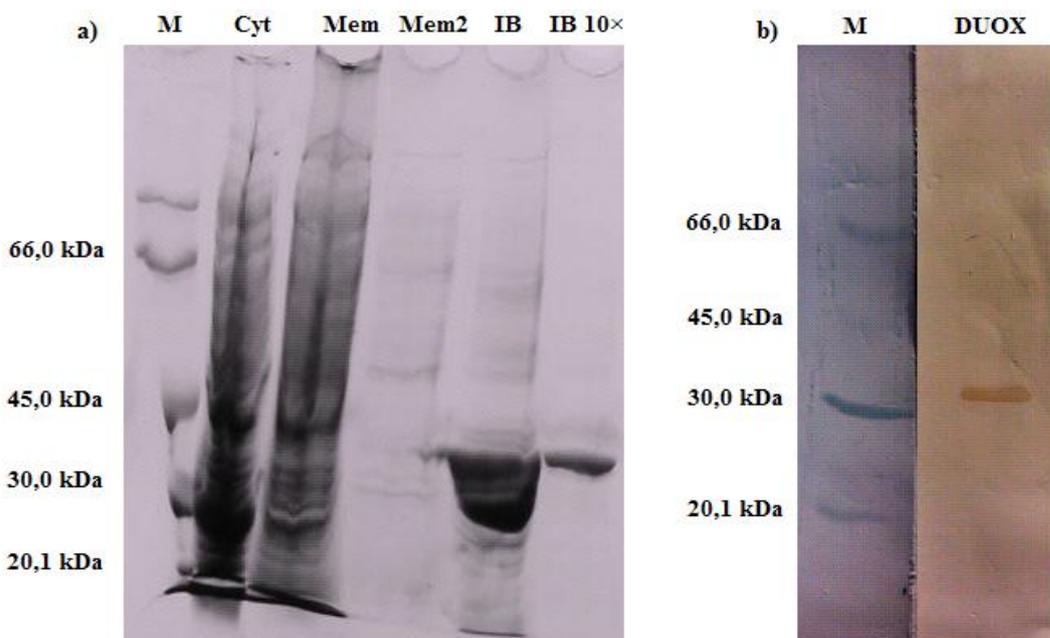
Obr. 12. Dynamika exprese Ir DUOX ve vaječnicích v průběhu sání. Sloupce znázorňují cDNA z různých fází sání. L - ladder, UF - cDNA z nenasátých samic, 2D - po 2 dnech sní, 4D - po 4 dnech sání, 5D - po 5 dnech sání, 6D - po 6 dnech sání, FF - úplně nasátí

3.4. Exprese rekombinantního proteinu

Fragment DUOX byl zaklonován do expresního vektoru pET100 a jeho přítomnost ověřena pomocí PCR s T7F/R primery (Obr. 8) a sekvenací. Naměřená koncentrace vektoru se zaklonovaným DUOX byla pomocí UV - spektrofotometru stanovena na 37 ng/μl. Plazmidy byly transformovány do expresních BL21 *E. coli*.

3.5. Detekce rekombinantního proteinu v inkluzních tělíčkách

Z bakteriálního peletu byly izolovány jednotlivé proteinové frakce – rozpustná, membránová a frakce inkluzních tělísek. Přítomnost velkého množství proteinu o teoretické velikosti fragmentu DUOX byla pomocí SDS-PAGE prokázána v inkluzních tělíčkách (Obr. 13a). Metodou Western blotu s pomocí protilátek proti polyhistidinovému motivu bylo prokázáno, že se jedná o rekombinantní fúzní protein (Obr. 13b). Tento materiál byl následně použit pro afinitní purifikaci na kobaltové koloně.



Obr. 13. Detekce rekombinantního fragmentu DUOX. (a) SDS-PAGE proteinových frakcí bakteriální kultury. M - LMW marker, Cyt - rozpustné cytosolické proteiny, Mem/Mem2 - rozpustné membránové proteiny, IB - Ir DUOX v inkluzních tělískách, IB 10× - Ir DUOX v inkluzních tělískách 10× zředěné. (b) Western Blot fúzního rekombinantního proteinu s anti His-tag protilátkami. DUOX - Ir DUOX detekovaný anti His-tag protilátkou (1:2000) metodou Western blot

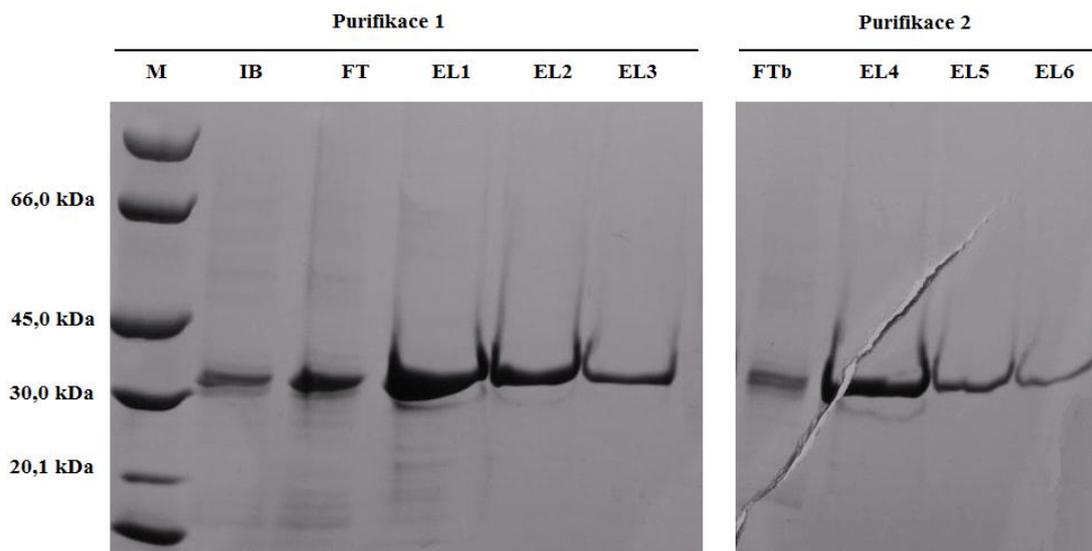
Velikost DUOX fragmentu byla odečtena na 32 kDa. Fúzní protein se sekvencemi vektoru pET100 je znázorněn na obrázku 14.

```
MRGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDHDPFTYSSQMHIKQRYDGGWYNNLAHQ
DWGAVESQLVRKAPSSYADGVYMIAGRPSRSLSQDLFKGEDGLPSTRNLTVLFVFFGQVIS
SEVLMASEPGCPIEFHRIPISRCDEMYDSKCTGQRYMPFHRAHYDVKTGQSPNNPREQTNLAT
SWIDASVYVYSTSETWANTMRSFENGTFRTADTDSRLPPKNKERVPLFNSPPARYLGIMNPERM
FILGDPRTNQNPGLLAFGILFFRYHNVHALRIN
```

