

Jihočeské university v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Identifikace genu pro nový peptid, TILr, s inhibiční
aktivitou proti serinovým proteázám v klíštěti *Ixodes
ricinus*.**

Bakalářská práce

Hana Slabá

Vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD.

Maryna Golovchenko, MSc.

Fakultní garant: Prof. Libor Grubhoffer

České Budějovice 2013

Slabá, H. (2013). Identifikace genu pro nový peptid, TILIr, s inhibiční aktivitou proti serinovým proteázám v klíštěti *Ixodes ricinus*. [Identification of gene encoding novel peptide, TILIr, with inhibitory activity against serine proteases in tick *Ixodes ricinus*. Bc. Thesis, in Czech] – 46 pp., Faculty of Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Ticks are very important blood feeding arthropod vectors of infectious agents. Control of tick-borne pathogens is complicated by a lack of vaccines. Therefore, novel methods and vaccine candidates are needed for suppression of tick populations and control of tick-borne infectious agents. Among possible candidates, serine protease inhibitors (serpins) are of particular interest.

Tato práce byla financována Evropským FP7 projektem 278976 ANTIGONE (ANTICIPating the Global Onset of Novel Epidemics) za dodatečné podpory RVO:60077344 z Biologického Centra, Institutu Parazitologie (Česká republika).

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

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

V Českých Budějovicích

.....

Hana Slabá

Chtěla bych poděkovat mým školitelkám Natalii Rudenko a Maryně Golovchenko za vedení mé bakalářské práce, cenné rady a odborný dohled. Děkuji také Prof. Liboru Grubhofferovi za možnost pracovat v laboratoři Molekulární biologie vektorů a patogenů. Mé poděkování dále patří Hance Tykalové, Miray Tonk a Helene Urlasberger za pomoc a rady při vlastní práci v laboratoři. A v neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za podporu a trpělivost.

Děkuji.

OBSAH

1. <i>Ixodes ricinus</i> (klíště obecné)	1
2. Imunitní systém klíštěte	2
2.1 Buněčná imunitní odpověď	2
2.2 Humorální odpověď	3
3. Inhibitory proteáz a jejich funkce	4
3.1 Serpiny	5
3.2 Inhibitory proteáz u klíšťat	7
3.3 Serpiny popsané u klíšťat.....	8
3.3.1 <i>Serpiny popsané u Ixodes ricinus</i>	9
4. Protiklístěcí vakcíny	10
5. Cíl práce	13
6. Materiál a metody	14
6.1 Použité materiály a chemikálie	14
6.2 Metody	16
6.3.1 <i>Pitva klíšťat</i>	16
6.3.2 <i>Izolace RNA</i>	16
6.3.3 <i>Syntéza cDNA</i>	16
6.3.4 <i>PCR (Polymerase Chain Reaction)</i>	17
6.3.5 <i>Purifikace PCR produktu</i>	17
6.3.6 <i>Klonování PCR produktu do vektoru pCR[®] 4-TOPO</i>	18
6.3.7 <i>Transformace One Shot TOP10 E. coli kompetentních buněk</i>	18
6.3.8 <i>Screening: Purifikace plazmidové DNA</i>	18
6.3.9 <i>Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu pomocí PCR a sekvenování</i>	18
6.3.10 <i>Klonování PCR produktu do expresního vektoru Champion[™] pET 100/D-TOPO[®], ověření přítomnosti inzertu a správného čtecího rámce pomocí PCR a sekvenování</i>	18
6.3.11 <i>Transformace BL21 Star[™] (DE3) One Shot[®] Cells</i>	18
6.3.12 <i>Exprese rekombinantního proteinu (pilotní experiment)</i>	19
6.3.13 <i>Kontrola exprese rekombinantního proteinu: SDS-PAGE</i>	19
6.3.14 <i>Western Blot a detekce rekombinantního proteinu</i>	19
6.3.15 <i>Nativní purifikace rekombinantního proteinu</i>	19
6.3.16 <i>Hmotnostní spektrometrická analýza</i>	20
7. Výsledky	20

7.1 Izolace RNA a syntéza cDNA	20
7.2 PCR.....	21
7.3 Exprese genu kódujícího TILr v různých tkáních <i>I. ricinus</i>	25
7.5 Exprese rekombinantního proteinu	26
7.6 Nativní purifikace rekombinantního proteinu.....	26
7.8 Hmotnostní spektrometrická analýza.....	27
7.9 Online analýza sekvence.....	27
7.9.1 <i>Predikce signálního peptidu</i>	27
7.9.2 <i>Predikce 3D struktury proteinu</i>	28
7.9.3 <i>Izoelektrický bod</i>	28
7.9.4 <i>Predikce funkce proteinu</i>	29
8. Diskuze	29
9. Závěr	33
10. Použitá literatura	34

1. *Ixodes ricinus* (klíště obecné)

Klíště obecné je nejběžnější druh klíštěte střední Evropy a tedy i České republiky. Z taxonomického hlediska řadíme klíšťata do kmene *Arthropoda* (Členovci), podkmene *Chelicerata* (Klepítkatci), třídy *Arachnida* (Pavoukovci), podtřídy *Acari* (Roztoči), řádu *Parasitiformes* a podřádu *Ixodida* (Klíšťata). *Ixodida* se dále dělí na dvě čeledi *Ixodidae* (Klíšťatovití) a *Argasidae* (Klíšťákovití). *Ixodes ricinus* patří do čeledi *Ixodidae*.

Kromě střední Evropy se klíště obecné vyskytuje v menší míře po celém zbytku Evropy, dále směrem na jih ke Kaspickému moři a severnímu Iránu nebo také v severní Africe. Klíšťata obývají především mírný pás opadavých a smíšených lesů s dostatečnou vlhkostí nebo jiné husté porosty s vysokým množstvím dešťových srážek (Volf & Horák, 2007).

Pro čeleď *Ixodidae* je charakteristický tvrdý hřbetní štítek (*scutum*), který u samců pokrývá celou horní část těla, zatímco u samic jen část, což umožňuje mnohonásobné zvětšení těla při sání krve (Volf & Horák, 2007). Tělo mají klíšťata zploštělé. Samci jsou 2,5 – 3 mm velcí a v dospělosti červenohnědí. Samice jsou velké 3 – 4 mm a po nasátí mohou dosáhnout velikosti okolo 1 cm a jsou zbarvené do šeda. Ústní ústrojí mají bodavě sací, tvořené postranními pohyblivými chelicerami a hypostomem (Kadlíková, 2007). Hypostom je rypáček se zpětnými háčky sloužící nejen k sání krve, ale také k přichycení na hostitele a samci pomocí něj dokonce předávají samičce sperma (Förstl et al., 2006).

Klíště obecné má tříhostitelský vývojový cyklus, který obvykle trvá tři roky. Larvy většinou sají na drobných hlodavcích, ptácích a ještěrkách, podobně jako nymfy, které však vyhledávají i větší obratlovce. Dospělé samičky parazitují především na větší lesní zvěři, ale také na domácích kopytnících a psech. Člověk je náhodným hostitelem a parazitují na něm různá vývojová stádia klíštěte (Volf & Horák, 2007).

Vliv klíšťaty přenášených původců chorob na veřejné zdraví v průběhu let dramaticky roste. Parola & Raoult (2006) ve své literární rešerši jmenují 15 nových klíšťaty přenášených bakterií, které byly objeveny a uznány za lidské patogeny v letech 1982 až 2004. Klíšťata přenáší mnohem více původců chorob než jakýkoliv jiný členovec (Schwartz, 1994).

Klíště obecné je přenašečem původců: klíšťové encefalitidy (TBEV) a Lymeské boreliózy (spirochéty komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato), tulamérie (původcem bakterie *Francisella tularensis*), Q-horečky (riketsie *Coxiella*), erlichiozy (riketsie *Erllichia* spp.) nebo horečky Skalístých hor (*Rickettsia rickettsii*). Klíšťata mohou svého hostitele

poškodit i pouhým sáním prostřednictvím velmi silných toxinů vylučovaných ve slinách během sání (Volf & Horák, 2007).

2. Imunitní systém klíštěte

Jak už bylo zmíněno, klíšťa jsou významnými vektory členovci přenášených nemocí. Rozmanitost patogenních organismů přenášených klíšťaty přesahuje množství patogenů objevených u jiných krevsajících členovců. Během procesu sání může být klíště infikováno mnoha různými mikroorganismy, jako jsou prvoci, viry, bakterie, rickettsie a nematoda, a následně tyto patogeny přenáší (Sonenshine, 1993). Přítomnost efektivní imunitní odpovědi v hemocoelu arthropod je tedy nezbytná pro přežití infekce patogeny (Fogaca et al., 2005).

Bezobratlí se před infekcí brání svým přirozeným imunitním systémem, který neobsahuje protilátky ani paměťové buňky. První úroveň obrany tvoří kutikula, která vytváří chemickou a mechanickou bariéru proti parazitům. Pokud se parazité dostanou přes tyto bariéry, zapojuje se buněčná a humorální odpověď. Tyto imunitní reakce jsou nespecifickými obrannými reakcemi zahrnujícími fagocytózu, nodulaci a enkapsulaci buněčné odpovědi, ale také humorální enkapsulaci, hemaglutinaci či antimikrobiální proteiny. Odpovědi buněčného i humorálního imunitního systému se projevují v hemocytech, hemolymfě, střevech, slinných žlázách a tukovém tělese (DeMar, 2006).

2.1 Buněčná imunitní odpověď

Fagocytóza je proces pohlcení a odstranění cizorodého materiálu či mikroorganismů zprostředkovaný specializovanými buňkami (Götz & Boman, 1985). Hlavní fagocytickou funkci v buněčné imunitní odpovědi mají hemocyty, plasmacyty a granulocyty (DeMar, 2006).

Nodulace je reakce hemocytů na zvýšené množství bakterií, hub, protozoí nebo přítomnost žijících či nežijících částic. Při nodulaci dochází k polapení cizorodých látek do koagula granulárních buněk obklopených vrstvou krevních buněk, které mohou, ale nemusí podstoupit melanizi (Götz, 1986).

Enkapsulace zahrnuje obalení větších nodulů a cizorodých materiálů několika vrstvami buněk a izoluje je tak z aktivního oběhu (Götz & Boman, 1985; Götz, 1986).

2.2 Humorální odpověď

Humorální enkapsulace zajišťuje zformování volného agregátu z melanizačního materiálu okolo cizorodého materiálu, postupné zhuštění agregátu a po několika minutách kompletní obalení cizího materiálu. Tato reakce může být spuštěna přítomností nematod, hub, bakterií a jiných cizích organismů a látek. Enkapsulace je vyvolána profenoloxidázovým aktivačním systémem, jehož prvním krokem je navázání fenoloxidázy a dalších proteinů a druhým krokem melanizace a sklerotizace cizorodé látky (Vey, 1993).

Další obrannou reakcí je aglutinace. Hemaglutinace je shlukování červených krvinek v přítomnosti hemaglutininů. Na hemaglutinaci se podílí hemaglutininy nebo lektiny, které se přirozeně vyskytují u všech eukaryotických organismů, mnoha bakteriálních druhů i některých virů, a jsou velmi důležité při agregaci a opsonizaci mikroorganismů (Ratcliffe et al., 1979). U savců hrají lektiny významnou roli receptorů, které váží mikroorganismy, ale také aktivují komplement (Iwanaga, 2002). Lektiny jsou proteiny či glykoproteiny s jedním nebo více vazebnými místy pro specifické karbohydráty, a proto jsou schopné agregovat mikroorganismy přes rozpoznání specifických antigenů lokalizovaných na povrchu patogenu (Peumans & van Damme, 1995). Lektiny bezobratlých jsou zahrnuty do procesů buněčné adheze, opsonizace, fagocytózy a cytolýzy (Vasta & Marchalonis, 1983). Lektiny vázané na membránu zdánlivě přímo váží cizí částice, zatímco humorální hemaglutininy zřejmě jednájí jako opsonické faktory, které se váží na cizí částice a usnadňují jejich vstřebávání hemocyty (Ratner & Vinson, 1983). Předpokládá se, že klíčící lektiny se, stejně jako lektiny jiných bezobratlých i obratlovců, účastní hemaglutinace a opsonizace mikroorganismů a jsou hlavní součástí rozpoznávání cizorodých látek, hemaglutinace a pravděpodobně také přenosu patogenů (DeMar, 2006).

Antimikrobiální proteiny

Další složkou humorální odpovědi je produkce antimikrobiálních peptidů, které mohou přímo napadnout a rychle zabít invadující mikroorganismus, jsou všudypřítomné a tvoří součást vrozené imunitní obranné odpovědi prokaryotických i eukaryotických organismů. Tyto proteiny projevují extrémní diverzitu primárních a sekundárních struktur a jsou schopné zasáhnout velké množství mikroorganismů. Zahrnují lysozomy, cecropiny, attaciny, defensiny, peptidy bohaté na prolin, peptidy bohaté na glycin a další, které se liší svými mechanismy likvidace cílových buněk (DeMar, 2006).

Lysozomy jsou přítomné v hemolymfě hmyzu a v případě infikování hmyzu se jejich tvorba zvyšuje. Projevují se u většiny zvířecích druhů a chovají se jako enzymy, které lyzují

bakterie štěpením β -1,4 glykosidických vazeb peptidoglykanové buněčné stěny (DeMar, 2006).

