

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY

KATEDRA MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE



**Experimentální vakcinace králíků rekombinantními trávicími
peptidázami klíštěte *Ixodes ricinus***

Bc. PETR FRANTA

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Zdeněk Franta

2011

Diplomová práce

Franta P., 2011: Experimentální vakcinace králíků rekombinantními trávicími peptidázami klíštěte *Ixodes ricinus*. [Experimental vaccinations of rabbits with recombinant digestive peptidases of the tick *Ixodes ricinus*, Diploma thesis, in Czech]-37p , Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, the Czech Republic.

Annotation: Blood-feeding and digestion are crucial for the tick reproduction because they provide nutrients for anabolic processes such as vitellogenesis, molting and eggs production. Digestion in ticks is mediated by a network of cysteine and aspartic peptidases. Therefore, tick digestive peptidases could be a relevant anti-tick vaccine candidates. This thesis focuses on experimental vaccination of rabbits with recombinant digestive peptidases from the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*.

Tato práce byla financována z grantu GAAVČR č. IAA600960910 (2009-2012).

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

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

V Českých Budějovicích 15. prosince 2011:

Poděkování:

Chci poděkovat panu Petru Kopáčkovi za odborné vedení mé práce v laboratoři, cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat Zdeňkovi Frantovi za pečlivé vedení mé diplomové práce a ochotu mi kdykoliv pomoci. Dále děkuji Janu Erhartovi za pomoc při manipulaci s králíky a klišťaty, Janě Šlancarové za pomoc se statistickými výsledky, Honzovi, Danovi a ostatním lidem v naší laboratoři za skvělou atmosféru na pracovišti. Mnohokrát děkuji svým rodičům za obrovskou trpělivost a podporu při mém studiu. Nemalý dík patří i všem mým přátelům za morální podporu, které se mi od nich dostává.

Obsah:

1. Úvod	1
1.1 Klíšťata.....	1
1.2 Regulace klíšťat.....	1
1.2.1 Akaricidy.....	2
1.2.2 Genetický přístup.....	2
1.2.3 Vakcinace.....	2
1.2.4 Biologické agens.....	5
1.2.5 Integrovaný přístup.....	6
1.3 Modelový organizmus.....	6
1.4 Střevo klíštěte.....	7
1.5 Sání krve.....	8
2. Cíle práce	10
3. Materiál a metody	11
3.1 Navržení primerů a amplifikace genu IrCD (PCR).....	11
3.2 Gelová elektroforéza.....	11
3.3 DNA klonování	11
3.4 Transformace do expresních buněk <i>E. coli</i>	12
3.5 SDS-PAGE (polyakrylamidová elektroforéza).....	12
3.6 Izolace inkuzních tělísek.....	12
3.7 Purifikace proteinu.....	13
3.8 Renaturace proteinu.....	13
3.9 Imunizace králíků rekombinantními peptidázami.....	13
3.10 Strojní králíků a aplikace klíšťat.....	14
3.11 Statistické vyhodnocení účinnosti vakcinace.....	14
3.12 Izolace imunoglobulinové frakce z králíčího séra.....	14
3.13 Detekce a určení titru protilátek v králíčím séru.....	15
4. Výsledky	16

4.1	Amplifikace genu pro IrCD	16
4.2	Expresse rekombinantních peptidáz	16
4.3	Imunizace králíků	19
4.4	Strojení králíků	20
4.5	Statistické vyhodnocení imunizací	21
4.6	Identifikace a určení titru protilátek v králičím séru	25
5.	Diskuze	29
6.	Literatura	31

1. Úvod

1.1 Klíšťata

Klíšťata jsou hematofágní ektoparazitě řadící se do podtřídy Acari, řádu Parasitiformes a podřádu Ixodida. Jejich rozšíření je celosvětové od arktických až po tropické oblasti (de la Fuente a Kocan, 2006).

Dosud je popsáno 879 druhů těchto roztočů, kteří parazitují na suchozemských obratlovcích, včetně obojživelníků, plazů, ptáků a savců. Tyto druhy se dále dělí do tří tzv. rodin (Nava et al., 2009):

1) Argasidae (186 druhů)

2) Ixodidae (692 druhů)

3) Nuttalliellidae (1 druh)

Klíšťata přenášejí patogeny ovlivňující zdraví zvířat a lidí (Parola a Raoult, 2001). Například *Ixodes* spp. je vektorem hned několika lidských patogenů (*Borrelia*, *Anaplasma*, *Coxiella*, *Francisella*, *Rickettsia* a *Babesia* spp.). Klíšťe *Rhipicephalus(Boophilus) microplus* má negativní ekonomický dopad v subtropických a tropických oblastech světa, kde skot napadený tímto parazitem trpí úbytkem váhy a nižší produkcí mléka. Zároveň je přenašečem patogenů způsobujících babéziózu (*B. bovis* a *B. bigemina*) a anaplazmózu (*A. marginale*) (Peter et al., 2005).

1.2 Regulace klíšťat v přírodě

Regulace klíšťat je problematika, kterou se věda zabývá již více než století (Sonenshine et al., 2006), protože tito členovci mají velmi málo přirozených nepřátel. Zároveň je to jeden z kritických bodů pro kontrolu patogenů přenášených klíšťaty (Willadsen, 2006). V současnosti existuje několik přístupů pro kontrolu populací klíšťat:

1) chemické akaricidy

2) genetika

3) vakcinace

4) biologické agens

5) integrovaný přístup

1.2.1 Akaricidy

V dnešní době je regulace klíšťat založená hlavně na používání akaricidů, nicméně jejich přílišné užívání má mnoho negativních následků.

Za prvé se u klíšťat velice brzy objevuje rezistence na většinu vyvinutých látek. Ta je schopná se v populaci udržet po mnoho let. U zemědělských plodin se tento problém řeší častou obměnou jednotlivých chemikálií, nicméně u klíšťat nebyla tato metoda zatím zkoušena.

Za druhé jsou tu obavy při používání jakýchkoliv chemických látek kvůli jejich dopadu na životní prostředí a zároveň jejich možné přítomnosti v potravinách. Navíc jsou nově vyvinuté látky podstatně dražší než jejich předchůdci, protože na jejich výzkum je vynakládáno mnohem víc úsilí (Willadsen, 2004).

1.2.2 Genetický přístup

Geneticky rezistentní zvířata, neboli zvířata vykazující dědičnou schopnost být imunologicky rezistentní na sání klíštěte, jsou jednou z důležitých komponent při regulaci klíšťat. Jako příklad si můžeme uvést klíště *R. microplusa* patogeny, které přenáší. Bylo dokázáno, že *Bos indicus* a jejich kříženci jsou schopnější přežít nákazu *Babesia bovis* a *Babesiabigemina* než *Bos taurus*, ale zůstávají náchylní k *A. marginale* (Bock et al., 1997, 1999).

Hlavním problémem u této strategie bývá, že při šlechtění rezistentního skotu je těžké udržet produktivní geny, jako např. geny pro zvýšenou produkci mléka.

1.2.3 Vakcinace

Vakcinace homogenáty klíšťat, slinnými žlázami či jejich extrakty a klíštěcími orgány indukují imunitní odpověď při sání klíštěte. (Willadsen, 1980, 1997; Willadsen a Billingsley, 1997; Pruett, 1999; Willadsen a Jongejan, 1999).

Vakcíny mají na rozdíl od pesticidů velký potenciál stát se nekontaminující, dlouhodobě udržitelnou a levnou technologií, která je aplikovatelná širokému spektru hostitelů. Na rozdíl

od pesticidů, k jejichž výrobě je potřeba mnoho drahých účelových zařízení, stačí při výrobě vakcín jednoduché metody jako jsou např. fermentery. Další nepopiratelnou výhodou oproti pesticidům je, že se očekává mnohem menší šance výskytu rezistence u klíšťat než v případě pesticidů. Existuje několik příkladů, kdy bodová mutace v cílečné molekule stačila, aby se pesticid stal neúčinným (Morgan et al., 2009). U vakcín se tato situace zdá méně pravděpodobnou, jelikož protilátky většinou reagují s několika epitopy na jediném proteinovém antigenu (Willadsen, 2004).

Produkce vakcín je v dnešní době limitována úspěšnou identifikací opravdu efektivních antigenů a jejich expresí.

V zásadě můžeme volit mezi dvěma typy antigenů: exponovanými a skrytými.

Exponované antigeny

Tyto antigeny jsou prezentovány po celou dobu sání klíštěte. Běžně jsou to proteiny a peptidy exprimované ve slinných žlázách. V místě sání jsou potom pohlceny dendritickými buňkami, které je zpracují a prezentují T-lymfocytům. Ty pak indukují buněčnou nebo protilátkovou imunitní odpověď. Když se pak klíště přisaje a sekretuje molekuly obsahující exponovaný antigen, hostitel reaguje zvýšenou imunitní reakcí. Klíšťata, stejně jako všichni hematofágní členovci, produkují ve slinných žlázách obrovskou škálu bioaktivních molekul (z nichž mnoho jsou proteiny a peptidy) (Brossard a Wikel, 2004). Tyto molekuly jsou sekretovány ve slinách, aby potlačily hemostatické, zánětlivé a imunitní mechanismy, které by jinak parazitovi bránily v sání krve (Nuttall et al., 2006).

Několik exponovaných antigenů již bylo exprimováno (**Tab.č.1**), nicméně ani jeden z těchto rekombinantů není dosud vyráběn jako vakcína.

Tab.č.1: Exponované antigeny vyhodnocené jako potenciální rekombinantní vakcíny.