Obr. 14. Proteinová sekvence výsledného fúzního fragmentu Ir DUOX. Žlutě je vyznačena část proteinu pocházející z vektoru pET100, zeleně je vyznačena část specifická pro Ir DUOX. Teoretická hmotnost celého fúzního proteinu je 32 083 Da

3.6. Purifikace rekombinantního His-tag fragmentu

His-tag DUOX agregovaný v inkluzních tělískách byl purifikován chelatační chromatografií v přítomnosti 8M močoviny. Purifikovaný protein byl eluován promytím kolony 250mM a 500mM imidazolem. Jednotlivé frakce byly ověřeny pomocí SDS-PAGE (Obr. 15). Po purifikaci Ir DUOX byla pomocí Bradford assay změřena jeho koncentrace. Celkový zisk proteinu ze 400 ml LB média byl stanoven na 7.8 mg.

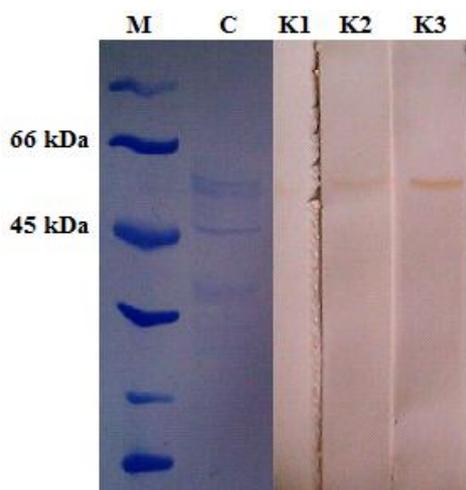


Obr. 15. Purifikace DUOX přes Co^{2+} kolonu za použití imidazolu. M - LMW marker, IB - inkluzní tělíčka (Ir DUOX), FT/FTb - frakce nezachycená na koloně, EL1, EL2, EL3, EL4 - rekombinantní protein uvolněný z kolony po promytí 250mM imidazolem, EL3, EL6 - rekombinantní protein uvolněný z kolony po promytí 500mM imidazolem

Po purifikaci přes Co^{2+} kolonu byla ve vzorku FT detekována vysoká koncentrace proteinu, proto byla provedena druhá purifikace. Po této druhé purifikaci se snížila přítomnost proteinu ve vzorku FTb. Fakt, že se na koloně nezachytil všechen rekombinantní protein, pravděpodobně způsobilo vysycení kolony.

3.7. Kontrola preimunních sér králíků určených pro imunizaci

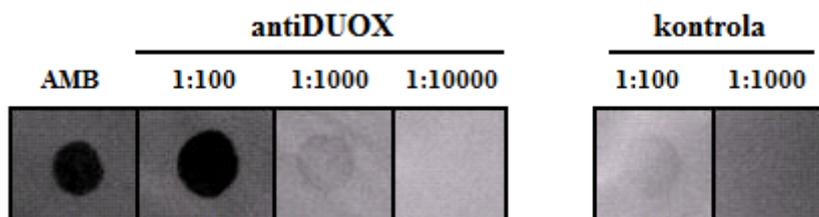
Pro výběr králíka vhodného pro imunizaci byla nejprve otestována reakce jejich preimunních sér se střevními homogenáty klíšťat. Koncentrace střevních proteinů byla stanovena pomocí Bradford assay. Klíštěcí střevní proteiny byly ověřeny pomocí SDS-PAGE (nanášeno 2 $\mu\text{g/ml}$). Pomocí metody Western blot byl proveden screening králičích naivních sér (Obr. 16). 3 různá naivní králičí séra detekovala klíštěcí střevní protein o velikosti 55 kDa, což neovlivní detekování nativního DUOX specifickými protilátkami, jehož velikost je cca 180 kDa.