Cystatiny jsou reverzibilní inhibitory cysteinových proteináz, které se vyskytují u mnoha zvířat i rostlin. Teprve nedávno byly objeveny i u klíšťat a kromě jejich role při potlačování imunitního systému hostitele, hrají důležitou roli v humorální odpovědi proti patogenům klíšťat (DeMar, 2006).

Fragmenty **hemoglobinu**: hemoglobin je významným přenašečem kyslíku. V poslední době bylo ovšem zjištěno, že je také zdrojem dalších bio-aktivních peptidů (Ivanov et al. 1997), které klíšťata využívají v antimikrobiální obraně (DeMar, 2006).

Defensiny jsou nejrozšířenější skupina antimikrobiálních peptidů u bezobratlých a také nejvíce studované antimikrobiální peptidy u klíšťat (DeMar, 2006). Defensiny jsou cyklické antimikrobiální peptidy obsahující šest cysteinových zbytků se stejným cysteinovým párováním, Cys1-Cys4, Cys2-Cys5, Cys3-Cys6. Běžně jsou to peptidy o velikosti kolem 4kDa. Mezi imunitní odpovědí jednotlivých klíštěcích druhů na přítomnost patogenů existují rozdíly. Výsledkem těchto rozdílů je přenos vybraných původců nemocí u některých druhů nebo jejich eliminace (Gillespie et al., 1997).

Další antimikrobiální proteiny: kromě defensinů byla v poslední době objevena řada dalších peptidů s antimikrobiální aktivitou. Patří mezi ně např. mikroplusin, hebraein, ixodidin, ixosin apod. (DeMar, 2006).

Porozumění mechanismům účinků antimikrobiálních peptidů je důležité pro vývoj lepších strategií kontroly klíšťat a zabránění přenosu nemocí klíšťaty. Identifikace molekul zahrnutých do různých kroků vrozené imunity klíšťat by mohla poskytnout příležitost k vývoji protiklíštěcích vakcín a zabránit šíření přenášených onemocnění (DeMar, 2006).

3. Inhibitory proteáz a jejich funkce

Imunitní systém hostitele je souborem buněk a efektorových molekul, které zabraňují invazi parazity. Sekretované proteázy hrají významnou roli v metabolismu parazita a ovlivňují jeho virulenci. Proteázy tak tvoří jednu z hlavních tříd virulenních faktorů, které se účastní invaze, vyhýbání se imunitě hostitele, výživy a reprodukce parazita. Nijak překvapivě se u hostitele vyvinuly inhibitory schopné inaktivovat a odstranit tyto proteázy zapojené do invaze parazitem. Inhibitory proteáz se tak staly nezbytnou součástí imunitního systému hostitele (Armstrong, 2006).

Inhibitory proteáz:

Imunitní systém je zaměřen na zmírnění útoku patogenními parazity, kteří se probíjeli do vnitřního prostředí hostitele. Primární obranou před útokem patogeny jsou integumenty, které zahrnují pokožku a slizové výstelky trávicího, dýchacího, vylučovacího a rozmnožovacího systému. U mnoha bezobratlých jsou pokožka i mukózní membrány obohaceny o neživé povrchové vrstvy jako je kutikula arthropod. Tyto tkáně zabraňují proniknutí cizích organismů do vnitřního prostředí potenciálního hostitele. Sekundární obrana je tvořena řadou buněk a rozpustných efektorů tvořících imunitní systém. Tyto buňky a efekторы napomáhají inaktivaci a odstranění parazitů a jejich toxických produktů (Armstrong, 2006).

Inhibitory proteáz se dělí do dvou základních funkčních tříd. První třída je tvořena inhibitory vázajícími se na aktivní místo cílové proteázy a tyto inhibitory inaktivují její schopnost hydrolyzovat substráty (Armstrong, 2006). Druhá třída jsou α_2 -makroglobuliny, které uzavírají cílovou proteázu v „molekulární pasti“ tvořené polypeptidovým řetězcem α_2 -makroglobulinu (Starkey & Barrett, 1977). Uvězněná proteáza tak ztrácí schopnost proteolýzy makromolekulárních substrátů, které jsou příliš velké na to, aby pronikly do molekulární „pasti“ α_2 -makroglobulinu. Stále však může hydrolyzovat substráty o dostatečně nízké molekulární hmotnosti, které se mohou do „pasti“ dostat a interagovat s aktivním místem proteázy (Starkey & Barrett, 1973).

3.1 Serpiny

Inhibitory serinových proteáz se dělí podle specifity na substrát do 4 skupin na inhibitory chymotrypsinu, trypsinu, subtilisinu a elastázy. Tato rešerše dále s ohledem na téma práce pojednává o inhibitech trypsinu.

Serpiny jsou největší rodinou proteázových inhibitorů zapojených do mnoha biologických procesů jako koagulace krve, fibrinolýza, programovaná buněčná smrt, vývoj nebo zánět (Carrell et al., 1987; Gettins, 2000; Huntington et al., 2000). Serpiny jsou strukturně heterogenní a funkčně velmi rozmanité proteiny, které se nacházejí u různých organismů od virů až po obratlovce (Patston, 2000; Potempa et al., 1994; Gettins, 2002). Celkem bylo objeveno přes 400 různých serpinů u organismů zahrnujících viry, rostliny, hmyz, prokaryota a obratlovce (Irving et al., 2000). Serpiny jako α -antitrypsin, α -antichymotrypsin, C1-inhibitory, antitrombin nebo inhibitor aktivátoru plasminogenu mají zásadní roli při kontrole proteáz ovlivňujících komplement, koagulaci či zánět a jsou také

spojovány s více než 90 lidskými nemocemi jako rozedma/cirhóza, angioedém, demence, chronická bronchitida nebo trombóza (Silverman et al., 2001).

Serpiny jsou také součástí imunity řady členovců, např. komárů (Michel et al., 2006), octomilek (Nappi et al., 2005) nebo lišaje *Manduca sexta* (Zou & Jiang, 2005). Serpiny také kontrolují kaskádu koagulace hemolymfy u ostrorepa (Agarwala et al., 1996).

Ne všechny serpiny však inhibují serinové proteázy. Existují serpiny inhibující cysteinové proteázy i proteiny bez jakékoliv inhibiční aktivity (Whisstock et al., 2005).

Struktura serpinů:

Struktura serpinů je z velké části konzervovaná. Průměrná velikost proteinu je 350-400 aminokyselin a molekulární hmotnost 40-50 kDa. Serpiny jsou tvořeny třemi β - skládanými listy a 7-9 α -helixy (Patston 2000). Úsek aminokyselin nazvaný smyčka reaktivního centra (RCL) obsahuje místo rozpoznání proteinu, které tvoří pružný úsek přibližně 17 aminokyselin mezi A a C β -skládaným listem (Silverman et al., 2001).

Mechanismus působení serpinů:

Serpiny s inhibiční aktivitou fungují extracelulárně i intracelulárně. Extracelulární serpiny jsou důležité při kontrole proteolytických kaskád v plasmě (např. koagulace) a intracelulární serpiny ochraňují buňku a chrání ji proti nepřiměřenému uvolnění cytotoxických proteáz (Whisstock et al., 2005).

Jeden z hlavních principů působení serpinů je schopnost molekuly projít dramatickou konformační změnou (Whisstock et al., 2005). Přirozeně se serpiny vyskytují v metastabilním stavu. Větší stability dosáhnou během inhibičního mechanismu tím, že přejdou ze stresové konformace do relaxované, což je také nezbytné pro inhibici proteázy. Během této změny uspořádání oblast zodpovědná za interakci s cílovou proteázou, přesněji smyčka reaktivního centra (RCL), se vloží do A β -skládaného listu a vytvoří tak nové vlákno. Struktura finálního serpinového enzymatického komplexu odhalila, že serpin si osvojí relaxovanou konformaci a proteáza, která je částečně rozvolněná je kovalentně připevněná k serpinu acylovou vazbou (Huntington et al., 2000).

Serpiny jsou stejně jako jiné komplexy náchylné k destabilizujícím mutacím (Whisstock et al., 2005). Mutace v kritické oblasti může způsobit, že RCL jedné molekuly se vloží do A β -skládaného listu jiné molekuly a vytvoří tak vazbu smyčka- β -skládaný list. Následně dojde k polymerizaci této vazby a k agregaci (Khan et al., 2011). Toto hromadění je evidentní především u vzácné dědičné demence, která je způsobená hromaděním

neuroserpinu v neuronech nebo u pacientů s nedostatkem antitrypsinu způsobeným agregací antitrypsinu v hepatocytech (Medcalf, 2005).

Serpiny se uplatňují v mnoha konzervovaných interakcích jako například zmenšení postranních řetězců v přeplněných oblastech, zvětšování mezer nebo vyplňování vystavených hydrofobních kapes, které umožní původnímu vláknu se přeměnit z původní formy do stabilní inhibiční konformace (Khan et al., 2011).

3.2 Inhibitory proteáz u klíšťat

Klíšťata jsou pozoruhodní krevsající členovci. Naše znalosti trávení krve u klíšťat na molekulární úrovni ovšem daleko zaostávají za porozuměním stejných procesů u jiných krevsajících parazitů (Lara et al., 2005). Charakterizace inhibitorů proteáz v klíštěti je velmi důležitá, protože inhibitory mohou hrát důležitou roli v regulaci trávení hemoglobinu, který je spojený s antimikrobiální ochranou klíštěte a přenosem patogenů (Renard et al., 2002).

Inhibitory cysteinových proteáz - cystatiny

Rodina cystatinů se dělí na tři hlavní skupiny: cystatiny typu 1 jsou cytoplasmatické proteiny o 100 aminokyselinových zbytcích bez disulfidických můstků. Cystatiny 2. typu jsou sekretované proteiny se 120 aminokyselinami a s disulfidickými můstky. 3. typ cystatinů tzv. kininogeny jsou proteiny s více doménami obsahující tři opakování cystatinu typu 2 (Barret & Salvesen, 1986).

Přítomnost cystatinů byla zkoumána např. u klíštěte *Ixodes scapularis*. Pozornost si získaly dva cystatiny s velkou vzájemnou shodou aminokyselin izolované ze slinných žláz klíštěte. První byl pojmenován sialostatin L kvůli jeho afinitě ke katepsinu L a bylo u něj prokázáno protizánětlivé a imunosupresivní působení na hostitele. Druhý cystatin se zvýšenou inhibiční aktivitou proti katepsinu L byl pojmenován sialostatin L2 (Kotsyfakis et al., 2007). U klíštěte *Boophilus microplus* byl charakterizován cystatin pojmenovaný Bmcystatin, který vykazuje 70% aminokyselinovou shodu s cystatinem z klíštěte *I. scapularis* (Lima et al., 2006).

Zhou et al. (2006) ve své studii prokázali, že u klíštěte *Haemaphysalis longicornis* po krmení a inokulaci lipopolysacharidu dojde ke zvýšení exprese cystatinu.

Dva geny kódující inhibitory cysteinových proteáz z rodiny cystatinů pojmenované Om-cystatin 1 a 2 byly izolované ze střev připravené cDNA knihovny klíšťáka *Ornithodoros moubata*. Syntéza obou cystatinů byla po krmení krví zřetelně redukována. Om-cystatin 1 je

exprimován především ve střevech, zatímco RNA Om-cystatinu 2 byla objevena i v jiných tkáních klíštěte. Tyto sekretované inhibitory cysteinových proteáz se podílí na regulaci několika proteolytických cílů v trávicím systému klíštěte a na interakci klíště-hostitel (Grunclová et al., 2006).

Nedávno bylo navíc prokázáno, že utlumení cystatinu ze slinných žláz klíštěte *Amblioma americanum* značně snížilo schopnost klíštěte se úspěšně krmit na hostiteli (Karim et al., 2005).

3.3 Serpiny popsané u klíšťat

Aby mohla klíšťata dokončit krmení, musí překonat záněty, aktivaci komplementu hostitele a koagulaci krve. Jelikož jsou tyto cesty regulovány serpiny, můžeme předpokládat, že klíšťata mohou využít některé serpiny k tomu, aby se vyhnula obranným mechanismům hostitele. Narušení funkce nebo imunizace proti těmto proteinům je slibnou alternativou pro vytvoření nové strategie kontroly klíšťat (Mulenga et al., 2009).

Doposud bylo u několika ekonomicky a lékařsky důležitých klíšťat klonováno a charakterizováno více než 30 genů kódujících serpiny (Mulenga et al., 2009). Klíště *Boophilus microplus* je bohatým zdrojem inhibitorů serinových proteáz (Soares et al., 2012). Různé druhy inhibitorů serinových proteáz byly objeveny především ve vajíčkách a larvách klíštěte *B. microplus*. Příkladem serpinů z *B. microplus* jsou inhibitory nazvané BmSIs (*Boophilus microplus* Subtilisin Inhibitors), s aktivitou proti subtilisinu A (Sasaki et al., 2008) nebo ixodidin, izolovaný z hemolymfy, se silnou inhibiční aktivitou proti proteázám, elastáze a chymotrypsinu (Fogaca et al., 2006).