Antigen	Druh	Poznámka	Reference
Calreticulin	<i>Amblyoma americanum</i> , <i>Dermacentor variabilis</i> , <i>R. microplus</i>	Málo imunogenní u skotu	Jaworski et al., 1995 Ferreira et al., 2002
Immunoglobulin-binding protein	<i>R. appendiculatus</i>	Samčí protein; malý efekt na samice	Wang et al., 1998
Histamine-binding protein	<i>R. appendiculatus</i>	Nepříznivá reakce u morčat	Paesen et al., 1999
P29	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Kolagen-like; efektivní proti všem stádiím	Mulenga et al., 1999
HL34	<i>H. longicornis</i>	Protein slin. žláz; negativní efekt na klíšťatech sajících králících	Tsuda et al., 2001
64 TRPs	<i>R. appendiculatus</i> <i>I. ricinus</i>	Cross-reaguje se skrytými antigeny; ovlivňuje více druhů klíšťat; blokuje přenos patogenů	Trimnell et al., 2002 Trimnell et al., 2005 Labuda et al., 2006

Skryté antigeny

Skryté antigeny se normálně nedostávají do kontaktu s hostitelovými imunitními mechanismy (Willadsen a Kemp, 1988). Typickými zástupci jsou například antigeny ve stěně střeva. Ty jsou schopny reagovat s imunoglobuliny, které jsou nasáty společně s krví hostitele. Nicméně jakýkoliv antigen, jenž není běžně prezentován hostiteli, je skrytý a potenciální kandidát pro vývoj vakcíny, pokud splňuje tyto podmínky:

- 1) je schopen se setkat s imunoglobuliny putující do hemolymfy (nebo střeva)
- 2) je spojen s nějakou životně důležitou fyziologickou funkcí klíštěte

Úskalím tohoto druhu antigenů je potřeba opakovaných imunizací hostitelů, abychom udrželi vysoké titry protilátek. Nicméně výhodou je menší pravděpodobnost, že si klíšťata vyvinou mechanismus, kterým se efektivně vyhnou hostitelovu imunitnímu systému, jako se tomu tak stalo u některých exponovaných antigenů (de la Fuente a Kocan, 2006).

Tab.č.2: Skryté antigeny vyhodnocené jako rekombinantní vakcíny.

Antigen	Druh	Poznámka	Reference
Bm86	<i>R. microplus</i>	Komerční vakcína TickGARD	Willadsen et al., 1995
Bm91	<i>R. microplus</i>	Peptidáza; zvyšuje účinnost Bm86	Willadsen et al., 1996
Bm95	<i>R. microplus</i>	Varianta Bm86 užitá v GAVAC vakcíně	Garcia et al., 2000
HLS1	<i>H. longicornis</i>	Serpin; efekt u nymf	Sugino et al., 2003
HLS2	<i>H. longicornis</i>	Serpin; efekt u dospělců a nymf	Imamura et al., 2005
4D8 (Subolesin)	<i>I. scapularis</i>	Efekt u dospělců na ovcích	Almazan et al., 2005
Ferritin2	<i>I. ricinus</i> <i>R. microplus</i>		Hajdušek et al., 2010

1.2.4 Biologické agens

Myšlenka použít biologické agens k regulaci klíšťat je velmi přitažlivá, i když existují praktické nedostatky, které je ještě potřeba vyřešit. Jsou známé organismy, které jsou pro klíšťata patogenní nebo klíšťata loví (Samish a Rehacek, 1999). Nicméně vědci se stále snaží v laboratorních podmínkách najít organismy schopné klíště zabít. Jejich pozornost se ubírá k entomofágním houbám rodu *Beauveria* a *Metarhizium* (Frazzon et al., 2000; Gindin et al., 2002; Benjamin et al., 2002). Avšak zatím stále nebyla vyřešena úskalí pro praktické využití jakou jsou výroba, distribuce a stabilita těchto živých organismů na skotu.

1.2.5 Integrovaný přístup

Tento přístup zahrnuje systematickou aplikaci dvou či více technologií k regulaci populací parazitů, kteří nepříznivě ovlivňují své hostitele (Bram, 1994; de Castro, 1997). Cílem je regulace parazitů za dlouhodobě udržitelných, k přírodnímu prostředí šetrnějších a levnějších podmínek.

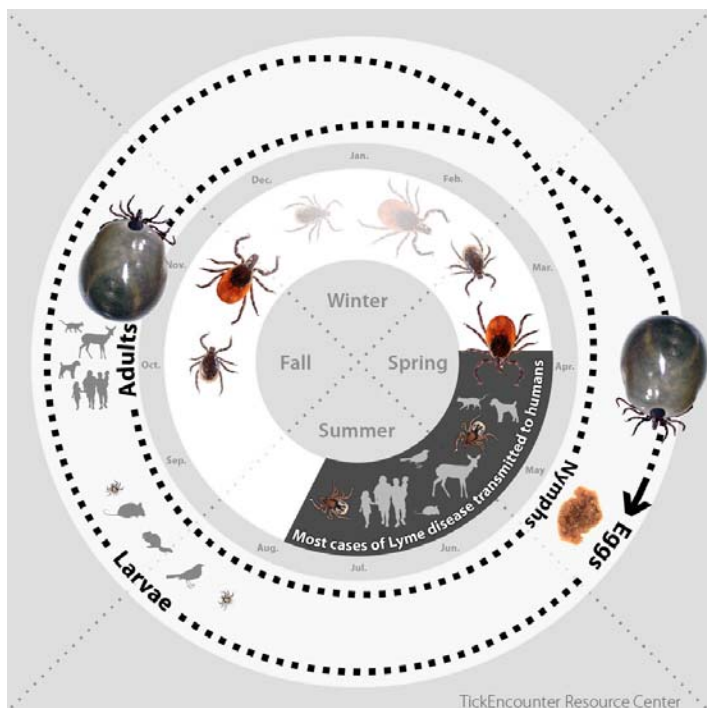
V Austrálii (Willadsen a Kemp, 1999), Mexiku (de la Fuente, 1999) a na Kubě (Redondo et al., 1999) se používá vakcína v kombinaci s akaricidy, kdy jsou akaricidy použity v první fázi imunizace, než si hostitelé vyrobí dostatek protilátek.

1.3 Modelový organismus

Ixodes ricinus je krev sající roztoč z čeledi Ixodidae. Můžeme se s ním setkat v mírném pásmu Evropy a Asie, ale i v severní Africe. Klíště preferuje teplé vlhké biotopy, ideální jsou listnaté až smíšené lesy s dostatečným podrostem.

Klíště během svého životního cyklu, který trvá 2-3 roky, prochází čtyřmi vývojovými stádii (vajíčko, larva, nymfa, dospělec) a každé stádium saje pouze jednou a na jiném hostiteli. Po nasátí následuje uvolnění z hostitele, svlékání a metamorfóza v následující stádium (u larev a nymf), v případě oplodněné samice dochází k naklazení velkého počtu vajíček a posléze k smrti.

Mezi nejzávažnější patogeny přenášené klíštětem *I. ricinus* patří spirochéta *Borrelia sensu lato*, způsobující Lymeskou boreliózu a virus klíšťové encefalidity (Nutall, 1999).



Obr.č.1: Životní cyklus klíštěte *I. ricinus*. Převzato z www.tickencounter.org.

1.4 Střevo klíštěte

Střevo je největším orgánem klíštěte. Jeho hlavními úlohami v životě těchto členovců jsou skladování a trávení nasáté krve. Zároveň tvoří první rozhraní, kde dochází k interakci vektor-patogen. Přenos těchto patogenů je úzce spjat se sáním krve (Fikrig a Narasimhan., 2006). S výjimkou intralumenální hemolýzy probíhá degradace složek krve intracelulárně (tzv. heterofágie) (Balashov, 1972). Tento typ trávení je výjimečný oproti krev sajícímu hmyzu, kde k trávení dochází v lumen střeva.

Střevní epitel klíšťat se skládá ze dvou základních typů buněk:

- a) Nediferenciované buňky (UDC)
- b) Diferenciované trávicí buňky (DGC)

UDC buňky fungují jako kmenové buňky, ze kterých se během počáteční fáze sání stávají DGC (Coons et al., 1986). DGC buňky jsou na lumenální straně pokryty mikroklyky a obsahují velké množství endosomů a residuálních tělísek (hemosomů).

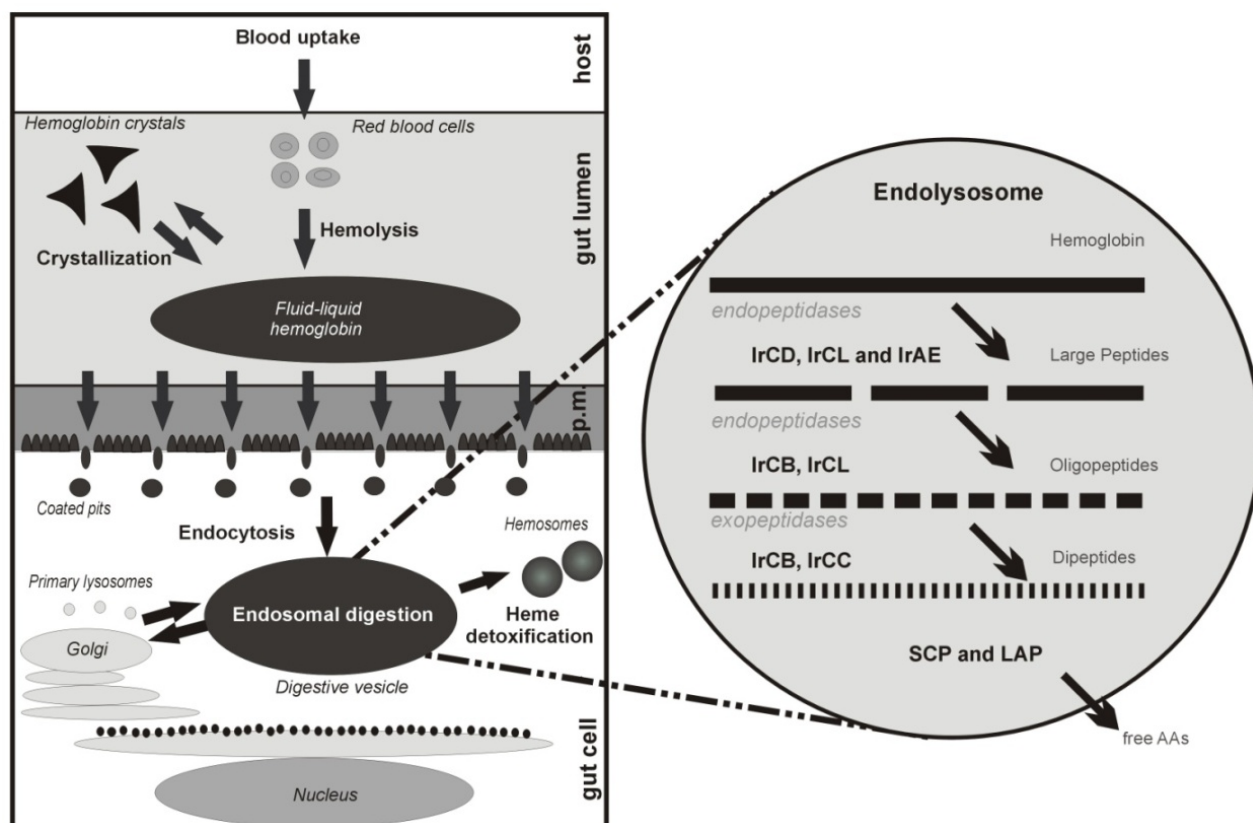
1.5 Sání krve

Sání a trávení krve jsou nezbytné aktivity klíštěte. Krev je bohatým zdrojem proteinů a živin pro všechny anabolické procesy (Grandjean, 1984). Hlavní trávenou složkou krve je hemoglobin. Trávení hemoglobinu je u klíšťat, narozdíl od krev sajícího hmyzu, který využívá k proteolýze serinové proteázy, zprostředkováno souborem cysteinových a aspartátových proteáz (Sojka et al., 2008).