Obr. 16. Kontrola crossreakivity králičích naivních protilátek proti fragmentu DUOX s proteiny klíčecího střevního extraktu. Do každé řady bylo nanášeno 2 μ g vzorku klíčecích střevních homogenátů. M - LMW marker, C - kontrola přítomnosti klíčecích střevních proteinů v Coomassie, K1, K2, K3 - protein detekovaný králičími preimunními séry (pocházející ze třech zvířat) vyředěnými v poměru 1:50

3.8. Příprava králičích polyklonálních protilátek a kontrola jejich specifity

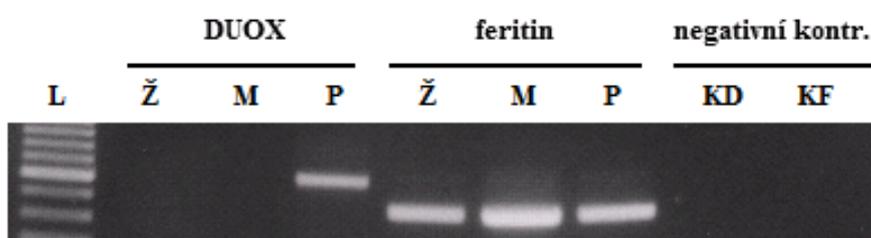
Protilátky byly získány imunizací králičího plemene činčila velká. Sérum odebrané po 4. imunizační dávce bylo použito pro detekci antiDUOX kvality protilátek obsažených v séru. Tato specifita byla ověřena metodou Dot blot (Obr. 17). Ukázalo se, že sérum imunizovaného králíka vykazuje nejméně 10 \times silnější reakci s rekombinantním fragmentem DUOX (původní antigen), než pre-imunní sérum. Díky značné specifitě protilátek proti rekombinantnímu fragmentu, nebyla tedy nutná další imunizace. Králík byl usmrcen, vykrcen a z krve bylo získáno sérum.



Obr. 17. Kontrola specifity protilátek na rekombinantní DUOX metodou Dot blot. AMB - vz. v amidoblacku, 1:100 – 1:10000 - detekce DUOX antiDUOX protilátkami o různé koncentraci. Kontrola byla provedena za přítomnosti pre-imunního séra o různé koncentraci

3.9. Vliv přítomnosti patogenů na regulaci transkripce genu pro DUOX

V původních pracích, které popisují význam DUOX ve střevní imunitě *D. melanogaster* (Ha et al., 2005) i v jejich úloze při přenosu Plasmodií komárem *A. gambiae* (Oliveira et al., 2011), bylo ukázáno, že jejich exprese je silně závislá na přítomnosti ostatní bakteriální mikroflóry. Na základě faktů z těchto článků byl proveden pokus, při kterém byly samice klíštěte *I. ricinus* uměle infikovány směsí živých nebo mrtvých mikrobus (G⁻ bakterie - *E. coli*, G⁺ bakterie - *S. aureus* a kvasinka - *C. albicans*). Byl sledován vliv této infekce na expresi DUOX v střevech nenasátých klíšťat (Obr. 18).



Obr. 18. Transkripce Ir DUOX ve střevě nenasátých samic *I. ricinus* po umělé infekci směsí mikrobus. L -ladder, Ž - živé mikroby, M - mrtvé mikroby, P - kontrola mikrobiální stimulace sterilním PBS, KD - negativní kontrola bez templátu s DUOX F/R primery, KF - negativní kontrola bez templátu s feritinovými F/R primery. Sloupce DUOX a feritin detekují míru exprese testovaných genů

Pokus přinesl překvapivé výsledky. PCR střevní cDNA samic klíštěte *I. ricinus*, infikovaných směsí G⁻, G⁺ a kvasinek, ukázala úplnou supresi exprese Ir DUOX, tedy zřejmě ztrátu produkce ROS, které jsou popsány v literatuře jako hlavní antimikrobiální látky. Toto pozorování je dále diskutováno v následující kapitole.

4. Diskuze

Experimenty zabývající se dynamikou exprese Ir DUOX ukázaly rozdílné trendy u jednotlivých tkání během sání. Nejzajímavější výsledek byl pozorován u expresního profilu Ir DUOX ve střevě klíštěte *I. ricinus*, kde byla během prvních dní sání konstantní hladina produktů tohoto genu, během dalšího sání ale byla exprese snížena na minimální hladinu. Tento pokles by mohl souviset s příjmem hemoglobinu (hemu). Oliveira et al. ukázal, že u komára *Aedes aegypti* dochází po nasátí krve k výraznému poklesu produkce ROS ve střevě, související s aktivitou DUOX (Oliveira et al., 2011). Ve střevě klíšťat, kde dochází k intracelulárnímu zpracování hemoglobinu, je také zvýšená pravděpodobnost vzniku hydroxylových radikálů, fatálních pro vlastní organismus. Proto se domníváme, že pozorovaný pokles exprese DUOX ve střevě klíšťat by mohl souviset s jejich obrannými mechanismy proti oxidativnímu stresu. Tuto domněnku potvrzuje i fakt, že průběh exprese DUOX ve slinných žlázách i vaječnících, které se nedostanou do přímého kontaktu s hemem nebo hemoglobinem, je odlišný. Zajímavé pozorování přinesl i transkripční profil exprese Ir DUOX ve slinných žlázách, kde byla hladina transkriptu téměř konstantní po celou dobu sání. Je pravděpodobné, že antimikrobiální aktivita ROS, produkovaných DUOX, se podílí na obraně klíštěte již v době fixace na kůži hostitele. Na tomto rozhraní se vyskytují potenciálně škodlivé mikroorganismy, které mohou být těmito mechanismy eliminovány (Wikel et Bergman, 1997)