V klíštěti *Rhipicephalus haemaphysalis* byly identifikovány dva nové serpiny (RHS-1 a RHS-2) s anti-chymotrypsinovou aktivitou a se specifickou expresí ve slinných žlázách a ve střevech. Přestože oba serpiny, RHS-1 i RHS-2, vykazují velkou shodu se serpiny popsanými u jiných klíšťat, shoda aminokyselin mezi nimi samotnými byla stanovena na pouhých 32,5%. Oba výrazně inhibují chymotrypsin a RHS-1 navíc projevuje antikoagulační aktivitu. „Umlčení“ genů kódujících tyto serpiny vedlo k znesnadnění krmení a přichycení klíštěte na hostiteli. Tato data potvrzují, že jsou oba serpiny u *R. haemaphysaloides* zahrnuty do procesu krmení krví (Yu et al., 2013).

Přínejmenším 45 genů pro serpin bylo identifikováno v genomu klíštěte *I. scapularis*. Všech 45 serpinů bylo strukturálně rozděleno na 32 serpinů obsahujících introny a 13

serpinů bez přítomnosti intronů. Data z RT-PCR analýzy exprese ukázala, že 84% z nich je exprimováno ve střevech a slinných žlázách hladových a částečně nasátých klíšťat (Mulenga et al., 2009).

Většina známých serpinů je glykosylována, a proto není překvapivé, že u 40 ze 45 serpinových sekvencí z klíštěte *I. scapularis* byla předpovězena přítomnost N-glykosylací (Mulenga et al., 2009).

Mulenga et al. (2007) charakterizovali 17 nových serpinů z klíštěte *Amblyomma americanum*, které byly následně pojmenovány lospiny. RT-PCR analýza exprese 15 vybraných genů ukázala, že většina (11/15) lospinů byla exprimována ve střevech, vaječnicích a slinných žlázách.

Čtyři serpiny nazvané RAS-1 až RAS-4 byly objeveny u klíštěte *Rhiphicephalus appendiculatus*. Analýza exprese pomocí RT-PCR ukázala, že RAS-1, -2, -3 i -4 jsou exprimovány kromě střev a slinných žláz i v jiných klíštěcích orgánech. Kromě RAS-3, jehož exprese se zdá být stejná ve všech orgánech, RAS-1, -2 a -3 jsou exprimovány převážně ve slinných žlázách (Mulenga et al., 2003).

Sugino et al. (2003), Imamura et al. (2005) a Prevot et al. (2007) ve svých studiích poskytli přesvědčující důkazy o potenciálu serpinů v nových strategiích kontroly klíšťat. Tito a jiní autoři ukázali, že krmení klíšťat na hostiteli očkovaném rekombinantními klíštěcími serpiny způsobilo získání menšího množství krve při krmení a důsledkem byla snížená plodnost a zvýšená úmrtnost klíšťat. Tyto objevy naznačují, že serpiny hrají významnou roli ve fyziologii klíštěte.

Další serpiny byly izolovány z klíštěte *I. ricinus*.

Inhibitory proteáz z třídy aspartátových a kovových inhibitorů proteáz prozatím u klíštěcích druhů nebyly objeveny.

3.3.1 Serpiny popsané u *Ixodes ricinus*

Jediným dobře popsaným inhibitorem serinových proteáz u klíštěte *Ixodes ricinus* je prozatím tzv. Iris (*Ixodes ricinus* immunosuppressor), elastázový inhibitor exprimovaný ve slinných žlázách klíštěte a uvolňovaný během krmení. Tento protein moduluje přirozenou i získanou imunitu hostitele. Je to specifický inhibitor elastáz, který zasahuje do koagulace, fibrinolýzi, adheze krevních destiček a také do imunitního systému hostitele (Prevot et al., 2007). Iris inhibuje především lidské leukocytové elastázy, aktivátory tkáňového

plasminogenu, thrombin a faktor Xa. Existují spekulace, že Iris by mohl být používán jako terapeutický nástroj proti endotoxemickému šoku (Prevot et al., 2009).

Druhým serpinem objeveným u *I. ricinus* je IRS-2, který je produkován ve slinných žlázách klíštěte. Tento protein se zaměřuje na dvě cílové prozánětlivé serinové proteázy, katepsin G achymázu žírných buněk, po případě také na trombin. Vzhledem k tomu, že IRS-2 inhibuje katepsin G a trombinem vyvolané srážení krve, zastává dvojí roli při krmení klíštěte, jelikož může zasahovat do tvorby zánětu i do hojení ran (Chmelař et al., 2011).

Leboulle et al. (2002) sestrojili 2 cDNA knihovny, první ze slinných žláz hladových klíšťat *I. ricinus* a druhou ze slinných žláz 5 dní krmených klíšťat. Zatímco v první knihovně se nenašly žádné sekvence vykazující homologii s již známými sekvencemi, všechny sekvence z druhé knihovny prokázaly výraznou homologii se známými geny. Některé sekvence z 2. cDNA knihovny jsou podobné antikoagulantům, inhibitorům srážení krevních destiček nebo jiným proteinům, které mohou být zahrnuté do protizánětlivých a imunomodulačních procesů. Například Seq24 ukazuje shodu s některými geny z rodiny inhibitorů serinových proteáz jako je lidský inhibitor thrombinu nebo prasečí monocytové/neutrofilové inhibitory elastáz.

Chmelař et al. (2008) sestavili 4 cDNA knihovny z různě krmených samic klíštěte *I. ricinus*. Z každé knihovny bylo náhodně vybráno 600 klonů, které byly odsekvenovány a analyzovány. Šedesát dva sekvencí obsahovalo Kunitz-doménu, jejíž přítomnost je charakteristická pro inhibitory trypsinu.

Další objevené proteiny s homologií k inhibitorům serinových proteáz doposud nejsou dostatečně charakterizované.

4. Protiklíštěcí vakcíny

V současné době existuje dostatek důkazů, že vakcinace hostitelů definovanými antigeny klíšťat dokáže vyvolat signifikantní imunitní odpověď na napadení klíštětem (Willadsen, 2004). Je známo, že imunitní odpověď proti napadení klíštětem může být způsobena opakovaným napadením klíštětem nebo aktivní imunizací hrubým, purifikovaným nativním či rekombinantním antigenem (Mulenga et al., 2000). V poslední době bylo objeveno mnoho antigenů s prokázanou účinností a zbývá mnoho dalších, které je třeba prověřit a zhodnotit jejich účinky. Existuje omezený, ale přesvědčivý důkaz o tom, že

některé z těchto antigenů se prokážou jako účinná ochrana napříč druhy, i když nepředvídatelnou a prozatím nesrozumitelnou cestou (Willadsen, 2004).

Už přibližně 70 let je známo, že imunitní odpověď na napadení klíštětem může být vyvolána vakcinací různými antigenními materiály, jako jsou homogenáty z celého klíštěte, homogenáty ze slinných žláz a extrakty slinných žláz nebo vnitřní orgány klíštěte. K tomu, aby mohly být používány jako vakcína a byly komerčně dostupné, je ovšem třeba ještě důkladnějšího prozkoumání (Willadsen, 2004).

Prozatím jsou komerčně dostupné dva typy vakcín. První typ zahrnuje antigeny zapojené v přirozené rezistenci proti napadení klíštětem. Tyto antigeny jsou sekretovány ve slinách klíštěte během přichycení a krmení na hostiteli (Nuttall et al., 2006). Druhý typ jsou tzv. „skryté“ antigeny, které jsou za normálních okolností před imunitními mechanismy hostitele skryté (Willadsen & Kemp, 1988). Typicky „skryté“ antigeny se nachází na stěně střeva a interagují se specifickými imunoglobuliny přijatými při krmení s krví. Nicméně jakýkoliv antigen, se kterým se hostitel za normálních okolností neseťká, je „skrytý“ antigen. Pokud se navíc takový antigen setká s imunoglobuliny pronikajícími do hemolymfy nebo do střeva nebo je spojený s nějakou životně důležitou funkcí klíštěte, představuje potenciálního kandidáta na vakcínu (Nuttall et al., 2006).

Víceméně existují tři cesty umožňující identifikovat nové užitečné antigeny. První cesta využívá imunologické reakce hostitele, neboli studuje antigeny, které vyvolávají tvorbu protilátek. Druhá cesta identifikuje klíštěcí faktory důležité pro funkce nebo přežití parazita a dělá tak z nich potenciální kandidáty pro vakcíny. Třetí cesta je pragmatická, založená na biochemické frakcionaci. Postupně zhodnocuje jednodušší proteinové směsi vakcinací hostitele a testováním imunity parazita (Willadsen, 2004).

Proteinázy a proteinázové inhibitory jsou zcela opodstatněně považovány za klíčové molekuly při krmení klíštěte a při počátečních i konečných reakcích týkajících se imunitní odpovědi. Prozatím však nebyly tyto proteiny dostatečně zkoumány jako potenciální vakcinační antigeny. Například serinové proteázy jsou lákavou možností, protože se účastní nejen trávicích procesů, ale také aktivace komplementu, koagulace krve a dalších aspektů imunity. Jejich velkou nevýhodou je, že se vyskytují ve velkých množstvích, často jsou nestabilní a málo dostupné. Pozornost na sebe tedy přilákaly inhibitory proteáz (Willadsen, 2004). Aby byly efektivními léčivy, musí mít inhibitory proteáz minimální charakter peptidu, vysokou stabilitu při neselektivní proteolytické degradaci, dobrou permeabilitu membrány, dlouhou životnost v krevním řečišti a v buňkách, nízkou náchylnost k eliminaci,

vysokou selektivitu pro proteázy a dobrou dostupnost (Leung et al., 1999). Serinové inhibitory proteáz s vysokou molekulární hmotností se zdají být vhodnými kandidáty na cílové vakcinační antigeny (Imamura, 2005). Andreotti et al. (2002) zjistili, že serinový inhibitor proteáz z klíštěte *B.microplus* lze využít jako vakcinační antigen. Stejně tak Sugino et al. (2003) prokázali využití serpinu z *Haemaphysalis longicornis* jako účinného antigenu. A stále zbývá mnoho serpinů či jiných inhibitorů proteáz, které by mohly sloužit jako efektivní vakcinační antigeny, doposud však nejsou dostatečně prozkoumány.

5. Cíl práce

1. Literární studie k problematice metodických přístupů při studiu diferencióálně exprimovaných genů.
2. Optimalizace technik pro detekci a izolaci genu pro nový peptid s inhibiční aktivitou proti serinovým proteázám v klíštěti (i.e. RNA/DNA purifikace, cDNA syntéza, PCR, elektroforéza, klonování, sekvenování)
3. Interpretace výsledků a zkušenosti se zvolenými metodami s konečným cílem identifikace a izolace genu pro nový antimikrobiální peptid s inhibiční aktivitou proti serinovým proteázám klíštěte *Ixodes ricinus*.

6. Materiál a metody

6.1 Použité materiály a chemikálie

Tab. I: Použité PCR primery

Primer (Generi Biotech)	Použitá annealingová teplota (°C)	Zdroj	Sekvence (5'-3')
vWf Forward 1	50	tato práce	ATG AAG GCG CTT CTG CTC TCC GG
vWf Forward 2	50	tato práce	CAC CAG AAT TGC GGC CGA CTT GC
vWf Reverse	50	tato práce	CTA ACA AGC CTT TGG CAT GGG T
Actin Forward	55	Chrudimská et al., 2011 (GenBank - HQ682101)	CGT CTG GAT CGG CGG CTC TAT
Actin Reverse	55	Chrudimská et al., 2011 (GenBank - HQ682101)	ACG CGC ACT CTT TTC CAC AAT CTC
M13 Forward	50	TOPO TA Cloning [®] Kit - Invitrogen	GTA AAA CGA CGG CCA
M13 Reverse	50	TOPO TA Cloning [®] Kit - Invitrogen	CAG GAA ACA GCT ATG AC
T7 Forward	50	Chamion [™] Expression Kit - Invitrogen	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
T7 Reverse	50	Champion [™] Expression Kit - Invitrogen	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G

Tab. II: Použité kity

Kit	Výrobce
Nucleo Spin [®] RNA II Kit	Macherey-Nagel
Enhanced avian HS RT-PCR-100 kit	Sigma
QIAquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen
TOPO TA Cloning [®] Kit	Invitrogen
Chamion [™] pET100 Directional TOPO [®] Expression Kit	Invitrogen

Tab. III: Použité chemikálie

50x TAE (na 1x TAE)	200mM Tris-HCl, 50mM EDTA
Agaróza	1 % agaróza (SERVA) v 1xTAE pufru
2x PCR Premix	Promega Taq DNA polymeráza, 400 μ M: dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 3mM MgCl ₂
6x Loading Dye	10mM Tris-HCL (pH 7.6), 0,03% bromfenolová modř, 0,03% xylen cyanol FF, 60% glycerol, 60mM EDTA, 500x SYBR Green
100 bp DNA ladder	Thermo Scientific GeneRuler 0.5 μ g/ μ l
LB médium	1.0% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 1.0% NaCl, pH 7.0
LB agar	1,5% bacto-agar v LB médiu
Antibiotika	Ampicilin (zásobní roztok 50mg/ml)
1M IPTG	Isopropylthio- β -galaktosid, zásobní roztok
30% Acrylamide/Bis-Acrylamide	Acrylamide a bisacrylamide, zásobní roztok
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine
10% APS	Amonium persulfát, zásobní roztok
10% SDS	Laurylsulfát sodný, zásobní roztok
Barvicí roztok	PageBlue [™] (MBI Fermentas) obsahující Coomassie Brilliant Blue G-250
C1 pufr	1,5M Tris-HCl; pH 8,8
C2 pufr	0,5M Tris-HCl; pH 6,8
10x SDS-PAGE elektroforézový pufr	25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDSzásobní roztok
1x PBS	137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM NaH ₂ PO ₄ , 1,8mM KH ₂ PO ₄ ; do 1l ddH ₂ O; pH 7,4; sterilní