V současné době je trávení hostitelských proteinů nejlépe popsáno u klíštěte *I. ricinus*, kde byly ve střevě identifikovány čtyři cysteinové proteázy - katepsin B (IrCB), L (IrCL), C (IrCC), asparaginylová endopeptidáza (IrAE) a jedna aspartátová proteáza - katepsin D (IrCD) (Sojka et al., 2008; Horn et al., 2009). Identifikovaný systém proteáz je velmi podobný proteolytickým enzymům podílejícím se na trávení hostitelské krve u fylogeneticky vzdálených organismů jako jsou např. nematoda (Williamson et al., 2003), schistosomy (Caffrey et al., 2004) nebo malarické *Plasmodium* (Rosenthal, 2004).

Trávení hemoglobinu

Degradace hemoglobinu probíhá optimálně v kyselém prostředí (pH 3,5-4,5). Hemoglobin je nejprve naštěpen na velké fragmenty (8-11 kDa) katepsinem D podpořeným endopeptidázovými aktivitami legumainu a katepsinu L. V další fázi se uplatňuje endopeptidázová aktivita katepsinu B, který hydrolyzuje velké fragmenty na menší (3-5 kDa). Celý proces je ukončen naštěpením malých fragmentů na dipeptidy pomocí exodipeptidázové aktivity katepsinu C (z N-konce) a katepsinu B (z C-konce) (Horn et al., 2009).



Obr.č.2: Schéma trávení hemoglobinu klíštěte *I. ricinus* (převzato z Sojka et al., 2011).

Detoxifikace hemu

Jedním z problémů, se kterým se musí klíšťata a ostatní krev sající paraziti vypořádat, je fakt, že při trávení hemoglobinu vzniká obrovské množství hemu. Hem dokáže katalyzovat tvorbu kyslíkových radikálů (Lara et al., 2003) a navíc je schopen se asociovat s fosfolipidovými membránami a tím narušit jejich strukturu (Schmitt et al., 1993). Krev sající organismy si vyvinuly několik strategií, jak hem neutralizovat. Například *Schistosoma mansoni* brání biokrytalizaci hemu do nerozpustných agregátů nazývaných hemozoiny (Oliveira et al., 2007). Klíšťata hem shlukují do nekrytalických agregátů a poté ukládají do vezikul nazývaných hemosomy (Lara et al., 2003), popř. residuální tělíska (Sonenshine, 1991).

2. Cíle práce

Příprava rekombinačních peptidáz – katepsin B, L, C, D a asparaginylovou endopeptidázu v dostatečném množství pro provedení vakcinačních experimentů.

Provést vakcinaci králíků směsí těchto peptidáz a vyhodnotit účinnost vakcinace na mortalitu klíšťat během sání, úspěšnost nasátí (váha po nasátí), kladení vajec a líhivost larev.

Při pozitivním efektu vakcinace kompletní směsí pokračovat dále ve vakcinacích s jednotlivými peptidázami s cílem nalézt co nejjednodušší a nejúčinnější kombinaci pro eventuální vývoj komerční „proti-klíštěcí“ vakcíny.

3. Materiál a metody

3.1 Navržení primerů a amplifikace genu IrCD (PCR)

Podle známé sekvence IrCD (GenBank: EF428204) byly navrženy gen-specifické primery (**Tab.č.3**) vhodné pro zaklonování do expresního vektoru. Jako templát pro amplifikaci byla použita cDNA ze střevní tkáně samic *I. ricinus* v 6. dni sání. PCR produkty byly izolovány z 1% agarózového gelu pomocí QIAquick[®] Gel Extraction Kitu (QIAGEN).

3.2 Gelová elektroforéza

Fragmenty DNA byly rozděleny na 1% agarózovém gelu ve stejnosměrném elektrickém poli (100 V) po dobu 30 min. Gel a elektrody byly ponořeny v TAE pufru (40mM Tris/HCl, 20mM kys. Octová, 1mM EDTA)

3.3 DNA klonování

PCR amplikony byly směrově zaklonovány do pET 101/D-TOPO[®] vektoru podle návodu k Champion[™] pET Directional TOPO[®] kitu (Invitrogen). Konstrukty byly transformovány do One Shot TOPO TA Cloning[®] TOP10 chemicky kompetentních *E. coli* buněk (Invitrogen). Buňky byly vysety na plotny se selektivním antibiotikem (ampicilin 50μg/ml). Z vybraných kolonií byly připraveny miniprepy izolovány plasmidy pomocí High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche).

Byla provedena kontrolní PCR reakce (primery viz. **Tab.č.3**) a pozitivní plasmidy byly sekvenovány v obou směrech za použití T7 a T7R primerů (Invitrogen) (**Tab.č.3**).

Plasmidy byly sekvenovány v laboratoři genomiky (Biologické centrum AVČR, v.v.i., České Budějovice) sekvenátorem Applied Biosystems 3130x1.

Tab.č.3: Použité primery.

Metoda	Primer	Sekvence
Amplifikace genu	CathD-pET101-S	5'- CAC CAT GGC TTT CAG GAT CCC GCT CAC G -3'
	CathD-pET101-AS	5'- GGC AAC TTC CGC GAA GCC -3'
Kontrolní PCR	CathD-pET101-S	5'- CAC CAT GGC TTT CAG GAT CCC GCT CAC G -3'
	T7 Reverse	5'- TAG TAA TTG CTC AGC GGT GG -3'
Sekvenování	T7 Forward	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
	T7 Reverse	5'- TAG TAA TTG CTC AGC GGT GG -3'

3.4 Transformace do expresních buněk *E.coli*

Sekvenací ověřené konstrukty byly transformovány do BL21 Star™ (DE3) One shot® chemicky kompetentních *E. coli* buněk dle protokolu Champion™ pET Expression System (Invitrogen).

Byla provedena exprese proteinu. Do 1 litru LB média s 1% glukózou bylo přidáno 10 ml předem připravené kultury.

V přítomnosti glukózy dochází k zablokování lac operonu, počáteční exprese rekombinantního proteinu je velmi pomalá a buňky se množí.

Po dosažení OD₆₀₀ 0,5-0,8 byla kultura centrifugována při 3500 g / 10 min, resuspendována v 1 litru LB média bez glukózy a indukována IPTG o konečné koncentraci 0,5mM.

3.5 SDS-PAGE (polyakrylamidová elektroforéza)

Polyakrylamidová elektroforéza probíhá ve stejnosměrném elektrickém poli ($U = 100-200$ V) v elektroforetickém pufru (25mM Tris, 192mM glycin, 0,1% SDS). Vzorky byly ředěny v redukcujícím vzorkovém pufru (250mM Tris/HCl, 30% glycerol, 5% merkaptioetanol, 0,02% bromfenolová modř, 10% SDS) s dithiotreitem v poměru 4:1. Před vlastní elektroforézou byly vzorky denaturovány varem. Vzorky byly poté nanášeny na gradientový polyakrylamidový gel (5-17%) spolu s markerem molekulových hmotností LMW (GE Healthcare). Po skončení elektroforézy byly gely barveny v Coomassie brilliant blue R-250.

3.6 Izolace inkluzních tělísek

Bakteriální pelet byl resuspendován v resuspendačním pufru (20mM Tris-Cl, pH 8), sonikován po dobu 1 minuty a poté stočen při 10 000 g / 10 min / 4°C. Pelet byl dále resuspendován v izolačním pufru (2M močovina, 20mM Tris-Cl, 0,5M NaCl, 10mM imidazol, 1mM 2-merkaptioetanol, 2% Triton X-100, pH 8), sonikován 1 minutu a centrifugován 10 minut při 10 000 g a 4°C. Tento krok byl proveden celkem třikrát. V posledním kroku byl pelet resuspendován v solubilizačním pufru (6M guanidin hydrochlorid, 20mM Tris-Cl, 0,5M NaCl, 5mM imidazol, 1mM 2-merkaptioetanol, pH 8) a byl míchán na magnetickém míchadle při laboratorní teplotě přes noc. Rozpuštěný pelet byl centrifugován při 10 000 g / 15 min / 4°C a supernatant byl filtrován přes 0,22 µm filtr Millex® GP (Millipore).

3.7 Purifikace proteinu

Fúzní proteiny s His-tagem na N-konci (IrAE, IrCC, IrCB, IrCL) a na C-konci (IrCD) byly purifikovány z rozpuštěných inkluzních tělísek na 5 ml chelatační koloně (HiTrap IMAC FF GE Healthcare) s navázanými Co^{2+} ionty. Kolona byla ekvilibrována pufrům A (8M močovina, 0,5M NaCl, 50mM Tris, pH 8,5). Protein byl eluován lineárním gradientem 0,5M pufru B (8M močovina, 0,5M imidazol, 0,5M NaCl, 50mM Tris/HCl, pH 8,5). Vybrané frakce byly ověřeny pomocí SDS-PAGE.

3.8 Renaturace proteinu

Koncentrace purifikovaných proteinů byla změřena Bradford metodou a poté vyředěny pufrům A na konečný objem 10 ml o koncentraci 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Protein byl dialyzován v několika roztocích (**Tab.č.4**), 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.

Tab.č.4: Složení dialyzačních roztoků při renaturaci rekombinantního proteinu

1. roztok	2. roztok	3. roztok	4. roztok	5. roztok
4M močovina 150mM NaCl 50mM Tris-Cl 20% Glycerol 20mM merkaptioetanol	2M močovina 150mM NaCl 50mM Tris-Cl 20% Glycerol 20mM merkaptioetanol	1M močovina 150mM NaCl 50mM Tris-Cl 20% Glycerol 20mM merkaptioetanol	150mM NaCl 50mM Tris-Cl 20% Glycerol 20mM merkaptioetanol	150mM NaCl 50mM Tris-Cl 10mM Na_2HPO_4 • 2 H_2O 2mM KH_2PO_4 3mM KCl
V= 0,5 L, pH 8,5	V= 0,5 L, pH 8,5	V= 0,5 L, pH 8,5	V= 0,5 L, pH 8,5	V=0,5L, pH8,5

3.9 Imunizace králíků rekombinantními peptidázami

Byly imunizovány tři řady králíků po čtyřech jedincích. V každé řadě byl jeden králík určen jako kontrolní a byl injikován sterilním PBS.