V imunitním systému organismu *D. melanogaster* byla doposud hlavní funkce v imunitních reakcích připisována složkám hemocoelové (hemolymfatické) imunity. Největší pozornost byla doposud věnována úloze antimikrobiálních peptidů (AMP) jako drosomycin, cecropin nebo defensinů. Oproti těmto představám Ha et al. (2005) ukázal, že nejdůležitějším obranným mechanismem *D. melanogaster* je střevní imunita. Zde dochází k produkci ROS transmembránovou DUOX a to hlavně v přítomnosti mikroorganismů. Svá tvrzení podpořil pokusem na mutantních muškách se sníženou expresí pro AMP. Po nakažení těchto mušek neletálními bakteriemi nebyla pozorována zvýšená mortalita. Po RNA interferenci DUOX byla pozorována naprostá ztráta schopnosti produkce ROS. Infekce DUOX deficientních mušek stejnými bakteriemi vedla k výrazně vyšší úmrtnosti. Role ROS v antimikrobiální obraně střevního epitelu byla potvrzena experimenty s enzymem katalázou. Kataláza je hlavním enzymem pro rozklad ROS H_2O_2 , který je produktem DUOX. Deaktivace

genu pro katalázu opět vedla ke zvýšené mortalitě mušek. Přesná regulace DUOX u *D. melanogaster* je zásadní pro udržení vlastní střevní mikroflóry a zároveň efektivní obraně proti invadujícím mikrobům. Regulace DUOX, vedoucí k masivní produkci ROS, má vlastní signální dráhu přes PLC β protein a kaskádu dalších proteinů (Bae et al., 2010). Důležitou složkou v této regulaci jsou mikrobiální peptidoglykanové (PG) ligandy. Mikroby střevní mikroflóry produkují non-PG ligandy, které neaktivují kaskádu vedoucí ke vzniku nadměrného množství ROS. Dochází tedy pouze k bazální produkci ROS, které zajišťují rutinní mikrobiální kontrolu. V přítomnosti velkého množství patogenů, které produkují PG ligandy, dochází k aktivaci této dráhy a maximalizaci produkce ROS pro boj se škodlivými mikroorganismy (Bae et al., 2010). Rovnováha mezi produkcí ROS a jejich degradací se tak ukázala jako nezbytná ve střevní imunitě *D. melanogaster* v pokusech provedených *in vitro* (Ha et al., 2005). Funkce DUOX *in vivo*, kde se patogeny vyskytují nepřetržitě, zatím zůstává neobjasněna.

Výzkum DUOX a jeho funkce v přítomnosti patogenů byl proveden i u krev sajícího komára *A. aegypti*. U těchto komárů byly pozorovány změny v produkci DUOX v přítomnosti bakterie *Enterobacter asburiae*, která byla izolována ze střev nasátých komárů téhož druhu. Infekce touto bakterií společně s askorbovou kyselinou (která vychytává ROS) a solným bikarbonátovým agarózovým pufrem (BBSA) vedla ke značnému poklesu životaschopnosti komárů. Zároveň byl detekován 4 násobný nárůst bakterií po 24 hodinách od infekce (Oliveira et al., 2011). Předpokládalo se, že zvýšená úmrtnost přímo souvisí s proliferací bakterií. Toto pozorování demonstruje, že bakteriální růst ve střevech komárů v přítomnosti askorbové kyseliny, bylo způsobeno absencí ROS. Pro ověření tohoto tvrzení byla infekce *E. asburiae* zopakována v přítomnosti BBSA a DPI (dyphenyleneiodonium), který inhibuje ROS produkci. Výsledky této kontroly byly velmi podobné. Pokles ROS ve střevech je tedy způsoben příjmem hemoglobinu (Oliveira et al., 2011). U komárů *A. aegypti*, kteří sáli pouze BBSA nedocházelo ke snížení produkce ROS ve střevě. Přítomnost ROS vedla k usmrcení bakterií ve střevech a zvýšení přežití komárů. Obohacením BBSA hemoglobinem vedlo ke značnému snížení ROS produkce. Stejně výsledky přinesl i pokus, kdy bylo k BBSA přidán pouze hem o nízké koncentraci. Došlo k potlačení produkce ROS téměř ve stejné míře jako v případě obohacení BBSA plnohodnotným hemoglobinem (Oliveira et al., 2011). Po exkreci hemoglobinu se hladina ROS vrátila na původní hladinu. Je patrné, že pokles ROS ve střevě souvisí se způsobem výživy. Hematofágní organismy během sání vykazují snížení

ROS, zatímco *D. melanogaster*, živící se na kvasícím ovoci, prokazuje výrazné zvýšení ROS (Ha et al., 2005)

Nejvíce překvapivé výsledky přinesl experiment, ve kterém byla prováděna mikrobiální kapilární infekce samic *I. ricinus* směsí bakterií a kvasinek. Tento experiment ukázal, že po infekci živými i mrtvými mikroorganismy dochází k výraznému potlačení exprese DUOX u nenasátých klíšťat. Tento zajímavý jev bude potřeba vysvětlit dalšími opakovanými experimenty. Bude např. zajímavé zjistit, jestli za pozorovaným efektem je pouze některý z aplikovaných mikrobů a jestli bude možno tuto down regulaci pozorovat i při aplikaci jednotlivých „pattern recognition“ molekul typických pro jednotlivé mikroorganismy (lipopolysacharidy pro G^- bakterie, peptidoglykany pro G^+ bakterie popř. β -1,3-glukany pro kvasinky). Pro přesnější kvantifikaci úrovně exprese DUOX bude lépe použít qRT-PCR.