Protein Ladder	Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder
20x Reducing agent	2M DTT, zásobní roztok
Blotovací pufr	10% methanol, 25mM Tris-base, 192mM glycin
Blokovací pufr	3% BSA (w/v) v 1x TBS
Protilátky	Ni-NTA konjugát; TBS-Tween; 1:1000
1x TBS	10mM Tris-Cl (pH7,5), 150mM NaCl
1x TBS Tween	20mM Tris-Cl (pH 7,5), 500mM NaCl, 0,05% (v/v)Tween 20, 0,2% (v/v) Triton X-100
10x Tris-saline	9% (w/v) NaCl, 1M Tris-Cl; pH 8,0; zásobní roztok
Barvicí roztok (HPR)	Připravený čerstvý těsně před použitím: 18mg 4-chloro-1-naphthol, 6ml methanol, 24 ml 1x Tris-saline, 60μl 30% peroxid vodíku (H ₂ O ₂)
Ni-NTA agaróza	Qiagen
Lyzační pufr	10mM imidazol, 300mM NaCl, 50mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 8,0
Promývací pufr	20mM imidazol, 300mM NaCl, 50mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 8,0
Eluční pufr	250mM imidazol, 300mM NaCl, 50mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 8,0

6.2 Metody

6.3.1 Pitva klíšťat

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

6.3.2 Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena pomocí Nucleo Spin® RNA II kitu (Macherey-Nagel) přesně podle protokolu od výrobce. Výsledná RNA byla eluována 40 μl ddH₂O. Koncentrace RNA byla změřena na přístroji NanoPhotometer při vlnové délce 260/280 nm.

6.3.3 Syntéza cDNA

Jednovláknová komplementární DNA byla syntetizována pomocí kitu Enhanced avian HS RT-PCR-100 (Sigma). Syntéza byla provedena podle návodu od výrobce pro Two-Step

RT-PCR. Koncentrace cDNA byla změřena na přístroji NanoPhotometer při vlnové délce 260/280 nm.

6.3.4 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Pro amplifikaci cílového genu byla použita metoda PCR, kde byla jednovláknová cDNA použita jako templát. Pro amplifikaci specifického úseku byly použity speciálně navržené primery. Pro zjištění případné kontaminace byla připravena negativní kontrola, ve které byl templát nahrazen ddH₂O. Reakce proběhla v 0,2 ml zkumavkách v přístroji Mastercycler personal (Eppendorf).

Reakční směs (1 reakce ve 20μl):

2x PCR Master Mix.....10 μl
0,1mM primer Forward.....1 μl
0,1 mM primer Reverse.....1 μl
Sterilní H₂O.....7 μl
cDNA.....1 μg

Průběh PCR reakce:

1. 96°C.....5 min – denaturace DNA
2. 96°C.....30 s – denaturace DNA
3. 50°C.....30 s – nasedání specifických primerů
4. 72°C.....1 min – syntéza
5. 72°C.....20 min –závěrečná elongace
6. Konečná teplota byla nastavena na 4°C.

Kroky 2-4 se 35x opakovaly.

Výsledky reakce byly zkontrolovány na elektroforéze v 1% agarózovém gelu/1x TAE pufru. K nanesení vzorku byl použit 6x koncentrovaný vzorkový pufr od Promega s obsahem SYBR Green barvy pro vizualizaci DNA proužku pod UV zářením. Ke každému vzorku o objemu 20 μl bylo přidáno 3.31 μl vzorkového pufru. Jako marker byl použit standard molekulových hmotností 100 bp Gene Ruler (MBI Fermentas). Elektroforéza probíhala při napětí 100 V po dobu 20-35 minut. Výsledky byly zdokumentované pomocí přístroje MiniLumi (Dnr Bio Imaging Systems).

6.3.5 Purifikace PCR produktu

PCR produkt byl purifikován z gelu pomocí QIAquick[®] Gel Extraction kitu (Qiagen) podle návodu od výrobce. DNA byla eluována z kolony 30 μl ddH₂O.

6.3.6 Klonování PCR produktu do vektoru pCR[®] 4-TOPO

Purifikovaný PCR produkt byl dle návodu od výrobce zaklonován do pCR[®] 4-TOPO vektoru. Reakční směs byla po dobu 30 minut inkubována při pokojové teplotě.

6.3.7 Transformace One Shot TOP10 *E. coli* kompetentních buněk

2 µl reakční směsi z klonovací reakce byly přidány ke kompetentním buňkám One Shot[®] TOP10 *E. coli*. Po 25 minutové inkubaci na ledu a následném teplotním šoku 30s při 42°C bylo přidáno 250µl S.O.C. média a reakční směs byla inkubována 1 hodinu při 37°C na třepačce. Výsledná transformační směs byla rozetřena na LB agar obsahující ampicilin (50µg/ml) a přes noc inkubovaná na 37°C. Druhý den byly jednotlivé kolonie přeneseny do LB média s ampicilinem (50 µg/ml) a opět inkubovány přes noc na 37°C na třepačce.

6.3.8 Screening: Purifikace plazmidové DNA

Buněčné kultury byly po inkubaci na 37°C stočeny a z buněčného peletu byla podle protokolu z kitu QIAprep[®] Spin Miniprep Kit purifikována plazmidová DNA. Plazmidová DNA byla eluována z kolony 50 µl ddH₂O.

6.3.9 Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu pomocí PCR a sekvenování

Pro ověření přítomnosti inzertu v plazmidu byla použita metoda PCR (5.3.3), za použití gen-specifických primerů stejných jako při amplifikaci genu a vektor-specifických primerů M13 forward a M13 reverse. Výsledek byl zkontrolován elektroforézou na 1% agarózovém gelu a vyhodnocen pod UV světlem. Plazmidy, u kterých byla potvrzena přítomnost inzertu, byly následně osekvenovány.

6.3.10 Klonování PCR produktu do expresního vektoru ChampionTM pET 100/D- TOPO[®], ověření přítomnosti inzertu a správného čtecího rámce pomocí PCR a sekvenování

Sekvenací ověřený PCR produkt byl přesně podle protokolu od výrobce překlonován do expresního plazmidu pET 100/D-TOPO[®]. Po následné transformaci kompetentních buněk One Shot TOP10 *E. coli* Competent Cells byl proveden screening a přítomnost inzertu byla ověřena pomocí PCR. Sekvenováním plazmidu obsahujícího správný inzert s T7 promotor primerem byl ověřen správný čtecí rámec kódovaný PCR produktem.

6.3.11 Transformace BL21 StarTM (DE3) One Shot[®] Cells

Kompetentní buňky BL21 star^t (DE3) One Shot[®] byly podle návodu transformovány rekombinantním expresním plazmidem obsahujícím inzert.

6.3.12 Exprese rekombinantního proteinu (pilotní experiment)

Transformované buňky BL21 StarTM (DE3) One Shot[®] byly naočkovány do LB média s ampicilinem (50 µg/ml). Vzorky byly inkubovány na 37°C. Po 3 hodinách před přidáním IPTG do reakce pro indukci exprese rekombinantního proteinu, byl odebrán vzorek, který byl označen jako nultý - neindukovaný. Po přidání IPTG (cílová koncentrace 1mM) byl každou hodinu po dobu 6 hodin odebrán další vzorek. Výsledky pilotní exprese byly vyhodnoceny pomocí SDS-PAGE elektroforézy.

6.3.13 Kontrola exprese rekombinantního proteinu: SDS-PAGE

Buněčný pelet z pilotní exprese byl resuspendován v 250 µl 1x PBS. Z každého vzorku bylo odebráno 14 µl a smícháno s 5 µl barvy 4x Dual Color Protein Loading Buffer a 1 µl Reducing agent. Vzorky byly inkubovány 10 minut na 99°C, poté ihned zchlazeny na ledu a stočeny. Supernatant byl nanesen na SDS-PAGE gel. Gel byl připraven ze zaostřovacího (5%) a rozdělujícího (15%) gelu. Elektroforéza probíhala přibližně 1,5 hodiny při 120V na přístroji Hoefer SE 250. Po skončení elektroforézy byl gel 2x promyt v destilované vodě a obarven v roztoku PageBlueTM (MBI Fermentas).

6.3.14 Western Blot a detekce rekombinantního proteinu

Vzorky rozdělené na SDS-PAGE gelu byly přeneseny na PVDF membránu předem zaktivovanou v metanolu podle návodu výrobce (Millipore). Přenos na membránu trval přibližně 1,5 hodiny při 17 V na aparatuře Idea Scientific Company. Detekce rekombinantního proteinu byla provedena dle protokolu pomocí anti-His Ni-NTA HPR konjugátů (Qiagen). Membrána s přenesenými proužky zaznamenávajícími přítomnost proteinu byla vyfocena.

6.3.15 Nativní purifikace rekombinantního proteinu

Jeden gram buněčného peletu byl rozpuštěn v 5 ml lyzačního pufru a do směsi byl přidán lysozym (1 mg/ml). Reakční směs byla inkubována 30 minut na ledu a poté sonikována na přístroji Bandelin Sonoplus 10x 10 vteřin při 20 kHz. Lyzované buňky byly stočeny a supernatant byl odebrán pro následnou nativní purifikaci na Ni-NTA agaróze. 20 µl supernatantu bylo uschováno pro kontrolu pomocí SDS-PAGE.

Na kolonu byl přidán 1 ml Ni-NTA agarózy. Následovalo promývání vodou a ekvilibrace kolony lyzačním pufrům. 5 ml supernatantu bylo nanesen na kolonu a ponecháno přes noc v rotátoru Bio RS-24 (Biosan) na 4°C pro navázání na agarózu. Další vzorek byl odebrán ze směsi, která protekla přes kolonu (flow through). Kolona byla 6x

promyta 10 ml promývacího pufru. Po každém promytí byl odebrán další vzorek pro SDS-PAGE analýzu (washing). Nakonec byl cílový protein eluován z kolony elučním pufrém. Eluce byla provedena 5x 500 µl elučního pufru. Metodou SDS-PAGE byly jednotlivé frakce nativní purifikace zkontrolovány.

6.3.16 Hmotnostní spektrometrická analýza

Eluční frakce byly analyzované na SDS-PAGE, extrahované z gelu a odeslané na hmotnostní spektrometrii pro ověření.

7. Výsledky

7.1 Izolace RNA a syntéza cDNA

Koncentrace vyizolované RNA z jednotlivých orgánů klíštěte a z celého klíštěte jsou zaznamenány v tabulce (Tab. I).

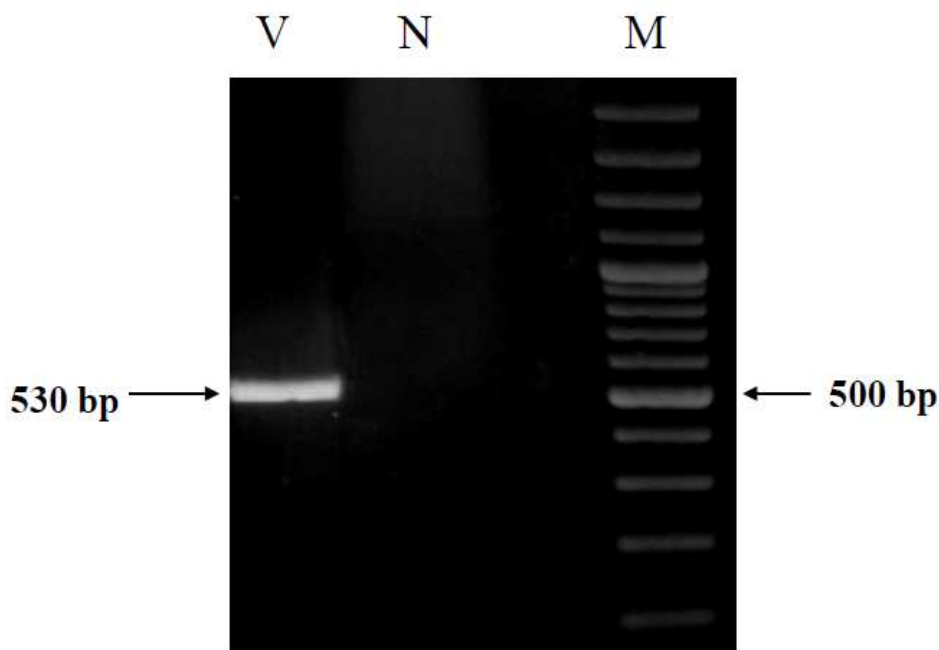
Tab. I: Koncentrace RNA z klíštěte a jeho orgánů.

	Koncentrace (ng/µl)
Celé klíště (10 klíšťat)	93,19
Hemolymfa (z 50 klíšťat)	22,6
Střevo (z 50 klíšťat)	708,1
Malpigické trubice (z 50 klíšťat)	171,5
Vaječníky (z 50 klíšťat)	324
Slinné žlázy (z 50 klíšťat)	369,5

Z RNA byla syntetizována cDNA.