První řada králíků byla imunizována směsí všech pěti peptidáz. 50 μg každé z renaturovaných rekombinantních peptidáz v PBS bylo smícháno s 500 μl nekompletního Freundova adjuvans na finální objem 1 ml a bylo subkutánně injikováno králíkům. Imunizace byla opakována čtyřikrát v 10-14ti denních intervalech.

Druhá řada byla imunizována rekombinantním IrCL a třetí rekombinantním IrCB. V obou případech bylo 100 μg IrCL popř. IrCB v PBS smícháno s 500 μl nekompletního Freundova

adjuvans na finální objem 1 ml a bylo subkutánně injikováno králíkům. Imunizace byla opakována čtyřikrát v 10-14ti denních intervalech.

Pokusní králíci byli dodáni firmou Velaz s.r.o. (www.velaz.cz). Jednalo se o plemena Novozélandský bílý králík a Činčila velká.

3.10 Strojení králíků a aplikace klíšťat

Novozélandským bílým králíkům byly na uši připevněny návleky, do kterých bylo přidáno po 25 samicích a 25 samců klíštěte *I. ricinus*. Činčilám velkým byly na zadní končetiny připevněny tzv. kloboučky (**viz obr.č.7**) do kterých bylo přidáno po 25 samicích a 25 samcích.

Klíšťata byla nechána na hostitelích do plného nasátí (samovolného puštění z hostitele) a poté byla zvážena, rozdělena po jednom do zkumavek a ponechána v inkubátoru při 24 °C a 90 % relativní vlhkosti. Dále byla sledována délka sání, úmrtnost klíšťat při a po sání, velikost jejich snůšky a líhivost larev oproti kontrole.

Po odpadnutí všech klíšťat byla králíkům odebrána krev, která se nechala stát přes noc při 4°C a poté bylo centrifugací odděleno sérum.

3.11 Statistické vyhodnocení účinnosti vakcinace

Pro statistické vyhodnocení vah nasátých klíšťat byl použit program STATISTICA 10. Váhy klíšťat byly vyhodnocovány t-testem při 95% hladině významnosti, kdy byla porovnávána klíšťata jednotlivých imunizovaných králíků s klíšťaty sajícími na kontrolním králíkovi.

Pro vyhodnocení závislosti velikosti snůšek na váze klíšťat popř. na imunizaci byla použita dvoucestná analýza variance v programu R.

3.12 Izolace imunoglobulinové frakce z králičího séra

10 ml králičího séra bylo smícháno s 20 ml 50mM Na-acetátového pufru (pH 5,2). Za stálého míchání na magnetickém míchadle se v 3 minutových intervalech přidávaly dávky kyseliny kaprylové (celkem 10 dávek po 75 µl). Po 90 minutách míchání byla suspenze

centrifugována 10 min při 5000 g, supernatant byl filtrován přes filtrační papír a dialyzován přes noc proti 2 L 5mM Na₂HPO₄, při 4°C.

3.13 Detekce a určení titru protilátek v králičím séru

Western blot

Rekombinantní peptidázy byly rozděleny pomocí SDS-PAGE. Po ukončení elektroforézy byl gel s membránou a filtračními papíry ekvilibrován v blotovacím pufru (25mM Tris, 192mM glycin, 0,02% SDS) s metanolem. Proteiny byly přenášeny na Polyvinyliden-fluoridovou membránu (PVDF) (Millipore) po dobu 90 min za konstantního proudu 150 mA. Po ukončení přenosu byla kontrolní část membrány obarvena v Coomasie brilliant blue R-250. Membrána byla následně inkubována 60 min v 5% roztoku mléka v PBS-Tweenu za účelem vyblokování nespecifických míst. Po promytí v PBS-Tweenu byla přidána naředěná purifikované imunoglobulinové frakce jednotlivých králíků.). Jako sekundární protilátka byla využita 1000x naředěná SwAR/Px protilátka (Sevapharma a.s.). Western blot byl vyvolán v 0,1M Tris/HCl pomocí DAB (diaminobenzidin) barvení a 0,03% peroxidu vodíku.

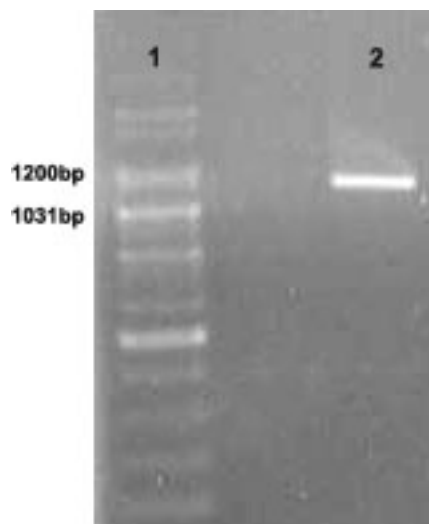
ELISA

Renaturované peptidázy byly vyředěny vazebným roztokem (15mmol Na₂CO₃, 35 mmol NaHCO₃, pH 9,6) na koncentraci 10 µg/ml a nepipetovány po 50 µl do jamek v 96-jamkovém panelu. Panel se nechal inkubovat přes noc při 4°C ve vlhké komůrce. Nespecifické vazby byly vyblokovány 200µl blokovacího pufru na jamku (5% prekolostrální telecí sérum (PTS) v PBS) a panel byl inkubován 45 minut při 37°C ve vlhké komůrce. Testovaná králičí séra byla naředěna v poměru 1:100 v ředícím roztoku (2% PTS v PBS) a nanesena do prvních jamek a vzorky byly rozředěny dvojkovou řadou. Panel byl inkubován 45 minut při 37°C ve vlhké komůrce a poté třikrát promyt v PBS-Tweenu. Jako sekundární protilátka byla použita SwAR/Px naředěna 1000x ředícím pufrům. Enzymová reakce byla vyvolána 100 µl substrátového roztoku (5 ml fosfocitrátového pufru, 2 mg o-fenylendiaminu, 2 µl 30% H₂O₂). Reakce byla po 10 minutách zastavena 2 M H₂SO₄ a byla změřena absorbance vzorků na vertikálním spektrofotometru (Biotech) při 490 nm. Za pozitivní vzorek byl považován ten, jehož absorbance byla vyšší než dvojnásobek absorbance negativní kontroly. Titr protilátky se určil jako reciproká hodnota jejího nejvyššího ředění, při kterém byla považována za pozitivní.

4. Výsledky

4.1 Amplifikace genu pro IrCD

Gen pro IrCD byl amplifikován ze střevní cDNA klíštěte *Ixodes ricinus* pomocí specifických primerů (Tab.č.3). Primery byly navrženy tak, aby zahrnovaly pouze translatovanou oblast bez signálního peptidu. Z tohoto důvodu je PCR amplicon kratší (přibližně 1086 bp), než je udávaná velikost IrCD cDNA (Sojka et al. 2008).



Obr.č.3: Amplifikace genu pro IrCD. 1–DNA ladder (GENE RULER™ 100bp DNA Ladder PLUS), 2 – IrCD

Výsledný produkt byl přečištěn, zaklonován do expresního vektoru (pET 101/D-TOPO®) a transformován do kompetentních One Shot® TOP 10 buněk. Pozitivní klony ověřeny pomocí PCR reakce.

V této práci byl klonován pouze gen pro IrCD, jelikož konstrukty pro ostatní rekombinantní peptidázy byly již klonovány v předchozích pracích – IrCC, IrCB, IrCL a IrAE, (Sojka et al., 2008).

4.2 Expese rekombinantních peptidáz

Sekvenací ověřené plazmidy byl transformován do BL21 Star™ (DE3) One shot® chemicky kompetentních *E. coli* buněk.

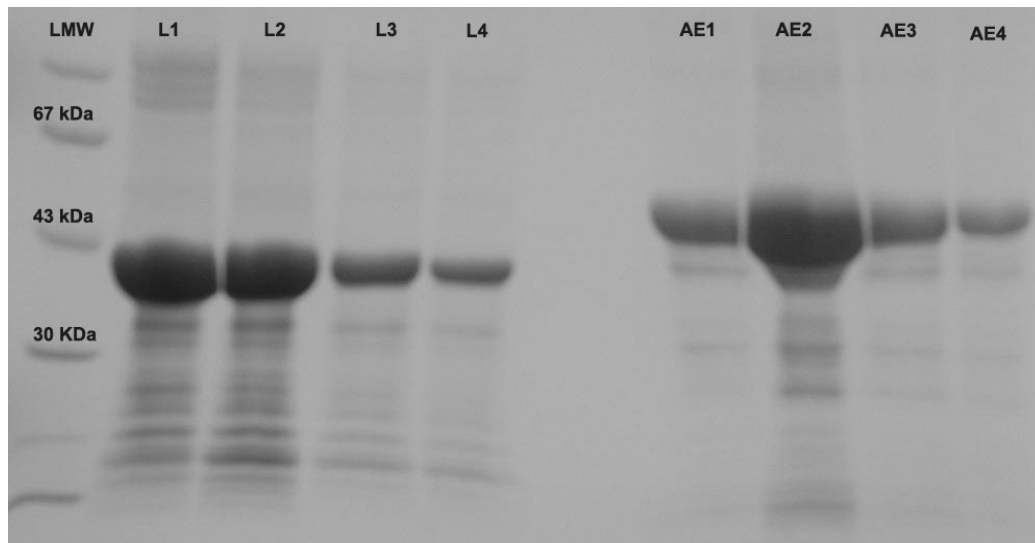
Expese peptidáz byla prováděna v 1 litru LB média s 1% glukózou. Po indukci a inkubaci byly kultury centrifugovány při 4500 g / 10 min. Pelety byly skladovány při -20°C.