5. Závěr

- Byl identifikován gen pro DUOX *I. ricinus*, který je ortologem DUOX *I. scapularis*
- Provedené transkripční profily ukázaly rozdílné hladiny transkriptu DUOX během klíčtějšího sání
- Byl připraven rekombinantní fragment Ir DUOX a vytvořeny antiDUOX protilátky
- Byl potvrzen negativní efekt patogenů na expresi Ir DUOX ve střevě klíšťat

6. Seznam literatury

- Ameziane-El-Hassani R**, Morand S, Boucher JL, Frapart YM, Apostolou D, Agnandji D, Gnidehou S, Ohayon R, Noël-Hudson MS, Francon J, Lalaoui K, Virion A, Dupuy C (2005). Dual oxidase-2 has an intrinsic Ca²⁺-dependent H₂O₂-generating activity, *J Biol Chem.*, 280:30046–54
- Bae YS**, Choi MK, Lee WJ (2010). Dual oxidase in mucosal immunity and host-microbe homeostasis, *Trends Immunol.*, 31:278–87
- Bánfi B**, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnár GZ, Krause KH, Cox JA (2004). Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5), *J Biol Chem.*, 279:18583–91
- Barthold SW**, de Souza M, Fikrig E, Persing DH (1992). Lyme borreliosis in the laboratory mouse, p. 223–242. In S. E. Schutzer (ed.), *Lyme disease: molecular and immunologic approaches*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY
- Beutler B** (2004). Innate immunity: an overview, *Mol Immunol.*, 40:845–59
- Bevins CL**, Martin-Porter E, Ganz T (1999). Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract, *Gut.*, 45:911–5
- Bilej M**, Procházková P, Silerová M, Josková R (2010). Earthworm immunity, *Adv Exp Med Biol.*, 708:66–79
- Bonnet S**, Jouglin M, L'Hostis M, Chauvin A. (2007). *Babesia* sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*, *Emerg Infect Dis.*, 13:1208–10
- Burešová V**, Hajdušek O, Franta Z, Loosová G, Grunclová L, Levashina EA, Kopáček P (2011). Functional genomics of tick thioester-containing proteins reveal the ancient origin of the complement system, *J Innate Immun.*, 3:623–30
- Burešová V**, Hajdušek O, Franta Z, Sojka D, Kopáček P (2009). IrAM-An alpha2-macroglobulin from the hard tick *Ixodes ricinus*: characterization and function in phagocytosis of a potential pathogen *Chryseobacterium indologenes*, *Dev Comp Immunol.*, 33:489–98
- Ceraul SM**, Sonenshine DE, Hynes WL (2002). Resistance of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) following challenge with the bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae), *J Med Entomol.*, 39:376–83
- Chrudimská T**, Slaninová J, Rudenko N, Růžek D, Grubhoffer L (2011). Functional characterization of two defensin isoforms of the hard tick *Ixodes ricinus*, *Parasit Vectors.*, 4:63
- Clark RA**, Epperson TK, Valente AJ (2004). Mechanisms of activation of NADPH oxidases, *Jpn J Infect Dis.*, 57:S22–3
- Covarrubias L**, Hernández-García D, Schnabel D, Salas-Vidal E, Castro-Obregón S (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active?, *Dev Biol.*, 320:1–11
- Cross AR**, Segal AW (2004). The NADPH oxidase of professional phagocytes-prototype of the NOX electron transport chain systems, *Biochim Biophys Acta.*, 1657:1–22
- Davies SA**, Dow JA (2009). Modulation of epithelial innate immunity by autocrine production of nitric oxide, *General and Comparative Endocrinology* 162, 113–121
- De Deken X**, Wang D, Many MC, Costagliola S, Libert F, Vassart G, Dumont JE, Miot F (2000). Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family, *J Biol Chem.*, 275:23227–33
- de la Fuente J**, Estrada Pena A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE. (2008). Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals, *Front Biosci.*, 13:6938-46
- Fingerle V**, Wilske B (2006). Ticks, tick bites and how best to remove the tick, *MMW Fortschr Med.*, 148:30–2
- Fogaça AC**, Almeida IC, Eberlin MN, Tanaka AS, Bulet P, Daffre S (2006). Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases, *Peptides*, 27:667-74
- Fogaça AC**, da Silva PI Jr, Miranda MT, Bianchi AG, Miranda A, Ribolla PE, Daffre S (1999). Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*, *J Biol Chem.*, 274:25330–4
- Fraser CM**, Casjens S, Huang WM, Sutton GG, Clayton R, Lathigra R, White O, Ketchum KA, Dodson R, Hickey EK, Gwinn M, Dougherty B, Tomb JF, Fleischmann RD, Richardson D, Peterson J, Kerlavage AR, Quackenbush J, Salzberg S, Hanson M, van Vugt R, Palmer N, Adams MD, Gocayne J, Weidman J, Utterback T, Wathley L, McDonald L, Artiach P, Bowman C, Garland S, Fuji C, Cotton MD, Horst K, Roberts K, Hatch B, Smith HO, Venter JC (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*, *Nature*, 390:580–6
- Gillespie JP**, Kanost MR and Trenczek R (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, 42:611–643
- Guo X**, Booth CJ, Paley MA, Wang X, DePonte K, Fikrig E, Narasimhan S, Montgomery RR. (2009). Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins, *Infect Immun.*, 77:2320–9