7.2 PCR

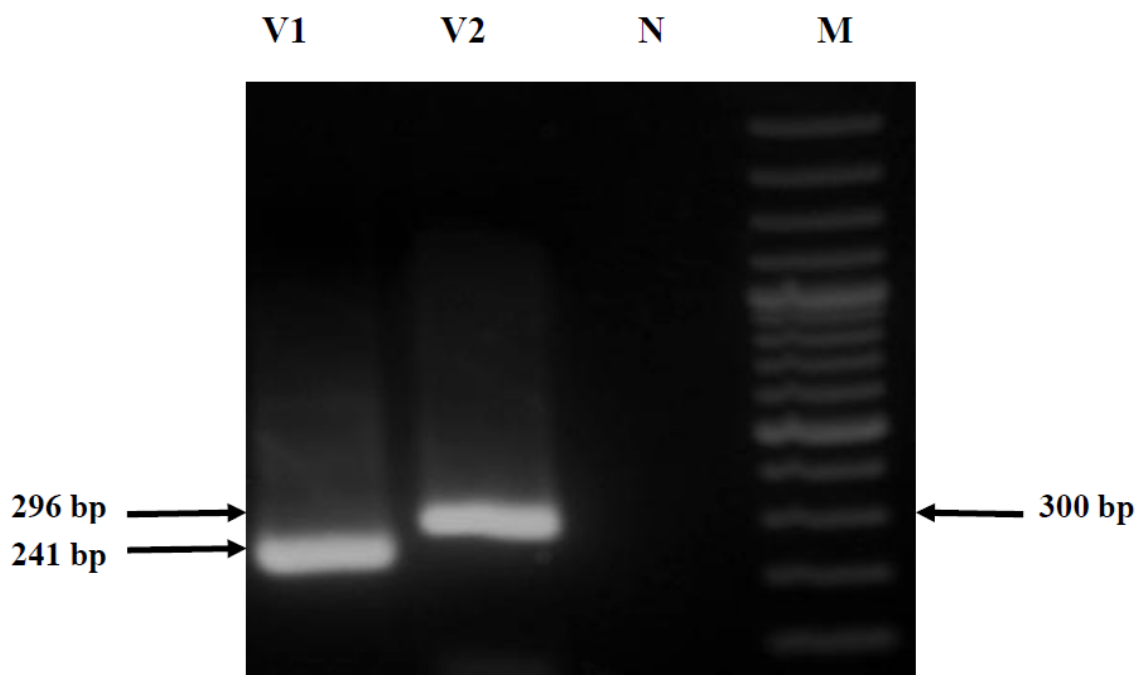
Kvalita syntetizované cDNA byla po provedení metody PCR za použití aktinových primerů zkontrolována na 1% agarózovém gelu. Velikost získaného PCR produktu je 530 bp, což odpovídá správné velikosti fragmentu genu aktinu, na základě kterého byly navrženy primery.



Obr. 1: Kontrola kvality cDNA pomocí aktinových primerů.

V - vzorek, N – negativní kontrola, M - marker 100bp DNA Ladder

Z této cDNA byl metodou PCR za použití specifických primerů získán gen pro nový peptid s inhibiční aktivitou proti serinovým proteázám. PCR produkt byl purifikován a osekvenován. Výsledná velikost fragmentu genu je 296 bp. Analýza sekvence ukázala, že 296 bp zahrnuje sekvenci signálního peptidu. Délka fragmentu genu kódujícího protein bez signálního peptidu odpovídá 241 bp.



Obr. 2: Amplifikovaný fragment genu bez signální sekvence a se signální sekvencí.

V1 – fragment genu bez signální sekvence, V2 – fragment genu se signální sekvencí,
N – negativní kontrola, M – marker 100bp DNA Ladder

```

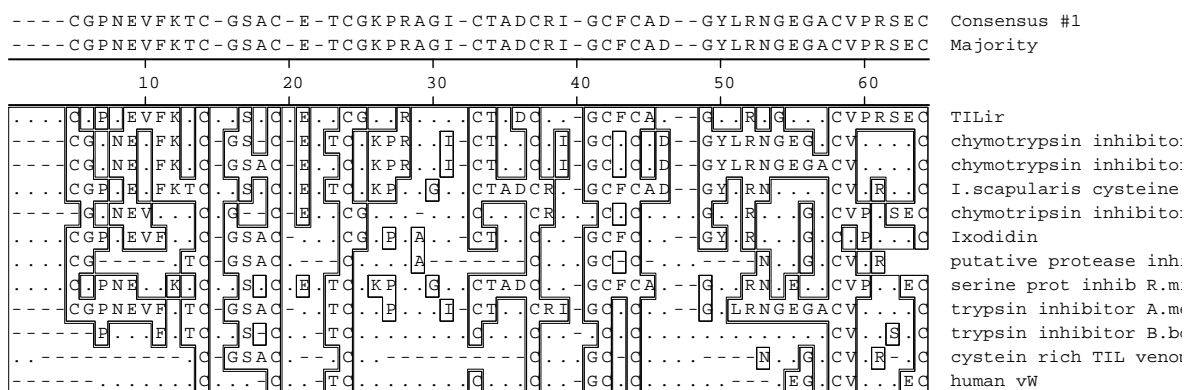
AGAATTGCGGCCGACTTGCCCTGGGTGTGTAGTCCCAGAGAGGTCTTCAAGGAATGCGTG
R I A A D L P W V C S P R E V F K E C V
AGCAGCAGCTGTGCCGAAGTGAAGTGCGGCATGGAACGCATGCCACTCGCTTGACTAAG
S S S C A E L K C G M E R M P L A C T K
GACTGTGCCAGCGGCTGCTTTTGCCTCCAGGCTTCTACCGCAAGGGGCACAGGGAATGC
D C A S G C F C A P G F Y R K G H R E C
GTTCCCCGAGCGAGTGCCAAGTCAAGCCCCTCAAACCCATGCCAAAGGCTTGTAG
V P R S E C Q L K P L K P M P K A C -

```

Obr. 3: Nukleotidová sekvence genu a aminokyselinová sekvence proteinu jím kódovaná.

Získaná sekvence genu kódujícího TILr byla zadána do databáze GenBank a porovnána se sekvencemi v databázi. Nukleotidová sekvence genu ukázala 92% homologii s mRNA von Willebrand faktoru klíštěte *I. ricinus* (AY338243), 85% homologii s mRNA domnělého von Willebrand faktoru klíštěte *I. scapularis* (XM_002414632) a 92% homologii s konzervovaným hypotetickým proteinem *I. scapularis* (XM_002414631). Aminokyselinová sekvence vykazuje homologii s několika inhibitory serinových proteáz. Sekvence TILr (2. na obr. 4) byla porovnána s ixodidinem (P83516), inhibitorem serinových proteáz z *Rhipicephalus microplus* (ACV83329.1), inhibitorem trypsinu

z *Ascaris lumbricoides* (XP_001120243), inhibitem trypsinu z *Bombina bombina* (CAA64330), na cystein bohatým proteinem z *I. scapularis* (EEC10264.1), lidským von Willebrand faktorem (CCQ25771), cathepsin G/chymotrypsinovým inhibitem z *Apis mellifera* (P56682), chymotrypsin/elastázou z *A. lumbricoides* (S08572), chymotrypsin/elastázovým inhibitem z *A. suum* (P07851). Výsledky srovnání jsou představené na obr. 4.




Obr. 4: Srovnání TILir proteinu s inhibitory serinových proteáz a jiných podobných sekvencí.

V databázi NCBI Protein blast bylo prokázáno, že tento protein obsahuje na cystein bohatou doménu s inhibiční aktivitou proti trypsinu (Trypsin inhibitor like cystein rich domain-TIL), která je typická pro inhibitory trypsinu. Tato doména většinou obsahuje 10 cysteinových zbytků, které tvoří 5 disulfidických můstků. Proteiny obsahující TIL doménu jsou schopné inhibovat proteázy a hrají tak důležitou roli v mnoha biologických procesech jako je antikoagulace a imunitní odpověď.



Obr. 5: Párování cysteinů za tvorby disulfidických můstků u TILir proteinu. Cysteinové zbytky, které spolu tvoří disulfidické můstky, jsou 1-7, 2-6, 3-5, 4-10 a 8-9.

pfam01826: **TIL, with user query added**



Trypsin Inhibitor like cysteine rich domain
 This family contains trypsin inhibitors as well as a domain found in many extracellular proteins. The domain typically contains ten cysteine residues that form five disulphide bonds. The cysteine residues that form the disulphide bonds are 1-7, 2-6, 3-5, 4-10 and 8-9.

Links ?
 Statistics ?
 Structure ?

pfam01826 is classified as a model that may span more than one domain.
 pfam01826 is not assigned to any domain superfamily.

Sequence Alignment include consensus sequence ?

Reformat Format: Compact Hypertext Row Display: up to 10 Color Bits: 2.0 bit Type Selection: top listed sequences

1CCV_A	3	C	GPNEVENTCG.	[1].AC	APTCAQP	KTR.	[1].CT.	[1].Q	CRIG	CQC	QE	40
query	30	C	SPREVEKECV.	[1].SS.	[2].ELKCGME.	[1].MPL.	[1].CT.	[1].D	CASG	CFC	AP	70
gi 74817541	14	C	GQNEEFTQCG.	[1].AC	EPSCNRP.	[1].AQA	CT.	[1].Q	CIVG	CQC	RQ	51
gi 122003586	27	C	KRPEIWEDCG	GC	ELKCGQS.	[1].FAP	CA.	[1].R	CNPP.	[1].CYC.	[2].FY	66
gi 122003584	37	C	KPNEIWMECG	GC	ELKCGQS.	[1].FTP	CT.	[1].I	CRPA.	[1].CYC.	[2].YY	76
gi 122118885	22	C.	[1].NPNEVYCCG.	[1].PC	QRTCKNL.	[1].IYM.	[1].CI.	[1].K	CVPG	CFC	RD	61
gi 122095708	23	C.	[1].GPNEVYQECG.	[1].AC	ERTCAGL.	[1].ANQ.	[1].CN.	[1].K	CVPG	CFC	AD	62
gi 121996149	60	C.	[1].DPNEVYDDCG.	[1].AC.	[1].DRTCTNQ.	[1].KND.	[2].CR.	[1].S	CNPG	CFC	RG	101
gi 12644020	294	C	PTGMEYKECV.	[1].PC	HRTCSSL.	[1].ITE.	[1].CR	E.	[1].CVDG	CSC	PE	332
gi 82275268	1472	C	PPNSHSSSCT.	[1].AC	PPQCAPA.	[1].SQR.	[1].CS.	[1].D	CVEG	CQC	DQ	1510
1CCV_A	41	GFLRNGE.	[1].ACVLPENC	56								
query	71	GFYRKGH.	[1].ECVPRSEC	86								
gi 74817541	52	GFLRNSS.	[1].RCVTPREC	67								
gi 122003586	67	GLRRDSS.	[1].KCISKHQC	82								
gi 122003584	77	GFRRTFN.	[1].KCIHVSQC	92								
gi 122118885	62	GYVRQYD.	[2].PCVPIGEC	78								
gi 122095708	63	GFVRLNH.	[2].QCVPSKCR	79								
gi 121996149	102	GYVRNKS.	[1].RCVPSYMC	117								
gi 12644020	333	GQLLDEG	RCVESTEC	347								
gi 82275268	1511	GYILNGK	SCILPQSC	1525								

Obr. 6: Proteiny obsahující TIL doménu.

1CCV_A: Chain A, Nmr Solution Structure Of *Apis Mellifera* Chymotrypsin Inhibitor (Amci).