Izolace inkluzních tělísek

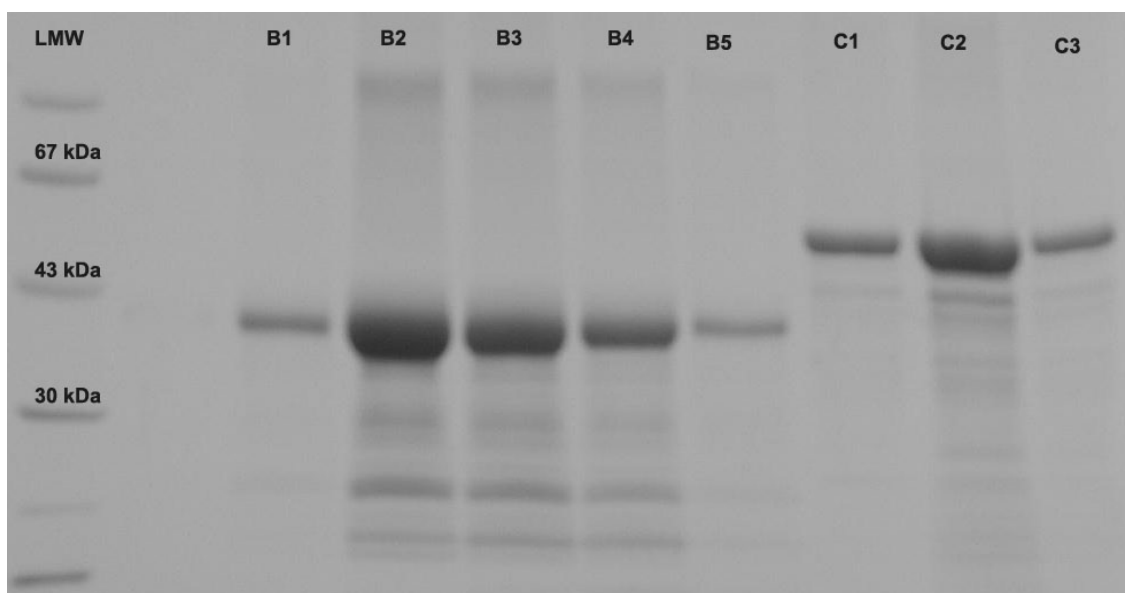
Jednotlivé pelety buněk byly rozmrazeny a resuspendovány. V prvním kroku byly odmyty rozpustné cytoplazmatické proteiny. V přítomnosti detergentu (Triton X-100) a močoviny byly ve třech krocích postupně odstraněny membránové proteiny. Inkluzní tělíska z výsledného peletu se běžně rozpouštějí v 6M guanidin hydrochloridu za laboratorní teploty na magnetickém míchadle 2-3 hodiny. Osvědčilo se nám nechat pelet míchat přes noc. Výsledkem je větší výtěžek proteinu.

Purifikace peptidáz

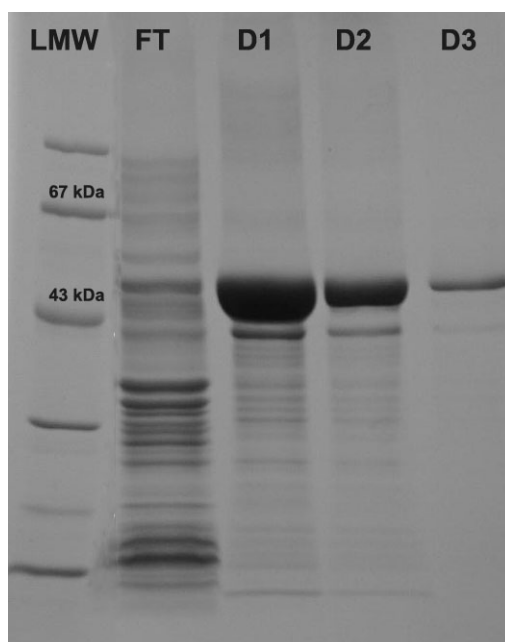
Rozpuštěná inkluzní tělíska byla dále purifikována chelatační chromatografií za přítomnosti 8M močoviny. Chelatační chromatografie využívá afinity 6xHis-tagu k Co^{2+} iontům navázaným na sefaroze. Rekombinantní proteiny byly eluovány gradientem 0,5M imidazolu. Vybrané frakce byly ověřeny pomocí SDS-PAGE (**Obr.č.4,5,6**).



Obr.č.4: Purifikace rekombinantního IrCL a IrAE na Co^{2+} koloně. LMW - marker, L1□L4 - vybrané frakce IrCL, AE1□AE4 - vybrané frakce IrAE.



Obr.č.5: Purifikace rekombinantního IrCB a IrCC na Co^{2+} koloně. LMW - marker, B1–B5 - vybrané frakce IrCB, C1–C3 - vybrané frakce IrCC.



Obr.č.6: Purifikace rekombinantního IrCD na Co^{2+} koloně. LMW - marker, FT - „flowthrough“ (proteiny, které se na kolonu nenavázaly), D1–D3 - vybrané frakce IrCD.

Ověřené frakce byly slity dohromady a byla změřena výsledná koncentrace pomocí Bradford metody a naměřené hodnoty jsou uvedeny v **Tab.č.5**.

Tab.č.5: Výtěžky jednotlivých rekombinantních peptidáz.

Peptidáza	Výtěžek z 1 litru kultury <i>E.coli</i> (mg)
IrAE	36,25
IrCB	18,7
IrCC	13,95
IrCD	18,675
IrCL	37,95

4.3 Imunizace králíků

Před vlastní imunizací byly 3 mg každé rekombinantní renaturované peptidázy převedeno do PBS pufru o pH 8,5. Renaturace zvyšuje specifitu protilátek tím, že na renaturovaném proteinu vzniknou epitopy, které mohou být shodné s epitopy na nativním proteinu.

Celkem byly provedeny tři vakcinační pokusy. Pro přehlednost při interpretaci dalších výsledků jsou jednotliví králíci a jejich vakcinace uvedeny v **Tab.č.6**.

Tab.č.6: Označení jednotlivých králíků a antigenů, kterými byli imunizováni. Ke každé skupině byl přiřazen i kontrolní neimunizovaný králík. Pozn. Králík K258 během sání uhynul, proto nebyl do dalších výsledků zahrnut.

Králík	Antigen	Králík	Antigen
K226	IrAE, IrCB, IrCC, IrCD, IrCL	K259	IrCB
K227		K260	
K229		K261	
K256	IrCL		
K257			
K258			

4.4 Strojení králíků

V prvním pokusu bylo použito plemeno Novozélandský bílý králík. Králíkům byly na uši připevněny návleky, do kterých byla přidána klíšťata. Pokusná zvířata dostala ochranný límec, aby si návleky nemohla okusovat. Bohužel bylo zjištěno, že tato varianta není optimální jak výběrem plemena, tak místem aplikace klíšťat. Králíci byli velmi neklidní, namáčeli si uši v miskách s vodou a nasátá klíšťata rozmačkávali o stěny klece, čímž celý pokus znehodnotili. Navíc byla s návleky kvůli límcům obtížná manipulace.

Proto jsme se rozhodli použít plemeno Činčila velká, kterým jsme na zadní končetiny připevnili tzv. kloboučky (**Obr.č.7**). Tito králíci se vyznačují velmi klidným chováním, a proto nebyla potřeba jim připevňovat límce, protože u nich nedocházelo k okusování kloboučků. Klíšťata navíc byla uvnitř chráněná proti mechanickému poškození.



Obr.č.7: Nastrojený králík plemena Činčila velká.

4.5 Statistické vyhodnocení imunizací

Statistické vyhodnocení vah

Po nasátí byla klíšťata roztríděna podle králíků, na kterých sála, dále byla zvážena, hodnoty zaznamenány. Váhy skupin klíšťat z jednotlivých imunizovaných králíků byly porovnávány s kontrolou pomocí t-testu v programu Statistica 10 (StatSoft, 2011). Z **Tab.č.7.** je patrné, že u králíků K227, K260 a K261 došlo u klíšťat k signifikantní redukci váhy. U králíka K227 je navíc poměrně vysoká úmrtnost klíšťat po nasátí.

Tab.č.7: Statistické vyhodnocení vah jednotlivých skupin klíšťat. Červeně jsou označeny výsledky, které byly vyhodnoceny jako signifikantní.

Králík	N	Prům. váha±SEM	Prům. vel. snůšky ^a	Nedosátá kl.	Úmrtnost (po nasátí)	t-test ^b
Směs peptidáz						
K226	49	0.2558 ± 0.012	2,48 / 3	9 z 49 (18%)	5 z 40 (12,5%)	t= 0,86,df= 84, p= 0,393
K227	49	0.2240 ± 0.012	2,42 / 3	7 z 49 (14%)	14 z 42 (33,3%)	t= 2,93, df= 86, p < 0,05
K229	43	0.2821 ± 0.01	2,64 / 3	0 z 43	1 z 43 (2,3%)	t= 0,89, df= 87, p=0,373
Kontrola	46	0.2693 ± 0.009	2,56 / 3	0 z 46	2 z 46 (4,3%)	
Cathepsin L						
K256	51	0.2918 ± 0.012	2,14/3	0 z 51	2 z 51 (3,9%)	t= 0,38, df= 94, p= 0,700
K257	46	0.2944 ± 0.011	2,23/3	0 z 46	0 z 46	t= 0,22, df= 89, p=0,820
Kontrola	45	0.2980 ± 0.009	2,18/3	0 z 45	1 z 45 (2,2%)	

Králík	N	Prům. váha±SEM	Prům. vel. snůšky ^a	Nedosátá kl.	Úmrtnost (po nasátí)	t-test ^b
Cathepsin B						
K259	52	0.3032 ± 0.007	2,78 / 3	0 z 52	0 z 52	t= 0,06, df= 98, p= 0,946
K260	46	0.2741 ± 0.009	2,34 / 3	0 z 46	0 z 46	t= 2,32, df= 92, p < 0,05
K261	49	0.2499 ± 0.008	2,28 / 3	0 z 49	1 z 49 (2%)	t= 4,63, df= 95, p < 0,05
Kontrola	48	0.3025 ± 0.007	2,83 / 3	0 z 48	0 z 48	

^aPo vykladení byly snůšky klíšťat ohodnoceny kategoricky podle velikosti (0- žádná snůška, 1- malá snůška, 2- středně malá snůška, 3- běžná snůška)

^bt – hodnota testovacího kritéria, df – stupně volnosti, p – hladina významnosti

Statistické vyhodnocení snůšek

U snůšek byly zkoumány dvě závislosti: zda je velikost snůšky ovlivněna váhou klíštěte po nasátí, a zda samotná imunizace nějakým způsobem ovlivnila velikost snůšky. Tyto závislosti byly zjištěny pomocí dvoucestné analýzy variance v programu R. Jak vyplývá z **Tab.č.8** snůšky jsou jednoznačně ovlivněny váhou klíštěte po nasátí. Výsledek ANOVA testu koreluje s výsledky t-testu a u králíků K227, K260 a K261, u kterých měla imunizace dopad na váhu klíšťat zároveň ovlivnila i velikost snůšek.