- Grunclová L**, Fouquier H, Hypša V, Kopáček P (2003). Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation, *Dev Comp Immunol.*, 27:651-60
- Ha EM**, Oh CT, Bae YS, Lee WJ (2005). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity, *Science*, 310:847-50
- Ha EM**, Oh CT, Ryu JH, Bae YS, Kang SW, Jang IH, Brey PT, Lee WJ (2005). An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila*, *Dev Cell.*, 8:125–32
- Hampton MB**, Kettle AJ, Winterbourn CC (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing, *Blood.*, 92:3007–17
- Hoch T**, Goebel J, Agoulon A, Malandrin L. (2012). Modelling bovine babesiosis: A tool to simulate scenarios for pathogen spread and to test control measures for the disease, *Prev Vet Med.*, Epub ahead of print
- Huang X**, Tsuji N, Miyoshi T, Nakamura-Tsuruta S, Hirabayashi J, Fujisaki K (2007). Molecular characterization and oligosaccharide-binding properties of a galectin from the argasid tick *Ornithodoros moubata*, *Glycobiology.*, 17:313–23
- Hynes WL**, Stokes MM, Hensley SM, Todd SM, Sonenshine DE (2008). Using RNA interference to determine the role of varisin in the innate immune system of the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae), *Exp Appl Acarol.*, 46:7–15
- Johns R**, Ohnishi J, Broadwater A (2001). Contrasts in tick innate immune responses to *Borrelia burgdorferi* challenge: immunotolerance in *Ixodes scapularis* versus immunocompetence in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae), *J Med Entomol.*, 38:99–107
- Johns R**, Sonenshine DE, Hynes WL (2001). Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*, *Insect Biochem Mol Biol.*, 31:857-65
- Johns R**, Sonenshine DE, Hynes WL (1998). Control of bacterial infections in the hard tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): evidence for the existence of antimicrobial proteins in tick hemolymph. *Journal of Medical Entomology*, 35:458–464
- Jongejan F**, Uilenberg G (2004). The global importance of ticks, *Parasitology*, 129: S3–14
- Kawahara T**, Quinn MT, Lambeth JD (2007). Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes, *BMC Evol Biol.*, 7:109
- Kopáček P**, Hajdušek O, Burešová V (2012). Tick as a Model for the Study of a Primitive Complement System, *Adv Exp Med Biol.*, 710:83–93
- Kopáček P**, Hajdušek O, Burešová V, Daffre S (2010). Tick innate immunity, *Adv Exp Med Biol.*, 708:137–62
- Kopáček P**, Zdychová J, Yoshiga T, Weise C, Rudenko N, Law JH (2003). Molecular cloning, expression and isolation of ferritins from two tick species - *Ornithodoros moubata* and *Ixodes ricinus*, *Insect Biochem Mol Biol.*, 33:103-13
- Kopáček P**, Vogt R, Jindrák L, Weise C, Safářík I (1999). Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*, *Insect Biochem Mol Biol.*, 29:989-97
- Kopáček P**, Vogt R, Jindrák L, Weise C, Safářík I (1999). Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*, *Insect Biochem Mol Biol.*, 29:989-97
- Kovář V**, Kopáček P, Grubhoffer L (2000). Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*, *Insect Biochem Mol Biol.*, 30:195-205
- Kuhn KH**, Haug T (1994). Ultrastructural, Cytochemical and Immunocytochemical Characterization of Hemocytes of the Hard Tick *Ixodes ricinus* (Acari Chelicerata), *Cell and Tissue Research*, 277:493–504
- Kumar S**, Molina-Cruz A, Gupta L, Rodrigues J, Barillas-Mury C (2010). A peroxidase/dual oxidase system modulates midgut epithelial immunity in *Anopheles gambiae*, *Science*, 327:1644-8
- Lalucque H**, Silar P (2003). NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity?, *Trends Microbiol.* 11:9–12
- Lambeth JD**, Kawahara T, Diebold B (2007). Regulation of Nox and Duox Enzymatic Activity and Expression, *Free Radic Biol Med.*, 43:319–331
- Lambeth JD** (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen, *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181–189
- Lehane MJ**, Wu D, Lehane SM (1997). Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 94:11502–7
- Leto TL**, Morand S, Hurt D, Ueyama T (2009). Targeting and Regulation of Reactive Oxygen Species Generation by Nox Family NADPH Oxidases, *Antioxid Redox Signal.*, 11:2607–2619
- Leto TL**, Geiszt M (2006). Role of Nox family NADPH oxidases in host defense, *Antioxid Redox Signal.*, 8:1549–61
- Levashina EA**, Moita LF, Blandin S, Vriend G, Lagueux M, Kafatos FC (2001). Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*, *Cell.*, 104:709-18
- Matsuyama K**, Natori S (1988). Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*, *J Biol Chem.*, 263:17112–6