Query: TILr, *Ixodes ricinus*

Gi 74817541: LOCUS Q5TQV2_ANOGA, *Anopheles gambiae*

Gi 122003586: Hypothetical protein, *Aedes aegypti*

Gi 122003584: Hypothetical protein, *Branchiostoma belcheri tsingtauense*

Gi 122118885: Hypothetical protein, *Branchiostoma belcheri tsingtauense*

Gi 122095708: Gene3D:G3DSA:2.10.25.10, *Drosophila melanogaster*

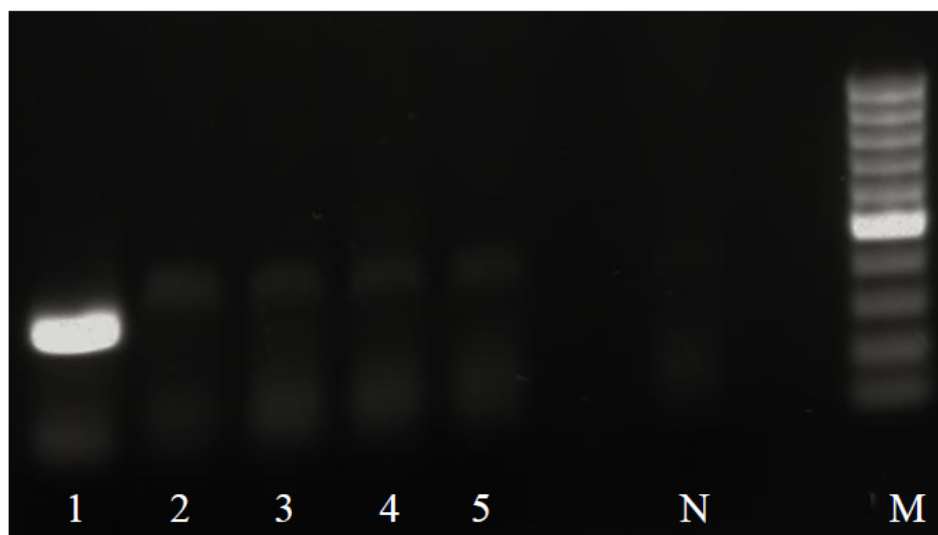
Gi 121996149: LOCUS Q7KUM2_DROME, *Drosophila melanogaster*

Gi 12644020: Hypothetical protein, *Caenorhabditis elegans*

Gi 82275268: LOCUS XP_001237832, *Anopheles gambiae*

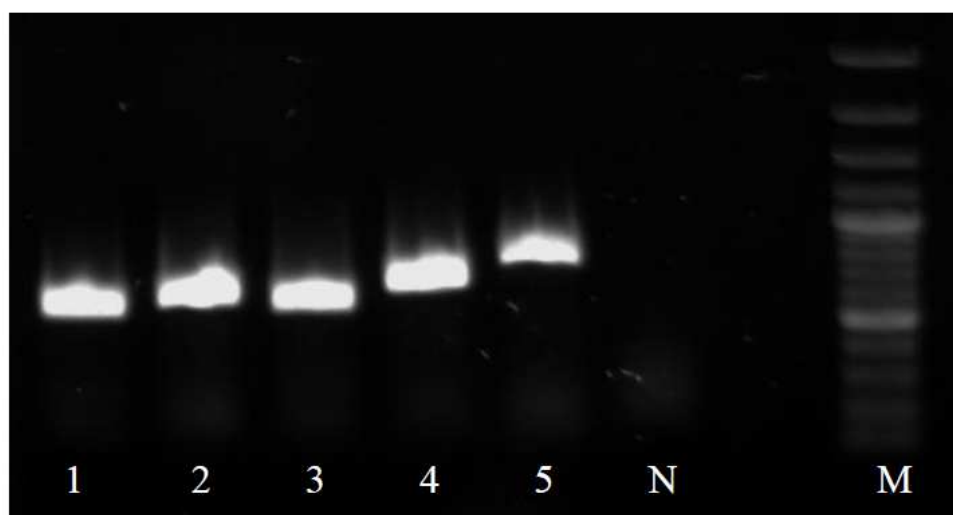
7.3 Expresa genu kódujícího TILr v různých tkáních *I. ricinus*

Pro analýzu exprese genu kódujícího TILr v různých tkáních *I. ricinus* bylo použito 66ng mRNA vyizolované ze slinných žláz, hemolymfy, vaječnicků, střeva a malpigických trubic. Pro kontrolu byla provedena stejná reakce s aktinovými primery. Výsledky ukázaly, že exprese genu kódujícího TILr byla zaznamenána jen ve střevech. V ostatních tkáních nebyla zaznamenána žádná exprese.



Obr. 7: Expresa genu v jednotlivých orgánech *I. ricinus*.

1 – střevo, 2 – slinné žlázy, 3 – malpigické trubice, 4 – vaječnický, 5 – hemolymfa,
N – negativní kontrola, M – marker 100bp DNA Ladder

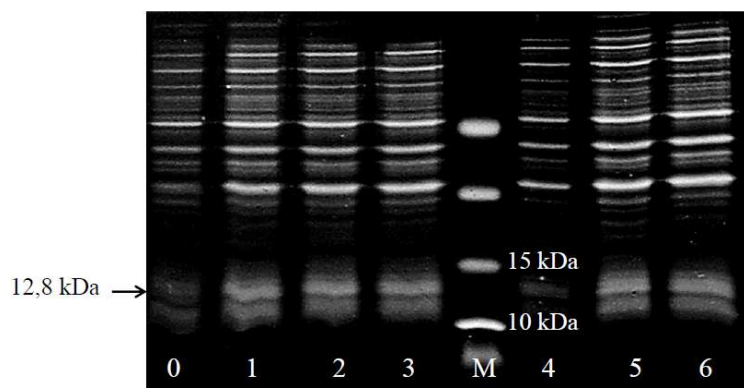


Obr. 8: Potvrzení přítomnosti aktinu v cDNA z jednotlivých orgánů klíštěte.

1 – střevo, 2 – slinné žlázy, 3 – malpigické trubice, 4 – vaječnický, 5 – hemolymfa, N –
negativní kontrola, M – marker 100bp DNA Ladder

7.5 Expresa rekombinantního proteinu

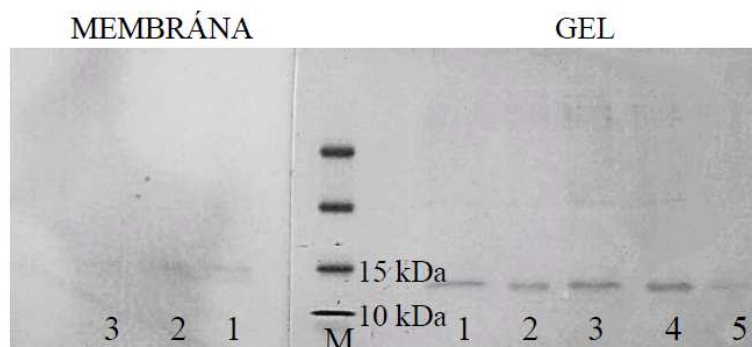
Po pilotním experimentu bylo zjištěno, že rekombinantní protein je exprimován už od 1. hodiny po indukci a míra exprese se s časem nezvyšuje. Jako optimální čas pro expresi proteinu byly vybrány 3 hodiny. Molekulová hmotnost rekombinantního proteinu odpovídá 12 767,80 Da.



Obr. 9: Pilotní experiment se vzorkem bez indukce (0) a vzorky s indukcí 1 – 6 hodin (vzorky 1-6). M – marker Low Range Protein Ladder

7.6 Nativní purifikace rekombinantního proteinu

Protein byl purifikován za nativních podmínek na Ni-NTA agaróze. Výsledky purifikace zkontrolované na SDS gelu ukázaly přítomnost cílového proteinu (TILIr) odpovídající velikosti ve všech elučních frakcích. Po přenosu proteinů na membránu pomocí metody Western Blot a následné detekci proteinů pomocí anti-His protilátek byla na membráně potvrzena přítomnost rekombinantního TILIr s navázaným His-tagem v elučních frakcích 1., 2., a 3. (Obr. 9). Po confirmaci Western blotem byla aminokyselinová sekvence rekombinantního TILIr ověřena hmotnostní spektrometrií.



Obr. 10: Přenos elučních frakcí 1 až 5 na PVDF membránu.

M – marker Low Range Protein Ladder

7.8 Hmotnostní spektrometrická analýza

Pomocí hmotnostní spektrometrické analýzy byla potvrzena podobnost s proteinem Tick til 9 z *Ixodes ricinus* (JAB77954.1) a prekurzorem trypsinu (P00761). Dále byla určena částečná aminokyselinová sekvence proteinu TILIr. Produkce rekombinantního proteinu v expresním systému byla potvrzena.

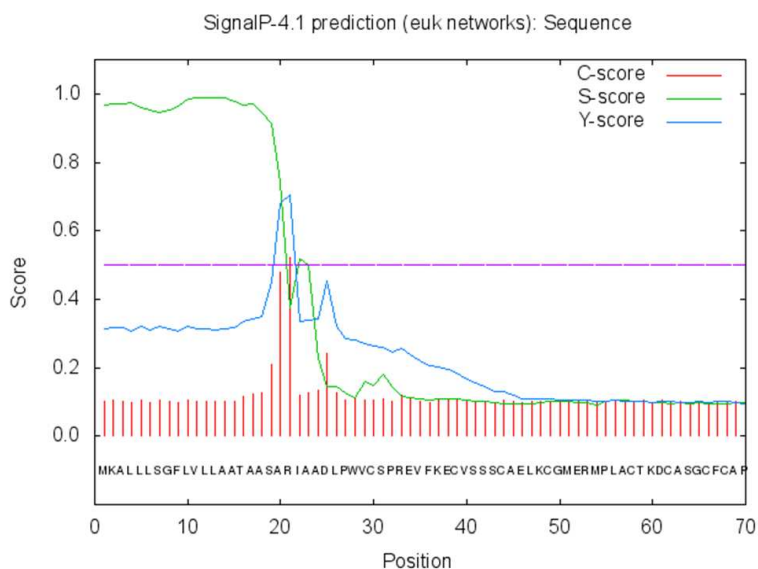
TILIr	31	RIAADLPWVCGPREVFKECVSSSSCAELKCGREGMPLACTADCVSGCFCAPGFYRKGHREC	90
		RIAADLPWVC PREVFKECVSSSSCAELKCG E MPLACT DC SGCFCAPGFYRKGHREC	
til 9	1	RIAADLPWVCSPREVFKECVSSSSCAELKCGMERMPLACTKDCASGCFCAPGFYRKGHREC	60
TILIr	91	VPRSECRVEPFKPINIA	107
		VPRSEC+++P KP A	
Til 9	61	VPRSECQLKPLKMPKA	77

Obr. 11: Srovnání TILIr s Tick til 9.

7.9 Online analýza sekvence

7.9.1 Predikce signálního peptidu

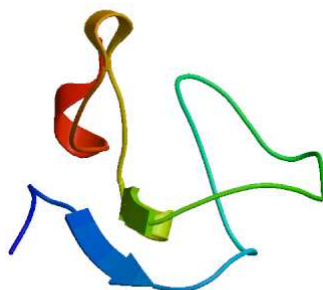
Signální sekvence byla zjištěna pomocí databáze CBS (Obr. 12). Ukázalo se, že aminokyselinová sekvence TILIr zahrnuje 20 aminokyselin signálního peptidu, který se odštěpuje od zralého peptidu mezi aminokyselinami 20 (A) a 21 (R). Velikost zralého TILIr bez signální sekvence odpovídá 80 aminokyselinám.



Obr. 12: Predikce signálního peptidu v aminokyselinové sekvenci TILIr.

7.9.2 Predikce 3D struktury proteinu

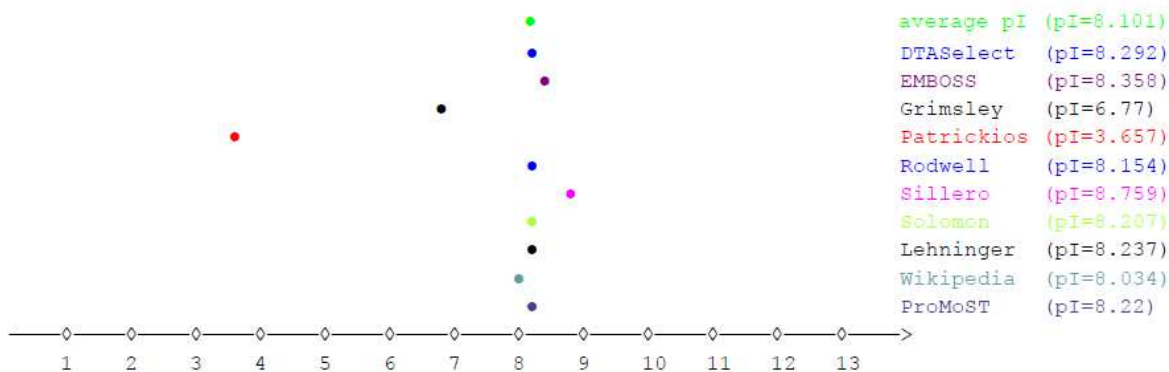
3D struktura proteinu byla předpovězena pomocí databáze Expasy SWISS-MODEL. Model byl sestaven částečně podle homologní sekvence isoinhibitoru elastázy/chymotrypsinu 1 a zbylé úseky pomocí knihovny fragmentů. Struktura obsahuje dva ze tří β -skládaných listů, které jsou součástí struktury serpinů. Dále obsahuje několik otáček a dlouhý úsek s místem pro navázání proteázy. Stabilita struktury je dána 5 disulfidickými můstky, které tvoří již zmíněnou TIL doménu důležitou pro inhibici proteázy.



Obr. 13: Predikce 3D struktury

7.9.3 Izoelektrický bod

Pomocí databáze ExPASy a Isoelectric Point Calculator byl zjištěn přibližný izoelektrický bod proteinu. V ExPASy byl izoelektrický bod odhadnut na 8,39. Isoelectric Point Calculator srovnává výsledky z různých databází (Obr. 13). Průměr všech vypočítaných izoelektrických bodů je 8,101. Při pH 8,101 tedy tento protein nese žádný elektrický náboj.