Tab.č.8: Statické vyhodnocení závislosti velikosti snůšky na váze klíšťat a účinku imunizace.

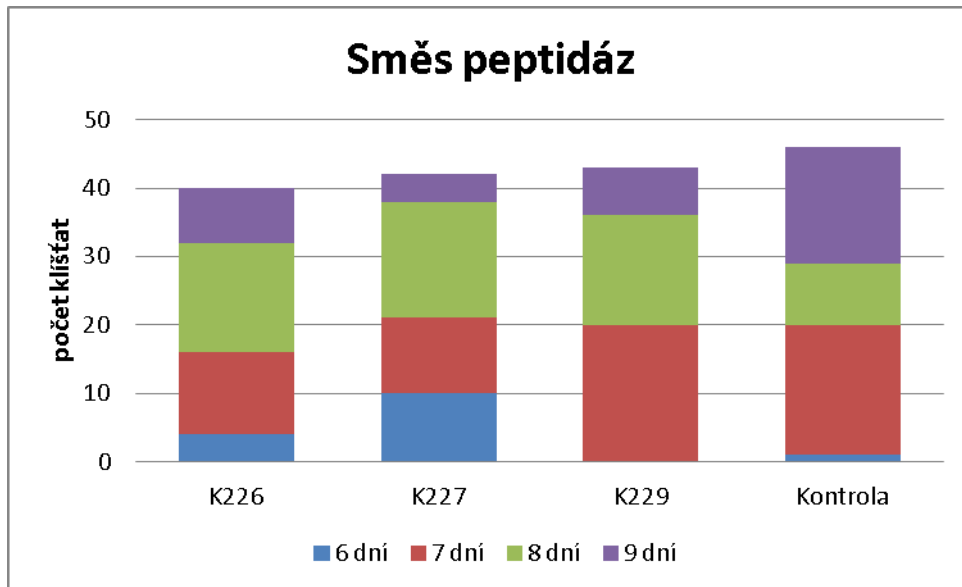
Králík	Závislost	DF	Sum Sq	Mean Sq	F	p
K226	na imunizaci	1	1,973	1,973	3,451	p= 0,0667
	na váze	1	18,91	18,91	33,075	p < 0,001

Králík	Závislost	DF	Sum Sq	Mean Sq	F	p
K227	na imunizaci	1	10,754	10,7541	11,834	p < 0,001
	na váze	1	18,867	18,8668	20,762	p < 0,001
K229	na imunizaci	1	0,056	0,0563	0,1467	p= 0,7027
	na váze	1	10,686	10,6857	27,8194	p < 0,001
K256	na imunizaci	1	0,005	0,005	0,0186	p= 0,8917
	na váze	1	46,086	46,086	167,6492	p < 0,001
K257	na imunizaci	1	0,145	0,145	0,5205	p=0,4725
	na váze	1	33,777	33,777	120,9945	p < 0,001
K259	na imunizaci	1	0,0836	0,0836	0,8432	p= 0,3608
	na váze	1	6,2461	6,2461	62,9954	p < 0,001
K260	na imunizaci	1	2,2642	2,2642	16,846	p < 0,001
	na váze	1	15,9863	15,9863	118,940	p < 0,001
K261	na imunizaci	1	0,5247	0,5247	4,1218	p < 0,001
	na váze	1	17,9705	17,97005	141,1745	p < 0,001

df- stupně volnosti; sum sq- suma čtverců; mean sq – sum sq/df; f – hodnota testovacího kritéria; p – hladina významnosti

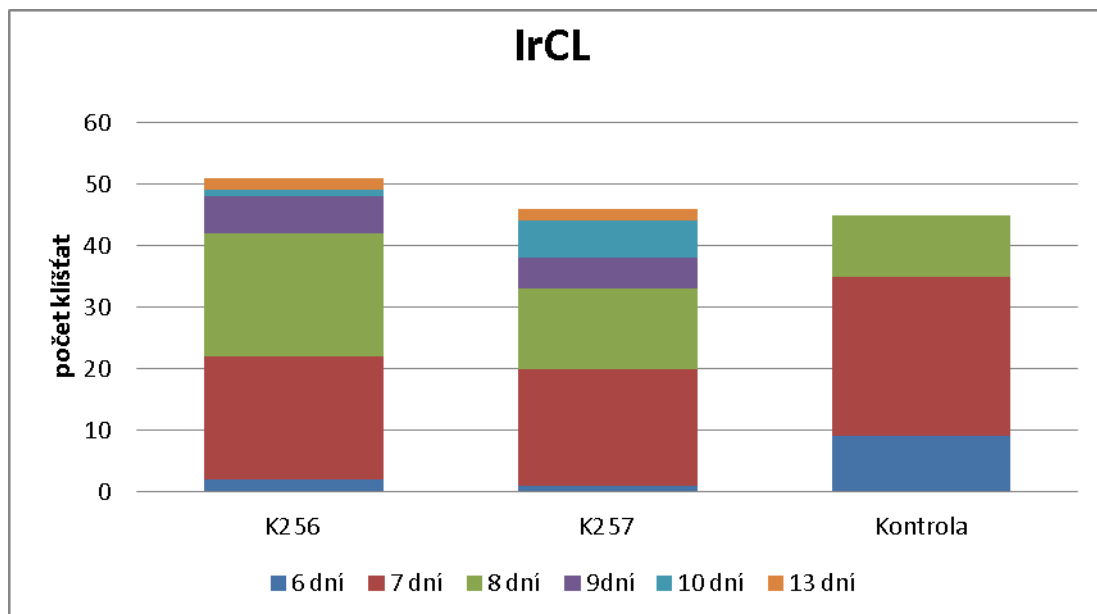
Doba sání

Dalším zkoumaným fenotypem byla délka sání klíšťat na imunizovaných králících oproti kontrolnímu. Z **Obr.č.8** je patrné že u králíků imunizovaných směsí peptidáz došlo ke zkrácení doby sání. U králíka K227 je to v průměru až o půl dne kratší sání, než u kontroly.

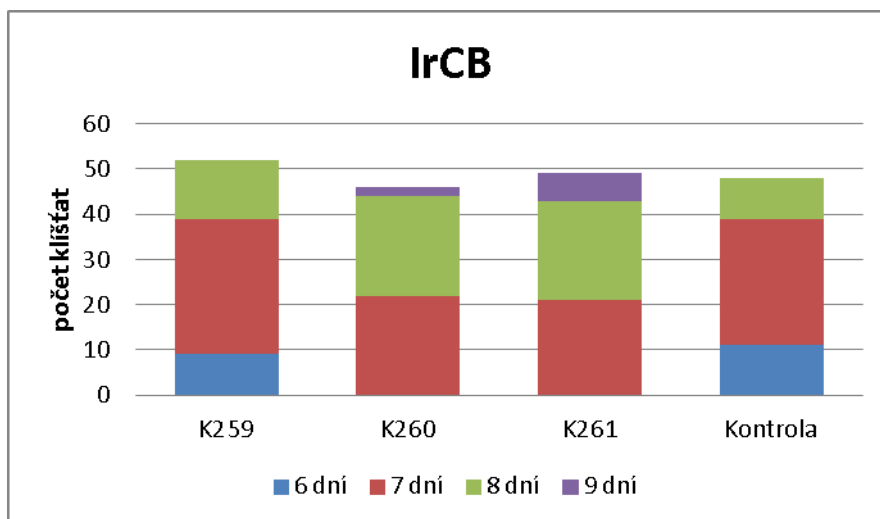


Obr.č.8: Délka sání klíšťat na králících imunizovaných směsí peptidáz.

U králíků imunizovaných IrCL (**Obr.č.9**) a IrCB (**Obr.č.10**) byl pozorován opačný trend. Klíšťata sála oproti kontrole v průměru o 0,5-1 den déle.



Obr.č.9: Délka sání klíšťat na králících imunizovaných IrCL.

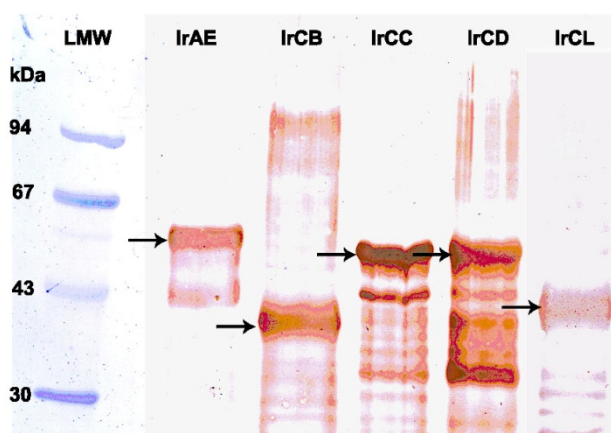


Obr.č.10: Délka sání klíšťat na králicích imunizovaných IrCB.

4.6 Identifikace a určení titru protilátek v králičím séru

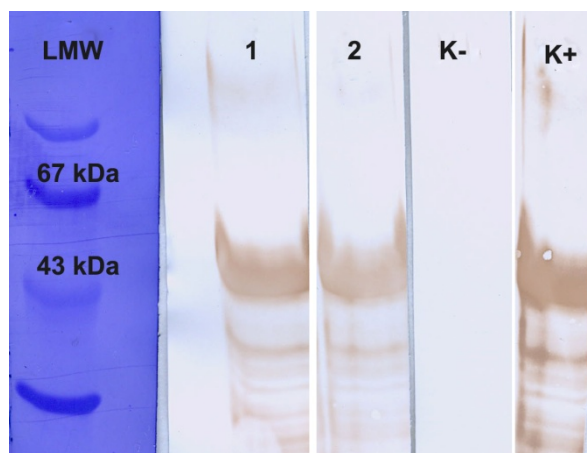
Identifikace protilátek

U králíka 227, který v pokusu vykazoval největší účinek imunizace, bylo pomocí Western blotu (**Obr.č.11**) dokázáno, že si byl schopen vytvořit protilátky proti všem antigenům, kterými byl imunizován. Pro identifikaci protilátek byly použity rekombinantní peptidázy.

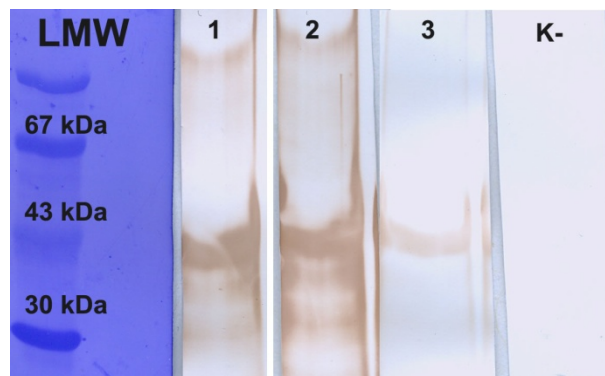


Obr.č.11: Přítomnost protilátek proti jednotlivým peptidázám v séru králíka K227.LMW - marker, primární protilátka - ředěná 1:2000, sekundární protilátka - ředěná 1:1000.