- Meitzler JL**, Ortiz de Montellano PR (2009). *Caenorhabditis elegans* and human dual oxidase 1 (DUOX1) "peroxidase" domains: insights into heme binding and catalytic activity, *J Biol Chem.*, 284:18634–43
- Molina-Cruz A**, DeJong RJ, Charles B, Gupta L, Kumar S, Jaramillo-Gutierrez G, Barillas-Mury C (2008). Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and *Plasmodium*, *J Biol Chem.*, 283:3217–23
- Morand S**, Ueyama T, Tsujibe S, Saito N, Korzeniowska A, Leto TL (2009). Duox maturation factors form cell surface complexes with Duox affecting the specificity of reactive oxygen species generation, *FASEB J.*, 23:1205–18
- Moreland JG**, Davis AP, Bailey G, Nauseef WM, Lamb FS (2006). Anion channels, including CIC-3, are required for normal neutrophil oxidative function, phagocytosis, and transendothelial migration, *J Biol Chem.*, 281:12277–88
- Nakajima Y**, van der Goes van Naters-Yasui, Taylor D, Yamakawa M (2002). Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, *Insect Mol Biol.*, 11:611–8
- Nithiuthai S**, Allen JR (1985). Langerhans cells present tick antigens to lymph node cells from tick-sensitized guinea-pigs, *Immunology.*, 55:157–63
- Oliveira Gde A**, Lieberman J, Barillas-Mury C (2012). Epithelial nitration by a peroxidase/NOX5 system mediates mosquito antiplasmodial immunity, *Science*, 335:856–9
- Oliveira JH**, Gonçalves RL, Lara FA, Dias FA, Gandara AC, Menna-Barreto RF, Edwards MC, Laurindo FR, Silva-Neto MA, Sorgine MH, Oliveira PL (2011). Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota, *PLoS Pathog.*, 7:e1001320
- Parish CA**, Jiang H, Tokiwa Y, Berova N, Nakanishi K, McCabe D, Zuckerman W, Xia MM, Gabay JE (2001). Broad-spectrum antimicrobial activity of hemoglobin. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 9:377–382
- Pereira LS**, Oliveira PL, Barja-Fidalgo C, Daffre S (2001). Production of reactive oxygen species by hemocytes from the cattle tick *Boophilus microplus*, *Exp Parasitol.*, 99:66–72
- Ratcliffe NA**, Rowley AF (1987). Insect responses to parasites and other pathogens. In: *Immune Responses in Parasitic Infections*, Vol. 4. (ed., Soulsby, E. J. L.), pp. 271–332, CRC Press Inc., Boca Raton
- Rego ROM**, Hajdušek O, Kovář V, Kopáček P, Grubhoffer L, Hypša V (2005). Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 991–1004
- Rego ROM**, Kovář V, Kopáček P, Weise C, Man P, Šauman I, Grubhoffer L (2006). The tick plasma lectin, Dorin M, is a fibrinogen-related molecule, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36: 291–299
- Regulski M**, Stasiv Y, Tully T, Enikolopov G (2004). Essential function of nitric oxide synthase in *Drosophila*, *Curr Biol.*, 14:R881–2
- Reis C**, Cote M, Le Rhun D, Lecuelle B, Levin ML, Vayssier-Taussat M, Bonnet SI. (2011). Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*, *PLoS Negl Trop Dis.*, 5:e1186
- Rhee SG**, Bae YS, Lee SR, Kwon J (2000). Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteineoxidation, *Sci STKE.*, 2000:pe1
- Ribeiro JM**, Weis JJ, Telford SR 3rd (1990). Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function, *Exp Parasitol.*, 70:382–8, *Science* 314:1903–1908
- Schwan TG**, Piesman J (2002). Vector interactions and molecular adaptations of lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks, *Emerg Infect Dis.*, 8:115–21
- Soberman RJ**, Christmas P (2003). The organization and consequences of eicosanoid signaling, *J Clin Invest.*, 111:1107–13
- Sonenshine DE** (1991). *Biology of Ticks*, Volume 1, Oxford University Press, New York, Oxford
- Sumimoto H** (2008). Structure, regulativ a evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce ractive oxygen species., *FEBS J*, 275: 3249–3277
- Vasta GR** (1991). The multiple biological roles of invertebrate lectins: their participation in nonself recognition mechanisms. In: *Phylogenesis of Immune Functions* (eds., Warr, G. W. and N. Cohen), pp. 183–199, CRC Press Inc., Boca Raton
- Vereš J**, Grubhoffer L (1990). Detection and partial characterization of a new plasma lectin in the hemolymph of the tick *Ornithodoros tartakovskyi*, *Microbios Letters*, 45: 61–64
- Wanders RJ**, Waterham HR (2006). Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies, *Biochim Biophys Acta.*, 1763:1707–20
- Wikel SK**, Bergman D (1997). Tick-host immunology: Significant advances and challenging opportunities, *Parasitol Today*, 13:383–9
- Yang J**, McCart C, Woods DJ, Terhzaz S, Greenwood KG, ffrench-Constant RH, Dow JA (2007). A *Drosophila* systems approach to xenobiotic metabolism., *Physiol. Genomics* 30, 223–231

Yang XF, Pal U, Alani SM, Fikrig E, Norgard MV (2004). Essential role for OspA/B in the life cycle of the Lyme disease spirochete, *J Exp Med.*, 199:641–8

Yu D, Sheng Z, Xu X, Li J, Yang H, Liu Z, Rees HH, Lai R (2006). A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*, *Peptides.*, 27:31–5