Obr. 14: Srovnání izoelektrických bodů získaných z různých zdrojů

7.9.4 Predikce funkce proteinu

Podle databáze APD2 (Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor) může sekvence tvořit disulfidickou vazbu s β -strukturou, spirálovité struktury obsahující disulfidické můstky nebo několik thioeterových vazeb. Potenciál vazby proteinu je 1,68 kcal/mol. Sekvence má vysoký obsah cysteinů (14%), alaninů, prolinů, serinů, glutaminů a argininů (každý 8%). Z celkového počtu 71 aminokyselin je 8 aminokyselin kyselých (D, E), 14 bazických (K, R, H), 35 hydrofobních (I, V, L, F, C, M, A, W) a 9 polárních (T, S, Y, Q, N). Počet dovršují 4 glyciny a 8 prolinů. Databáze také potvrdila, že analyzovaná sekvence pravděpodobně představuje antimikrobiální peptid nebo protein, který má antimikrobiální potenciál. V databázi antimikrobiálních peptidů byly na základě této informace vyhledány homologie. Mezi podobné proteiny patří antimikrobiální peptid Rhamp z klíštěte *Rhipicephalus haemaphysaloides* (40,44%), který inhibuje některé proteázy jako je elastáza nebo chymotrypsin. Další podobné antimikrobiální peptidy jsou Ixodidin z *B. microplus* (36,58%), rostlinný defensin Sd1 (33,33%), neuromarcin z pijavice *Hirudo medicinalis* (31,76%) nebo další rostlinný defensin P322 (31,25%).

8. Diskuze

Klíšťata jsou nejčastějšími krevsajcími ektoparazity napadajícími různé druhy zvířat od lidí po dobytek (Sonenshine, 1991). Jelikož jsou vektory mnoha patogenů, představují pro své hostitele hned dvojí přítěž. První přítěží je samotné sání krve a druhou, mnohem závažnější, je kontakt s klíšťaty přenášenými chorobami. Protiklíštěcí strategie jsou proto z lékařského i veterinárního hlediska důležité (Willadsen et al., 1995, Willadsen et al., 1996).

Inhibitory serinových proteáz se účastní kontroly mnoha biologických procesů. Analýza sekvencí různých genomů vedla k objevu velkých rodin serpinů u mnohobuněčných organismů. Objevení velkého množství serpinů kódujících cDNA u klíšťat je možné považovat za nepřímý důkaz, že klíšťata také kódují velké rodiny serpinů. Tento fakt byl před nedávnem potvrzen sekvenováním genomu klíště *I. scapularis*, ve kterém byla objevena rodina 45 serpinů (Mulenga et al., 2009). Ve srovnání s 3100 MBP lidského genomu, který kóduje 36 prozatím známých serpinů (Law et al., 2006), 45 genů serpinů identifikovaných v *I. scapularis*, který má genom o velikosti 2100 MBP, tvoří velkou část genomu. I když biologickou důležitost vysokého počtu serpinů u *I. scapularis* nelze v současné době určit, můžeme se domnívat, že signalizuje velký význam serpinů ve fyziologii klíšťat.

Využití serpinů jako kandidátů pro protiklíštěcí vakcíny by představovalo zajímavé

řešení, protože někteří zástupci těchto inhibitorů působí jako klíčoví regulátoři metabolismu členovců a hemostázi hostitele. Navíc již bylo publikováno několik prací, ve kterých byly serpiny z jiných klíšťat čeledi klíšťatovitých použity jako vakcinační proteiny (Imamura et al., 2005; Kazimirova et al., 2002; Mulenga et al., 2003; Sugino et al., 2003).

Hlavním cílem této práce byla izolace genu pro nový peptid s předpokládanou inhibiční aktivitou proti serinovým proteázám. Velikost typické molekuly trypsinu se obvykle pohybuje v rozmezí 350-450 aminokyselin (Patston, 2000). Z nového genu, pojmenovaného TILIr, byla určena částečná sekvence (98 aminokyselin) obsahující na cystein bohatou doménu s inhibiční aktivitou proti trypsinu.

V databázi NCBI Protein Blast a EXPASY bylo zjištěno, že tento protein vykazuje homologii s větším množstvím proteinů z rodiny inhibitorů serinových proteáz. Mezi tyto geny patří mRNA domnělého Tick til 9 z *I. ricinus* s 84% shodou (JAB77995.1), domnělý prekuzor inhibitoru serinových proteáz z *I. ricinus* s 83% shodou (JAB74024.1), domnělý inhibitor chymotrypsinu s 67% shodou z *I. ricinus* (JAA66176.1), z 58% shodný protein podobný inhibitoru trypsinu s doménou bohatou na cystein (JAB69137.1) a von Willebrand faktor z klíštěte *Ixodes ricinus* (AAQ01562). Dále je protein shodný s řadou proteinů z jiných druhů klíšťat jako např. hypotetický von Willebrand faktor z *I. scapularis* (XP_002414677), hypotetický konzervovaný protein z *I. scapularis* (XP_002414676), prekuzor inhibitoru serinové proteázy z *Rhipicephalus microplus* (ACV83329), domnělý ixodidin podobný inhibitoru chymotrypsinu/elastázy z *Rhipicephalus pulchellus* (JAA53952), domnělý polypeptid s TIL doménou z *Anopheles gambiae* (ABD18600) a také celá řada na cystein bohatých proteinů z *I. scapularis*.

Proteiny obsahující Trypsin Inhibitor Like doménu (TIL) se uplatňují v mnoha biologických procesech a mají velký potenciál v léčbě některých nemocí. TIL doména většinou obsahuje 10 cysteinových zbytků, jejichž přítomnost byla v námi popsaném proteinu potvrzena. Těchto 10 cysteinových zbytků u proteinů s TIL doménou tvoří 5 disulfidických můstků. Cysteinové zbytky, které spolu tvoří disulfidické můstky, jsou 1-7, 2-6, 3-5, 4-10 a 8-9.

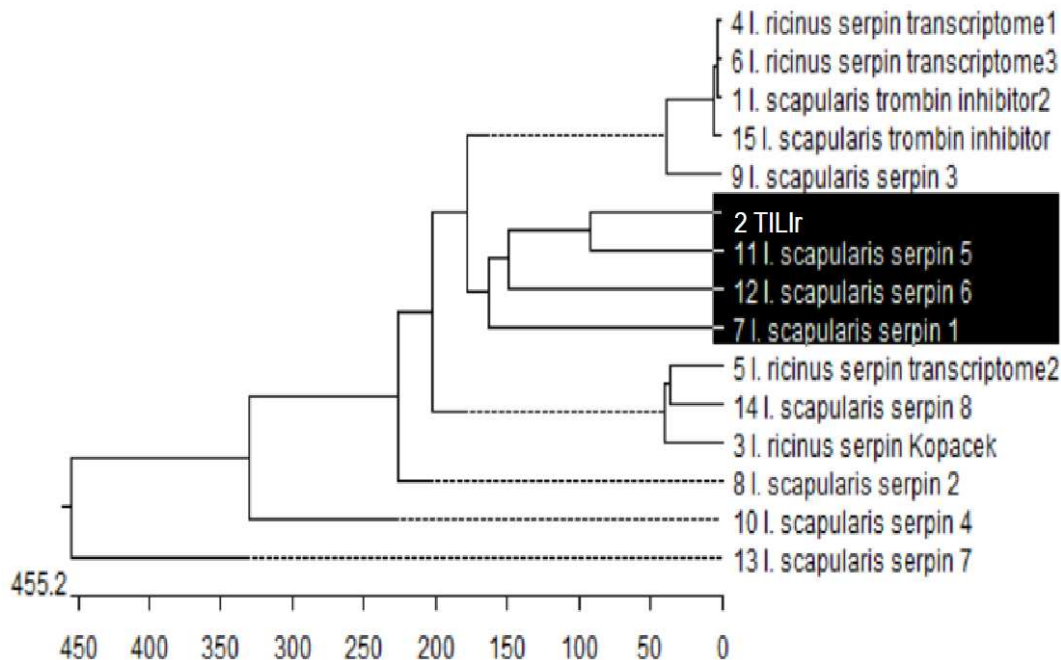
Serpiny většinou obsahují na C-konci pružné smyčky reaktivního centra (RCL), které primárně určují inhibiční funkci. RCL smyčka funguje jako pseudosubstrát pro cílovou proteázu. Serpiny obsahující RCL smyčku mají schopnost inhibice (Mulenga et al., 2009). Jelikož naše sekvence je částečná a postrádá celý C-konec, RCL smyčka v ní nebyla objevena.

Po zadání proteinové sekvence do databáze Swiss-Model se prokázalo, že tato

sekvence s velkou pravděpodobností tvoří α -helixy stejně jako další inhibitory serinových proteáz.

Další důležitou součástí serpinů jsou místa N-glykosylace. Většina známých serpinů je glykosylována. Například u klíštěte *I. scapularis* byla ve 38 ze 45 serpinových sekvencí prokázána přítomnost N-glykosylací. Kromě jedné sekvence obsahovaly všechny jedno, dvě nebo tři místa N-glykosylace (Mulenga et al., 2009). Pomocí Glycosylation Predictor (University of Nottingham, Jonathan Hirst) lze předpovědět, že námi popsany protein má jedno místo glykosylace. Tato data nemusí být úplná, jelikož tato práce popisuje pouze částečný protein.

Když byl gen porovnán s genomem klíštěte *I. scapularis* a jeho zmíněnými 45 serpiny, ukázal největší shody s mRNA domnělého *I. scapularis* serpinu s pracovním názvem serpin 5 (XM_002435349) a s prekurzorem *I. scapularis* serpinu 2 s pracovním názvem serpin 1 (XM_002411888.1). Aminokyselinová shoda s prvním serpinem z *I. scapularis* byla 35% a s druhým 38%. Schematický fylogenetický strom vytvořený v modulu MedAlign programu DNASTar ukazuje, že námi popsany protein je více než se serpiny popsány u *I. ricinus* příbuzný se serpiny 1, 5 a 6 z klíštěte *I. scapularis*. Vysvětlením by mohl být nedostatek sekvencí z genomu *I. ricinus* nebo jednoduše velká podobnost těchto dvou klíštěčích druhů.



Obr. 15: Schematický fylogenetický strom serpinů z *I. ricinus* a *I. scapularis* vytvořený v modulu MedAlign programu DNASTar.

Během příprav této bakalářské práce byla zveřejněna předběžná analýza transkriptomu slinných žláz klíštěte *I. ricinus* (Schwarz et al., 2012). Po této analýze bylo objeveno 16

serpinů. Srovnání naší sekvence s těmito serpiny ukázalo 32% shodu s Ir2-20314 mRNA sekvencí z *I. ricinus* (GADI01004776).

U člověka se většina serpinů vyskytuje v extracelulární formě (Silverman et al., 2004). Stejně tak TILIr obsahuje signální sekvenci, která je typická pro extracelulární formu. 82% popsaných kompletních serpinů u klíštěte *I. scapularis* (Mulenga et al., 2009) a 13 ze 17 serpinů z *A. americanum* (Mulenga et al., 2007) je pravděpodobně extracelulárních. Z hlediska hledání nových antigenů pro vývoj protiklíštěcí vakcíny je fakt, že tyto proteiny jsou extracelulární a tedy snadno dostupné faktorům imunitní odpovědi hostitele, velmi povzbudivý. Nicméně, predikce založené na analýze sekvence nemusí být v situaci in vivo platné (Mulenga et al., 2009).

Expese genu pro TILIr byla potvrzena ve střevě *I. ricinus*. Většina serpinů klíštěte *I. scapularis* je exprimována ve střevech a ve slinných žlázách. Je možné, že analyzované geny jsou exprimované i v jiných klíštěcích orgánech. Nicméně, z hlediska dlouhodobého zájmu o porozumění molekulárním mechanismům interakcí mezi klíštětem a hostitelem je toto zjištění velmi zajímavé. Střeva jsou totiž důležitá pro zpracování krevní potravy klíštěte, zatímco slinné žlázy jsou zásadní pro krmení a přenos patogenů.

Analýza funkcí a vlastností klíštěcích serpinů prokázala, že klíšťata mohou využívat serpiny k manipulaci obrany hostitele, aby si usnadnila přenos patogenů. Klíštěcí proteiny jako např. serpiny, které regulují krmení krví na hostiteli, jsou z hlediska vývoje nových technologií prevence proti klíšťaty přenášeným původcům chorob velmi žádoucí. Zablokováním funkce těchto proteinů budou tyto látky schopné narušit schopnost klíšťat zahájit krmení a/nebo znemožní přípravu příznivých podmínek pro kolonizaci hostitele přenášeným patogenem.

Pomocí serpinů klíšťata také mohou manipulovat s obrannými mechanismy hostitele s cílem usnadnit si příjem potravy. Je možné, že serpiny nejsou přímo zapojené do zprostředkování krmení. Nicméně stejně jako u savců, mohou být zapojeny do regulace důležitých cest v klíštěti, jejichž narušení může mít vliv na schopnost klíšťat jako vektorů (Mulenga et al., 2009).

Naše práce je pouze prvním krokem v charakterizaci nového inhibitoru trypsinu klíštěte *I. ricinus*. Další práce by měla být provedena pro získání kompletní sekvence TILIr, nového serpinu, a určení jeho genomové struktury. U *I. scapularis* se 13 ze 45 serpinů jeví jako intron obsahující geny. V zájmu také zůstává zjištění funkcí rekombinantního proteinu a to pomocí testů na inhibici proteáz nebo antikoagulačních testů. Test RNA interference by navíc mohl objasnit vliv proteinu na příjem krevní potravy klíštětem.