U králíků imunizovaných IrCL (**Obr.č.12**) a IrCB (**Obr.č.13**) bylo ukázáno, že v jejich séru jsou přítomny protilátky proti těmto peptidázám. Intenzita bandů na Western blotu koreluje se zjištěnou hladinou protilátek u jednotlivých králíků (**Tab.č.9**).



Obr.č.12: Přítomnost protilátek proti IrCL v séru králíků K256,257. Do každé jamky byly naneseny přibližně 2 μ g rekombinantního proteinu. LMW - marker, 1 - sérum K256 ředěné 1:2000, 2 - sérum K257 ředěné 1:2000, K(-)- králíčí preimunní sérum ředěné 1:2000, K(+)- přečištěné specifické protilátky proti IrCL ředěné 1:1000. Sekundární protilátka byla ředěná 1:1000.



Obr.č.13: Přítomnost protilátek proti IrCB v séru králíků K259, 260, 261. Do každé jamky byly naneseny přibližně 2 μ g rekombinantního proteinu. LMW - marker, 1- sérum K259 ředěné 1:5000, 2 - sérum K260 ředěné 1:2000, 3 - sérum K261 ředěné 1:2000, K(-) - králíčí neimunní sérum ředěné 1:2000. Sekundární protilátka byla ředěná 1:1000.

Určení hladiny protilátek

Pro přesné určení hladin protilátek proti jednotlivým peptidázám a pro zjištění jejich případného rozdílu mezi jednotlivými králíky byla použita metoda ELISA, **ZTab.č.9** jasně

vyplývá, že králík K227, u kterého dopadla imunizace nejlépe, měl několikanásobně vyšší hladinu IrAE. Ostatní hladiny protilátek byly u všech tří králíků srovnatelné.

U králíků imunizovaných IrCL nebyla pozorována zvýšená hladina protilátek proti katepsinu L

Králík K260, na němž měla klíšťata signifikantně nižší váhu po nasátí, vykazoval zvýšenou hladinu protilátek proti IrCB.

Tab.č.9: Určení títřů protilátek v séru jednotlivých králíků.

Králík	Peptidáza	Titr
K226	IrAE	1:25600
	IrCB	1:3200
	IrCC	1:25600
	IrCD	1:25600
	IrCL	1:12800
K227	IrAE	1:101600
	IrCB	1:3200
	IrCC	1:12800
	IrCD	1:12800
	IrCL	1:3200
K229	IrAE	1:25400
	IrCB	1:12800
	IrCC	1:6400
	IrCD	1:10800
	IrCL	1:6400

Králík	Peptidáza	Titr
K256	IrCL	1:6400
K257		1:6400
K259	IrCB	1:12800
K260		1:50800
K261		1:3200

5. Diskuze

U hematofágních bezobratlých, kromě hmyzu, je trávení založeno na mašinérii cysteinových (klan CA, CD) a aspartátových (rodina A1) peptidáz (Sajid a McKerrow, 2002). Stejný trávicí systém byl identifikován i u dalších krev trávicích parazitů, např. u motolic (Caffrey et al., 2004; Delcroix et al. 2006), nematod (Williamson et al. 2003), či malarických protozoí *Plasmodium* (Rosenthal, 2004). V několika případech již byl cysteinovým peptidázám přiznán možný vakcinační potenciál (Golden et al., 2010). Z těchto důvodů uvažujeme o možném vakcinačním potenciálu cysteinových a aspartátových peptidáz klíštěte *I. ricinus*.

Imunizace směsí rekombinantních peptidáz

V této práci byly provedeny celkem tři vakcinační pokusy. První skupina králíků byla imunizována směsí všech dosud identifikovaných trávicích peptidáz klíštěte *I. ricinus* (Sojka et al., 2008). V této skupině byla u jednoho králíka (K227) váha klíšťat a velikost snůšky statisticky signifikantně nižší oproti kontrole, než u ostatních pokusných zvířat. Zároveň byla pozorována vyšší úmrtnost sajících klíšťat. Proto jsem se rozhodl určit u všech pokusných králíků titr protilátek proti jednotlivým peptidázám v séru metodou ELISA. V **Tab.č.9** je na první pohled vidět, že králík K227 měl oproti ostatním králíkům výrazně vyšší titr protilátek proti IrAE oproti ostatním králíkům. Sojka et al., 2007 lokalizoval IrAE kromě trávicích vezikulů také v peritrofní matrix. Pokud by se zde protilátky navázaly na peptidázu, mohlo by dojít k narušení stěny střeva klíštěte, jako je tomu u povrchového antigenu Bm86 komerční vakcíny TickGARD proti klíštěti *B. microplus* (Willadsen, 2004) a tím mu způsobit smrt. Zároveň bylo dokázáno, že IrAE je schopen trans-aktivovat ostatní peptidázy (Sojka et al., 2007). Zablokováním jeho funkce protilátkami, by tedy bylo možné výrazně narušit proces trávení klíštěte. Pro potvrzení této domněnky bude potřeba provést imunizaci samotným rekombinantním IrAE.

Imunizace rekombinantním IrCL

Ve druhém pokusu byla skupina králíků imunizována rekombinantním IrCL. Dle Franta et al. (2011) je IrCL společně s IrCD kvantitativně nejméně zastoupenou peptidázou ve střevě

I. ricinus. Zároveň obě tyto peptidázy začínají kaskády štěpení hemoglobinu (Horn et al., 2009). Z toho důvodu jsme se domnívali, by tedy zablokování IrCL mohlo být limitující pro úspěšné trávení klíštěte. Tento předpoklad potvrdil Franta et al. (2011), který prokázal, že RNAi umlčení exprese IrCL vedlo ke snížení váhy nasátých klíšťat. Povzbuzující byly i výsledky Goldená et al. (2010) u motolice *Fasciola hepatica*, ve které má katepsin L také úlohu při trávení hostitelských proteinů. Imunizací rekombinantním katepsinem L byl schopný snížit parazitární zátěž motolic u skotu až o 48%.

Nicméně u klíšťat, která šala na kralících imunizovaných IrCL nebyl pozorován žádný dopad na váhu nasátých klíšťat ani na velikosti jejich snůšek. Jediný pozorovaný fenotyp bylo prodloužené sání na imunizovaných kralících oproti kontrole. Důvodem neúspěchu tohoto pokusu by mohla být relativně nízká hladina protilátek v krvi kralíků. Navrhoval bych pokus zopakovat se zvýšenou imunizační dávkou.

Imunizace rekombinantním IrCB

V třetím pokusu byla skupina kralíků imunizována rekombinantním IrCB. IrCB je nejvíce zastoupenou peptidázou ve střevě *I. ricinus* (Franta, et al. 2010). Katepsin B má kromě endoproteolytické aktivity i karboxy-dipeptidázovou aktivity a účastní se zejména štěpení středně dlouhých a krátkých fragmentů hemoglobinu (Horn et al., 2009). Stejná aktivita byl pozorována i karboxydipeptidázy Bm91 klíštěte *R. microplus*, lokalizované ve střevě a slinných žlázách tohoto klíštěte (Riding et al., 1994). Je známo, že tato peptidáza byla schopná zvýšit účinnost rekombinantní vakcíny Bm86 (Willadsen et al., 1996). Vakcinací kralíků došlo k signifikantnímu snížení váhy nasátých klíšťat a prodlouženému sání.

Další imunizace

V budoucích pracích je potřeba dokončit imunizace rekombinantními IrAE, IrCDa IrCC. mRNA pro IrCC byla lokalizována ve střevě a slinných žlázách (Sojka et al. 2008). Pokud by se potvrdilo, že je IrCC ve slinných žlázách exprimován, mohl by fungovat zároveň jako skrytý i exponovaný antigen.

Závěr

Byl zaklonován gen pro IrCD do pET 101 vektoru. Byly připraveny rekombinantní peptidázy IrAE, IrCB, IrCC, IrCD, IrCL v expresním systému *E. coli*. Byly optimalizovány podmínky pro experimentální infestaci klíšťat na imunizovaných králících. Rekombinantními peptidázami byli imunizováni králíci- první skupina směsí všech pěti peptidáz, druhá skupina rekombinantním IrCL a třetí skupina rekombinantním IrCB. Byl sledován efekt imunizace na váhu a velikost snůšek klíšťat po nasátí. Byla určena hladina protilátek proti jednotlivým peptidázám v krvi králíků a její efekt na imunizaci. Získané předběžné výsledkyvakuinačních experimentů budou dále využity pro hledání nejvhodnější kandidátní vakcíny.

6. Literatura

- Almazan, C., Kocan, K.M., Blouin, E.F., de la Fuente, J., 2005. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine*. 23, 5294-5298.
- Balashov, Yu.S., 1972. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) – vectors of disease of man and animals (English translation). *Misc. Publ. Entomol. Soc. Amer.* 8, 163-376.
- Benjamin, M.A., Zhioua, E., Ostfeld, R.S., 2002. Laboratory and field evaluation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) for controlling questing adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 39, 723-728.
- Bock, R.E., Kingston, T.G., de Vos, A.J., 1999. Effect of breed of cattle on transmission rate and innate resistance to infection with *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* transmitted by *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.* 77, 461-464.
- Bock, R.E., de Vos, A.J., Kingston, T.G., McLellan, D.J., 1997. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginalis*. *Aust. Vet. J.* 75, 337-340.
- Bram, R.A., 1994. Integrated control of ectoparasites. In: *Ectoparasites of animals and control methods*. *Rev. Sci. Tech. OIE (Off. Int. Epizoot.)*. 13, 1357-1365.
- Brossard, M., Wikel, S.K., 2004. Tick immunobiology. *Parasitology* 129, 161-176.
- Caffrey, J.C., McKerrow, J.H., Salter, J.P., Sajid, M., 2004. Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends Parasitol.* 20, 241-248.
- Coons, L.B., Rossell-Davis, R., Tarnowski, B.I., 1986. Bloodmeal digestion in ticks. In: *Sauer, J.R., Hair, J.A., Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks*. Ellis Horwood, Chichester, 248-279.
- de Castro, J.J., 1997. Sustainable tick and tick borne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet. Parasitol.* 71, 77-97.

de la Fuente, J., Rodriguez, M., Montero, C., Redondo, M., Garcia-Garcia, J.C., Mendez, L., Serrano, E., Valdes, M., Enriquez, A., Canales, M., Ramos, E., Boue, O., Machado, M., Leonart, R., 1999. Vaccination against ticks (*Boophilus spp.*): the experience with Bm86-based vaccine Gavac™. Genet. Anal.: Biomol. Eng., 15, 143-148.

de la Fuente J., Kocan K.M., 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. Parasite. Immunol. 28, 275-283.