aacagctcggtgctggagccgtgcatgatcctcgacggctgggactacttcaggggaaac
N S S V L E P C M I L D G W D Y F R G N
gaggtcgcctacatctactcctgcctcgtgctcgccttcattcccacagtgagcacct
E V A Y I Y S C L V L A F I P I S E H P
ccgtggacactccccggacaagccgtaaaccgagtgccgcccgttccttattcgtcgcaag
P W T L P G Q A V N R V P P F L I R R K
ggacccttgccgcagccgcagatcaacagctcgggtgctggagccgtgcatgatcctc
G P L P Q P Q Q I N S S V L E P C M I L
gacggctgggactacttcaggggaaacgaggtcgcctacatctactcctgcctcgtgctc
D G W D Y F R G N E V A Y I Y S C L V L
gccttcattcccacatcttgcgccgggctcgggtacggagtcacagctccaaaaccg
A F I P I I C A G L G Y G V I K L Q N R
cgaaggagaaacatcaaggccaaaaaggaaatcaacattgggaagaactatgacaagctg
R R R N I K A K K E I N I G K N Y D K L
tacgtgaaggaatggctgcacccaaaaccacaagcgttcctcgtgaaagtgaagatcggtcg
Y V K E W L H Q N H K R F V K V K I G P
gacgagtcgctgctgcagcggatgaatcgaaaaggagggtgctgcgcaaggtggacttcaag
D E S L S T V N R K G E V L R K V D F K
tccgctcgcgcctcgtggctcgagatctccacggacatggccaagaagcccattgctcgt
S V A A L V V E I S T D M A K K P M C L
gtccgctcgcgccagggaccacgacctggtcctgcagttcgacagcgtccactcgcgcaag
V R S P R D H D L V L Q F D S V H S R K
aagttcctgacgaagctggagagcttcctgggtcaaccggaagaagaccctggagagcatc
K F L T K L E S F L V N R K K T L E S I
gacaccacgcgggacaccatgctggccaacgccgagaccaaggagaagcgacagaagcgc
D T T R D T M L A N A E T K E K R Q K R
ctcgaacacttcttcaggaggcctacgccctgacattcggattgaagcccggcgagaag
L E H F F R E A Y A L T F G L K P G E K
cggaaattggaagatgtgggcaacgatgtgatcatggtcatgaggacgtccctgctcgaag
R K L E D V G N D V I M V M R T S L S K
caggagtttgagagggcctgggcatgaagccggactccctgctcgtcaagcaaatgttc
Q E F A E A L G M K P D S L F V K Q M F
aactgcgtcgacaaggacaaggacgaacgaatcagcttccaagagttcctcgcacaccgtc
N C V D K D K D E R I S F Q E F L D T V
gtcctcttcaccagaggcaagagcggaggacaagttccgcatcatcttcgacatgtgagc
V L F T R G K S E D K F R I I F D M C D
aagaacgggaacggcatccagaagcaggagctgaccaagatgctccggctcgtggtg
K N G N G M I Q K Q E L T K M L R S L V
gacatcgccaagaccaactcgtgagcagtagcagaccacggacatcatcagcggcatg
D I A K T N S L S E Y E T T D I I S G M
tacgcctcggcaggcctcgcacaacaccgaggagctcaactacgaggacttcaagaagatg
Y A S A G L D N T E E L N Y E D F K K M
atgaaggagcaccggggagacttcatcgccatcggcctcgcactgcaagggggccaatcag
M K E H R G D F I A I G L D C K G A N Q
aacttcttgacacatcctcaaacgtggctaggatgacgagcttcagatcaaccagccg
N F L D T S S N V A R M T S F Q I N Q P
gccgaagaccaccctcctggaccatccagaagtggaaaccaggtgaccacattcctcag
A E D P P S W T I Q K W N Q V T T F L E
gagaaccgtcagcagctcttctacctcttcgtcttctacgttgtcaccatcgtcttattc
E N R Q H V F Y L F V F Y V V T I V L F
atcgagaggttcatcttctactcgtacatggcggagcacatggacctgcccacgtgatg
I E R F I F Y S Y M A E H M D L R H V M
ggcatcggcatcgccatcacgcccggctcggccgctcgtgctcgttctgctactccctg
G I G I A I T R G S A A S L S F C Y S L
ctgctgtcaccatgtgctcggaaacctgatcaccaagatccgggagctcccgtccagcag
L L L T M C R N L I T K I R E L P L Q Q
tacatcccgtcgcactcgcacgtccagttccacaagatcgtcgcctcaccgcgtcttc
Y I P L D S H V Q F H K I V A L T A L F
ttcagcctggatataccgtcgggcattacatcaacttctaccagtttctactcagcca

F S L V H T V G H Y I N F Y H V S T Q P
gcggaacacttgaggtgtatgacgaaggaaatgcactttgattcggagtttaaatcgact
A E H L R C M T K E M H F D S E F K S T
atcactttttgggtgtttcagacagtcacaggtatcacgggagtgtgcttgtttgtcgtc
I T F W V F Q T V T G I T G V C L F V V
atgtgcatcatattcatcttcgccccacccaagatacgcagaaggcgtacagttatttc
M C I I F I F A H P K I R Q K A Y S Y F
tggatgacgcacagtctctacattctactctacattttgtgcttactccacggacaagcg
W M T H S L Y I L L Y I L C L L H G Q A
aagctcactgggacgcctcgattctggatgttctttgtaggcccagctattatattcaca
K L T G T P R F W M F F V G P A I I F T
ctggacaaaagttgtcagcctccagacgaaatacatggaactggatattctggacaccgaa
L D K V V S L Q T K Y M E L D I L D T E
ctcctaccatctgacgtgacgcgctgaagttcacgcggccgcccacttcaagtacctg
L L P S D V T R V K F T R P P N F K Y L
tcgggccagtggtgctggtgctgacgggcttccgggcccagcagtagtaccactcgctc
S G Q W V R L G C T G F R A S E Y H S L
acgctcacgtcggcgccgcacgagaactacctgtccgtgacgtcaaggcccaggggcc
T L T S A P H E N Y L S V H V K A Q G P
tggacttgaagttgcgcaactatttcgaccccaacaactgacgaaggcatgctcccc
W T W K L R N Y F D P N N L H E G M L P
aaggttcggctggaaggtccgttcggagggggcaaccaagactggtacaagttcgagatc
K V R L E G P F G G G N Q D W Y K F E I
gccgtgatggttgggtggaggcatcggcgtcacgccgtacgcctcattctcaacgacctc
A V M V G G G I G V T P Y A S I L N D L
gtgttcggcacctcgaccaacagatactccggggtcgctgcaaaaaggtgtacttcag
V F G T S T N R Y S G V A C K K V Y F M
tggatctgtccgtcgcaccggcacttcgagtggttcacgacgtgctcagggacgtggag
W I C P S H R H F E W F I D V L R D V E
cgaaaagacgtcaccaatgtgctggagatccacatcttcatcacgcagttctttcacaag
R K D V T N V L E I H I F I T Q F F H K
ttcgacttgagaaccacgatgctgtacatttgcgagaaccacttccagaggatctccaac
F D L R T T M L Y I C E N H F Q R I S N
aggagcatggtcacggggctgaaggccattaatcacttcggccgaccagacatgacggcg
R S M F T G L K A I N H F G R P D M T A
ttcctcaagtttgtgcagcagcaccactcctacgtgagcaaggtgggctgttcagctgc
F L K F V Q Q H H S Y V S K V G V F S C
ggaccgtcggcgctcaccaagagcgtgagctcggcctgcgagacggtgaacaacaaccgg
G P S A L T K S V S S A C E T V N N N R
aagctgccctacttcatccaccactacgagaacttctga
K L P Y F I H H Y E N F -