9. Závěr

U klíštěte *Ixodes ricinus* byl vyizolován nový gen kódující protein s inhibiční aktivitou proti serinovým proteázám o velikosti 296 bp a obsahující TIL doménu, která je důležitá pro inhibici proteáz. Gen prokázal homologii s řadou genů kódujících jiné inhibitory serinových proteáz nejen z klíštěte *I. ricinus*, ale i z jiných druhů klíšťat a organismů. Velikost částečného proteinu je 12,8 kDa. Produkce rekombinantního proteinu v expresním bakteriálním systému byla potvrzena pomocí hmotnostní spektrometrické analýzy. V proteinu bylo předpovězeno jedno místo glykosylace. Předpokládaný izoelektrický bod je pH 8,101. Exprese genu byla prokázána ve střevech klíštěte *I. ricinus*.

10. Použitá literatura

- Agarwala, K. L., Kawabata, S. I., Miura, Y., Kuroki, Y., & Iwanaga, S. (1996). Limulus intracellular coagulation inhibitor type 3. Purification, characterization, cDNA cloning, and tissue localization. *The Journal of biological chemistry*, *271*, 23768–23774.
- Andreotti, R., Gomes, A., Malavazi-Piza, K. C., Sasaki, S. D., Sampaio, C. A. M., & Tanaka, A. S. (2002). BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *International immunopharmacology*, *2*, 557–563.
- Armstrong, P. B. (2006). Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. *Immunobiology*, *211*, 263–281.
- Barret, A. J., & Salvesen, G. (1986). Cysteine proteinase inhibitor of the cystatin superfamily. In A. J. Barrett (Ed.), *Proteinase inhibitors* (pp. 515–569). Amsterdam: Elsevier.
- Barrett, A. J., & Starkey, P. M. (1973). The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *The Biochemical journal*, *133*, 709–724.
- Carrell, R. W., Pemberton, P. A., & Boswell, D. R. (1987). The serpins: evolution and adaptation in family of proteinase inhibitors. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *52*, 527–535.
- DeMar, T. (2006). Innate Immunity in Ticks: A review. *Journal of the Acarological Society of Japan*, 109-127.
- Fogaça, A. C., Almeida, I. C., Eberlin, M. N., Tanaka, A. S., 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*, 667–674.
- Förstl, M. (2003). Praktický atlas lékařské parazitologie. *Nucleus* (pp. 133), Hradec Králové
- Gettins, P. G. W. (2000). Keeping the serpin machine running smoothly. *Genome Research*, *10*, 1833–1835.

- Gettins, P. G. W. (2002). Serpin structure, mechanism, and function. *Chemical reviews*, *102*, 4751–4804.
- Gillespie, J. P., Kanost, M. R., & Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual review of entomology*, *42*, 611–643.
- Götz, P. (1986). Encapsulation in Arthropods. *Immunity in invertebrates*, 153–170.
- Götz, P., & Boman, H. G. (1985). Insect immunity. *Comprehensive insect physiology, Biochemistry and Pharmacology*, *3*, 453–485.
- Grunclová, L., Horn, M., Vancová, M., Sojka, D., Franta, Z., Mares, M., & Kopáček, P. (2006). Two secreted cystatins of the soft tick *Ornithodoros moubata*: differential expression pattern and inhibitory specificity. *Biological chemistry*, *387*, 1635–1644.
- Huntington, J. A., Read, R. J., & Carrell, R. W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, *407*, 923–926.
- Huntington, J. A. (2006). Shape-shifting serpins--advantages of a mobile mechanism. *Trends in biochemical sciences*, *31*, 427–435.
- Chmelar, J., Anderson, J. M., Mu, J., Jochim, R. C., Valenzuela, J. G., & Kopecký, J. (2008). Insight into the sialome of the castor bean tick, *Ixodes ricinus*. *BMC genomics*, *9*, 233.
- Chmelar, J., Oliveira, C. J., Rezacova, P., Francischetti, I. M. B., Kovarova, Z., Pejler, G., ... Kotsyfakis, M. (2011). A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood*, *117*, 736–744.
- Chrudimská, T., Slaninová, J., Rudenko, N., Růžek, D., & Grubhoffer, L. (2011). Functional characterization of two defensin isoforms of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasites & vectors*, *4*(1), 63.
- Imamura, S., da Silva Vaz Junior, I., Sugino, M., Ohashi, K., & Onuma, M. (2005). A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine*, *23*, 1301–1311.

- Irving, J. A., Pike, R. N., Lesk, A. M., & Whisstock, J. C. (2000). Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome research*, *10*, 1845–1864.
- Ivanov, V. T., Karelin, A. A., Philippova, M. M., Nazimov, I. V., & Pletnev, V. Z. (1997). Hemoglobin as a source of endogenous bioactive peptides: the concept of tissue-specific peptide pool. *Biopolymers*, *43*, 171–188.
- Iwanaga, S. (2002). The molecular basis of innate immunity in the horseshoe crab. *Current Opinion in Immunology*, *14*, 87–95.
- Kadlíková, L. (2007). Klíčtě obecně – *Ixodes ricinus*. (www.priroda.cz)
- Karim, S., Miller, N. J., Valenzuela, J., Sauer, J. R., & Mather, T. N. (2005). RNAi-mediated gene silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood feeding. *Biochemical and biophysical research communications*, *334*, 1336–1342.
- Khan, M. S., Singh, P., Azhar, A., Naseem, A., Rashid, Q., Kabir, M. A., & Jairajpuri, M. A. (2011). Serpin Inhibition Mechanism: A Delicate Balance between Native Metastable State and Polymerization. *Journal of amino acids*, *2011*, 606797.
- Kotsyfakis, M., Karim, S., Andersen, J. F., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M. C. (2007). Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *The Journal of biological chemistry*, *282*, 29256–29263.
- Lara, F. A., Lins, U., Bechara, G. H., & Oliveira, P. L. (2005). Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *The Journal of experimental biology*, *208*, 3093–3101.
- Law, R. H. P., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., Wong, W., ... Whisstock, J. C. (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome biology*, *7*, 216.
- Leboulle, G., Rochez, C., Louahed, J., Ruti, B., Brossard, M., Bollen, A., & Godfroid, E. (2002). Isolation of *Ixodes ricinus* salivary gland mRNA encoding factors induced during blood feeding. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, *66*, 225–233.

- Lima, C. A., Sasaki, S. D., & Tanaka, A. S. (2006). Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *347*(1), 44–50.
- Medcalf R. L. (2005). Meet the serpins. *The FEBS journal*, *272*, 4841.
- Michel, K., Suwanchaichinda, C., Morlais, I., Lambrechts, L., Cohuet, A., Awono-Ambene, P. H., ... Kafatos, F. C. (2006). Increased melanizing activity in *Anopheles gambiae* does not affect development of *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*, 16858–16863.
- Mulenga, A., Sugimoto, C., & Onuma, M. (2000). Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, *2*, 1353–1361.
- Mulenga, A., Tsuda, A., Onuma, M., & Sugimoto, C. (2003). Four serine proteinase inhibitors (serpin) from the brown ear tick, *Rhipicephalus appendiculatus*; cDNA cloning and preliminary characterization. *Insect biochemistry and molecular biology*, *33*, 267–276.
- Mulenga, A., Khumthong, R., & Blandon, M. A. (2007). Molecular and expression analysis of a family of the *Amblyomma americanum* tick Lospins. *The Journal of experimental biology*, *210*, 3188–3198.
- Mulenga, A., Khumthong, R., & Chalaire, K. C. (2009a). *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis. *BMC genomics*, *10*(1), 217.
- Mulenga, A., Khumthong, R., & Chalaire, K. C. (2009b). *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis. *BMC genomics*, *10*, 217.
- Nappi, A. J., Frey, F., & Carton, Y. (2005). *Drosophila* serpin 27A is a likely target for immune suppression of the blood cell-mediated melanotic encapsulation response. *Journal of insect physiology*, *51*, 197–205.

- Nuttall, P. A., Trimnell, A. R., Kazimirova, M., & Labuda, M. (2006). Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite immunology*, 28, 155–163.
- Parola, P., & Raoult, D. (2006). Tropical rickettsioses. *Clinics in Dermatology*, 24, 191–200.
- Patston, P. (2000). Serpins and other serine protease inhibitors. *Immunobiology Today*, 21, 354.
- Peumans, W. J., & Van Damme, E. J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant physiology*, 109, 347–352.
- Potempa, J., Korzus, E., & Travis, J. (1994). The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 15957–15960.
- Prevot, P. - P., Beschin, A., Lins, L., Beaufays, J., Grosjean, A., Bruys, L., ... Godfroid, E. (2009). Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *The FEBS journal*, 276, 3235–3246.
- Prevot, P-P, Couvreur, B., Denis, V., Brossard, M., Vanhamme, L., & Godfroid, E. (2007). Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. *Vaccine*, 25, 3284–3292.
- Ratcliffe, N. A., & Rowley, A. F. (1979). Role of hemocytes in defense against biological agents. In A. P. Gupta (Ed.), *Development, Forms, Functions and Techniques: Insect hemocytes* (pp. 331–414). Cambridge: Cambridge University.
- Ratner, S., & Vinson, S. B. (1983). Phagocytosis and encapsulation: Cellular immune responses in Arthropoda. *American zoologist*, 23, 185–194.
- Renard, G., Lara, F. A., de Cardoso, F. C., Miguens, F. C., Dansa-Petretski, M., Termignoni, C., & Masuda, A. (2002). Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect molecular biology*, 11, 325–328.
- Sasaki, S. D., de Lima, C. A., Lovato, D. V., Juliano, M. A., Torquato, R. J. S., & Tanaka, A. S. (2008). BmSI-7, a novel subtilisin inhibitor from *Boophilus microplus*, with activity toward Pr1 proteases from the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Parasitology*, 118(2), 214–220.

- Schwarz, A., von Reumont, B. M., Erhart, J., Chagas, A. C., Ribeiro, J. M. C. & Kotsyfakis, M. (2012). De novo Ixodes ricinus salivary transcriptome analysis using two different next generation sequencing methodologies. *Unpublished*.
- Schwartz, S. N. (1994). Tick-Borne Diseases. *The New England Journal of Medicine*, 330, 292.
- Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Church, F. C., Coughlin, P. B., Gettins, P. G., ... Whisstock, J. C. (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *The Journal of biological chemistry*, 276, 33293–33296.
- Silverman, G. A., Whisstock, J. C., Askew, D. J., Pak, S. C., Luke, C. J., Cataltepe, S., ... Bird, P. I. (2004). Human clade B serpins (ov-serpins) belong to a cohort of evolutionarily dispersed intracellular proteinase inhibitor clades that protect cells from promiscuous proteolysis. *Cellular and molecular life sciences*, 61(3), 301–25.
- Soares, T. S., Watanabe, R. M. O., Tanaka-Azevedo, A. M., Torquato, R. J. S., Lu, S., Figueiredo, A. C., ... Tanaka, A. S. (2012). Expression and functional characterization of boophilin, a thrombin inhibitor from Rhipicephalus (Boophilus) microplus midgut. *Veterinary parasitology*, 187(3-4), 521–8.
- Sonenshine D. E. (1993). Biology of ticks. *Oxford University Press, New York*, 447.
- Starkey, P. M., & Barrett, A. J. (1973). Inhibition by alpha-macroglobulin and other serum proteins. *The Biochemical journal*, 131, 823–831.
- Starkey, P. M., & Barrett, A. J. (1977). α 2-macroglobulin, a physiological regulator of proteinase activity. In A. J. Barrett (Ed.), *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues* (pp. 663–696). Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press.
- Sugino, M., Imamura, S., Mulenga, A., Nakajima, M., Tsuda, A., Ohashi, K., & Onuma, M. (2003). A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick Haemaphysalis longicornis; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. *Vaccine*, 21, 2844–2851.

- Vasta, G. R., & Marchlonis, J. J. (1983). Humoral recognition factors in the arthropoda. The specificity of chelicerate serum lectins. *American zoology*, 23, 157–171.
- Vey, A. (1993). Humoral encapsulation. *Insect immunity*, 47–58.
- Volf, P., Horák, P. a kol. (2007). *Paraziti a jejich biologie* (p. 393). Praha: Triton.
- Whisstock, J. C., Bottomley, S. P., Bird, P. I., Pike, R. N., & Coughlin, P. (2005). Serpins 2005 - fun between the beta-sheets. Meeting report based upon presentations made at the 4th International Symposium on Serpin Structure, Function and Biology (Cairns, Australia). *The FEBS journal*, 272(19), 4868–73
- Willadsen, P. (2004). Anti-tick vaccines. *Parasitology*, 129 Suppl, 367–387.
- Willadsen, P., & Kemp, D. H. (1988). Vaccination with “concealed” antigens for tick control. *Parasitology today (Personal ed.)*, 4, 196–198.
- Yu, Y., Cao, J., Zhou, Y., Zhang, H., & Zhou, J. (2013). Isolation and characterization of two novel serpins from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Ticks and tick-borne diseases*, 4, 297–303.
- Zhou, J., Ueda, M., Umemiya, R., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Xuan, X., & Fujisaki, K. (2006). A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36(7), 527–35.
- Zou, Z., & Jiang, H. (2005). *Manduca sexta* serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP8. cDNA cloning, protein expression, inhibition kinetics, and function elucidation. *The Journal of biological chemistry*, 280, 14341–14348.

Online databáze:

predikce signálního peptidu a 3D struktury: www.cbs.dtu.dk

predikce izoelektrického bodu: www.isoelectric.ovh.org

predikce funkce proteinu: aps.unmc.edu

predikce míst glykosylace: www.nottingham.ac.uk