Delcroix, M., Sajid, M., Caffrey, C.R., Lim, K.C., Dvořák, J., Hsieh, I., Bahgat, M., Dissous, C., McKerrow, J.H., 2006. A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. J. Biol. Chem. 281, 39316-39329.

Ferreira, C.A.S., da Silva Vaz Jr., I., da Silva, S.S., Haag, K.L., Valenzuela, J.G., Masuda, A., 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. Exp. Parasitol. 101, 25-34.

Fikrig E., Narasimhan S., 2006. *Borrelia burgdorferi*--traveling incognito? Microbes Infect. 8, 1390-1399.

Franta, Z., Frantová, H., Konvičková, J., Horn, M., Sojka, D., Mareš, M., Kopáček, P., 2010. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. Parasit. Vectors. 3:119.

Franta, Z., Sojka, D., Frantová, H., Dvořák, J., Srba, J., Talacko, P., Mareš, M., Schneider, E., Craik, C.S., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., Kopáček, P., 2011. IrCL1 – the haemoglobinolytic cathepsin L of the hard tick, *Ixodes ricinus*. Int. J. Parasitol. 41, 1253-1262.

Frazzon, A.P.G., da Silva Vaz Jr., I., Masuda, A., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2000. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. Vet. Parasitol. 94, 117-125.

Garcia-Garcia, J.C., Montero, C., Redondo, M., Vargas, M., Canales, M., Boue, O., Rodriguez, M., Joglar, M., Machado, H., Gonzáles, I.L., Valdés, M., Mendéz, L., de la Fuente, J., 2000. Vaccine. 18, 2275-2287.

- Gindin, G., Samish, M., Zangi, G., Mishoutchenko, A., Glazer, I., 2002. The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. *Exp. Appl. Acarol.* 28, 283-288.
- Golden, O., Flynn, R.J., Read, C., Sekiva, M., Donnelly, S.M., Stack, C., Dalton, J.P., Mulcahy, G., 2010. Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFHCL1). *Vaccine.* 34, 5551-5557.
- Grandjean, O., Ibid, I., 1984. Biochemical ganges in the minut lumen and ultrastructure of the minut cell related to intracellular digestion. *Acarologia* 25, 147-165.
- Hajdusek, O., Almazan, C., Loosova, G., Villar, M., Canales, M., Grubhoffer, L., Kopacek, P., de la Fuente, J., 2010. Characterization of ferritin 2 for the kontrol of tick infestations. *Vaccine.* 28(17), 2993-2998.
- Horn, M., Nussbaumerová, M., Šanda, M., Kovářová, Z., Srba, J., Franta, Z., Sojka, D., Bogyo, M., Caffre, C.R., Kopáček, P., Mareš, M., 2009. Hemoglobin proteolysis in blood-feeding ticks: mapping of multienzyme pathway by functional proteomics. *Chemistry&Biology.* 16, 1053-1063.
- Imamura, S., da Silva Vaz Jr, I., Sugina, M., Ohashi, K., Onuma, M., 2005. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine.* 23, 1301-1311.
- Jaworski, D.C., Simmen, F.A., Lamoreaux, W., Coons, L.B., Muller, M. T., Needham, G.R., 1995. A secreted calreticulin protein in jodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *J. Insect Physiol.* 41, 369-375.
- Labuda, M., Trimnell, A.R., Lickova, M., Kazimirova, M., Davies, G.M., Lissina, O., Hails, R.S., Nutall, P.A., 2006. An antivector vaccine protecs againts a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathog.* 2(4)e27, 251-259.
- Lara, F.A., Lins, U., Paiva-Silva, G., Almeida, I.C., Braga, C.M., Miguens, F.C., Oliveira, P.L., Dansa-Petreski, M., 2003. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. *J. Exp. Biol.* 206, 1707-1715.

- Morgan, J.A., Corley, S.W., Jackson, L.A., Lew-Tabor, A.E., Moolhuijzen, P.M., Jonsson, N.N., 2009. Identification of a mutation in the para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* associated with resistance to synthetic pyrethroid acaricides. *Int. J. Parasitol.* 39, 775-779.
- Mulenga, A., Sugimoto, C., Sako, Y., Ohashi, K., Musoke, A., Shubash, M., Onuma, M., 1999. Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Infect. Immun.* 67, 1652-1658.
- Nava, S., Guglielmo, A.A., Mangold, A.J., 2009. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci.* 14, 2857-77.
- Nutall, P.A., 1999. Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zentralbl. Bakteriologie* 289, 492-505.
- Nutall, P.A., Trimmell, A.R., Kazimirova, M., Labuda, M., 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol.* 28, 155-163.
- Oliveira, M.F., d'Ávila, J.C.P., Torres, C.R., Braga, C.M.S., Tempone, A.J., Rumjanek, F.D., Silva, J.R., Dansa-Petreski, M., Oliveira, M.A., Souza, W., Oliveira, P.L., Ferreira, S.T., 2000. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 217-221.
- Paesen, G.C., Adams, P.L., Harlos, K., Nuttal, P.A., Stuart, D.I., 1999. Tick histamine-binding proteins: Isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Mol. Cell.* 3, 661-667.
- Parola, P., Raoult, D., 2001. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 7, 80-83.
- Peter, R.J., Van der Bossche, P., Penzhorn, B.L., Sharp, B., 2005. Tick, fly and mosquito control – Lessons from the past, solutions for the future. *Vet. Parasitol.* 132, 205-215.
- Pruett, J.H., 1999. Immunological control of arthropod ectoparasites – a review. *Int. J. Parasitol.* 29, 25-32.
- R Development Core Team, 2009. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. URL: <http://www.R-project.org>.

- Redondo, M., Frago, H., Ortiz, M., Montero, C., Lona, J., Medellín, J.A., Fria, R., Hernandez, V., Franco, R., Machado, H., Rodriguez, M., de la Fuente, J., 1999. Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac (TM) and avidine treatments. *Exp. Appl. Acarol.* 23, 841-849.
- Riding, G.A., Jarney, J., McKeena, R.V., Pearson, R., Cobon, G.S., Willadsen, P., 1994. A protective „concealed“ antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function.
- Rosenthal, P.J., 2004. Cysteine proteases of malaria parasites. *Int. J. Parasitol.* 34, 1489-1499.
- Sajid, M., McKerrow, J.H., 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 1-21.
- Samish, M., Rehacek, J., 1999. Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annu. Rev. Entomol.* 44, 159-182.
- Schmitt, T.H., Frezzatti, W.A., Schreier, S., 1993. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 307, 96-103.
- Sojka, D., Hajdušek, O., Dvořák, J., Sajid, D., Franta, Z., Schneider, E.L., Craik, C.S., Vancová, M., Burešová, V., Bogyo, M., Sexton, K.B., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., Kopáček, P., 1997. IrAE: an asparaginyl endopeptidase (legumain) in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* 27, 713-724.
- Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Hajdušek, O., Caffrey, C.R., Mares, M., Kopáček, P., 2008. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasit. Vectors* 1:7.
- Sojka, D., Francischetti, I.M.B., Calvo, E., Kotsyfakis, M., 2011. Cysteine Proteases from Bloodfeeding Arthropod Ectoparasites in: Robinson M. W., Dalton J.P. (Eds.) *Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms*. Landes bioscience.
- Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of Ticks*, vol. 1 New York: Oxford university Press
- Sonenshine, D.E., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2006. Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends Parasitol.* 22, 550-551.

StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10.
www.statsoft.com.

Sugino, M., Imamura, S., Mulenga, A., Nakajima, M., Tsuda, A., Ohashi, K., Onuma, M., 2003. A serine proteinase inhibitor (serpin) from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning, and preliminary assessment of its suitability as a candidate for tick vaccine. *Vaccine*. 21, 2844-2851.

Trimnell, A.R., Hails, R.S., Nutall, P.A., 2002. Dual-action ectoparasite vaccine targeting “exposed” and “concealed” antigens. *Vaccine*. 20, 3560-3568.

Trimnell, A.R., Davies, G.M., Lissina, O., Hails, R.S., Nutall, P.A., 2005. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine*. 23, 4329-4341.

Tsuda, A., Mulenga, A., Sugimoto, C., Nakajima, M., Ohashi, K., Onuma, M., 2001. cDNA cloning, characterization and vaccine effect analysis of *Haemaphysalis longicornis* tick saliva proteins. *Vaccine*. 19, 4287-4296

Wang, H., Paesen, G.C., Nutall, P.A., Barbour, A.G., 1998. Male ticks help their mates to feed. *Nature*. 391, 753-754.

Willadsen, P., 1980. Immunity to ticks. *Adv. Parasitol.* 18, 293-313.

Willadsen, P., Kemp, D.H., 1988. Vaccination with “concealed” antigens for tick control. *Parasitol. Today*. 4(7), 196-198.

Willadsen, P., Bird, P., Cobon, G.S., Hungerford, J., 1995. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology*. 110, 43-50

Willadsen, P., Smith, D., Cobon, G., McKenna, R.V., 1996. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunol.* 18, 241-246.

Willadsen, P., 1997. Novel vaccines for ectoparasites. *Vet. Parasitol.* 71, 209-222.

Willadsen, P., Billingsley, P.F., 1997. Immune intervention against blood-feeding insects. *The Biology of the Insect Midgut*. 323-343, Chapman&Hall, London

Willadsen, P., Jongjean, F., 1999. Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol. Today*. 15, 258-262.

Willadsen, P., Kemp, D.H., 1999. Past, present and future of vaccination against ticks. In: Proceedings of the IV Seminario Internacional de Parasitologia Animal, Puerto Vallarta, Mexico. 131-140.

Willadsen, P., 2004. Anti-tick vaccines. *Parasitology*. 129, 367-387.

Willadsen, P., 2006. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Vet. Parasitol.* 138, 161-168.

Williamson, A.L., Brindley, P.J., Knox, D.P., Hotez, P.J., Loukas, A., 2003. Digestive proteases of blood-feeding nematodes. *Trends Parasitol.* 19, 417-423.