

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra molekulární biologie



**Charakterizace a funkce transferinu z klíštěte
*Ixodes ricinus***

Diplomová práce

Bc. Jana Kadlecová

Školitel: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Ondřej Hajdušek, PhD.

České Budějovice 2011

Kadlecová, J., 2011: Charakterizace a funkce transferinu z klíštěte *Ixodes ricinus*. [Characterization and function of the transferrin from the tick *Ixodes ricinus*. Mgr. Thesis, in Czech.] - 44 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Iron metabolism is an important physiological process in ticks which has a great potential for an efficient tick control. This thesis is focused on the characterization and function assessment of the transferrin-related protein in the hard tick *Ixodes ricinus*. The full sequence *Ixodes ricinus* transferrin was determined and revealed that this protein is related to the insect transferrins of the type 2 (melanotransferrins). RNA interference silencing of tick transferrin did not affect tick feeding and survival suggesting that function of this protein is not directly involved in the iron transport.

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

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 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 dne 15. 12. 2011

.....
Jana Kadlecová

Poděkování:

Děkuji především svému školiteli RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc. za možnost pracovat v jeho laboratoři, jeho pomoc a cenné rady během práce i během psaní této diplomové práce. Dále děkuji školiteli specialistovi RNDr. Ondrovi Hajduškovi, PhD. za uvedení do metodiky a problematiky, pomoc při práci v laboratoři a zpracování výsledků. Ráda bych také poděkovala všem ostatním lidem v laboratoři za jejich odborné rady, pomoc a příjemnou atmosféru. Závěrem děkuji své rodině a přátelům za jejich podporu a trpělivost během mého studia.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Klíšťata.....	1
1.1.1. Klíšťe obecné (<i>Ixodes ricinus</i>).....	1
1.2. Metabolismus železa u klíšťete <i>Ixodes ricinus</i>	3
1.3. Transferiny u různých organismů.....	5
1.4. RNA interference (RNAi).....	7
2. Cíle práce	10
3. Materiál a metody	11
3.1. Použité chemikálie a primery.....	11
3.2. Získání celé sekvence Tf <i>Ixodes ricinus</i>	14
3.2.1. 5'RACE PCR.....	14
3.2.2. Zjištění zbývající sekvence Tf.....	15
3.3. Expres rekombinantního proteinu Tf.....	16
3.3.1. Amplifikace Tf genu, ligace, transformace.....	16
3.3.2. Expres rekombinantního proteinu.....	16
3.3.3. Refolding rekombinantního Tf.....	17
3.4. Příprava králíčích polyklonálních protilátek a kontrola jejich funkce.....	18
3.5. RNAi experiment.....	19
3.5.1. Syntéza dsRNA.....	19
3.5.2. Injikace dsRNA do klíšťat a izolace tkání.....	21
3.5.3. Izolace RNA a tvorba cDNA.....	21
3.5.4. Tkáňový profil (RT-PCR).....	22
3.5.5. Western blot analýza exprese proteinu Tf.....	22
3.5.6. Vliv umlčení genu Tf na přežívání a sání samic.....	23
4. Výsledky	24
4.1. Získání celé sekvence Tf <i>Ixodes ricinus</i>	24
4.1.1. 5'RACE PCR.....	26
4.1.2. Zjištění zbývající sekvence Tf.....	27
4.2. Expres rekombinantního proteinu Tf.....	31
4.3. Příprava králíčích polyklonálních protilátek a kontrola jejich funkce.....	34
4.4. RNAi experiment.....	35
4.4.1. Syntéza dsRNA.....	35

4.4.2. Tkáňový profil (RT-PCR) a expresní tkáňový profil.....	35
4.4.3. Vliv umlčení genu Tf na přežívání a sání samic.....	36
5. Diskuze.....	38
6. Závěr.....	41
7. Použitá literatura.....	42

1. Úvod

1.1. Klíšťata

Podřád klíšťata (Ixodida) je taxonomicky zařazen do kmene členovci (Arthropoda), podkmene klepítkatci (Chelicerata), třídy pavoukovci (Arachnida), podtřídy roztoči (Acarina) a řádu Parasitiformes. Ixodida se dále člení na tři čeledi: Ixodidae (klíšťata - „tvrdá klíšťata“), Argasidae (klíšťáci - „měkká klíšťata“) a Nuttalliellidae. Dnes je známo 907 druhů klíšťat, 720 druhů patřících do Ixodidae, 186 do Argasidae, čeleď Nuttalliellidae reprezentuje pouze jeden druh (Barker a Murrell, 2008).

Klíšťata jsou krevsající ektoparaziti obratlovců a vedle komárů nejvýznamnější přenašeči široké škály patogenů napadajících živočichy včetně člověka po celém světě. Z jednoho hostitele na druhého mohou přenášet původce onemocnění z řad protozoí, bakterií, virů i hub (Jongejan a Uilenberg, 2004).

Životní cyklus klíšťat (Ixodida) zahrnuje tři aktivní vývojová stádia: larva, nymfa a dospělec. Většina klíšťat potřebuje ke svému vývoji tři různé hostitele - tzv. tříhostitelský cyklus, ale některé druhy jsou typicky dvouhostitelské nebo dokonce jednohostitelské (Sonenshine, 1991). Po sání krve dochází k přeměně ve vyšší instar nebo v případě dospělé samice po kopulaci ke snůšce až několika tisíc vajíček, která nastává pouze jednou za život a následuje smrt.

1.1.1. Klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*)

Klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*), nejběžnější druh klíšťete v Evropě, je typickým tříhostitelským klíšťetem (Singh a Girschick, 2003), jehož životní cyklus trvá zpravidla dva až tři roky. Na našem území se vyskytuje především ve vlhkých oblastech nížin a pahorkatin, v listnatých i jehličnatých lesích, na loukách a pastvinách, od března až do listopadu.



Obr. 1: Klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*): klíšťe vyhledávající hostitele pomocí Hallerova orgánu

Dospělá klíšťata mají na hřbetní straně těla scutum (tvrdý štítek), který u samců kryje většinu těla, ale u samic pouze přední část, což umožňuje mnohonásobné zvětšení těla samic při sání na hostiteli. Typická je pro klíšťata stavba jejich ústního ústrojí, které je tvořeno pedipalpami, chelicerami (slouží k proniknutí kůží hostitele) a hypostomem (ukotvení v kůži). Hostitele klíště vyhledává pomocí tzv. Hallerova orgánu umístěného na předních končetinách. Tímto orgánem jsou klíšťata schopna vnímat teplotu, CO₂ a další chemické sloučeniny.

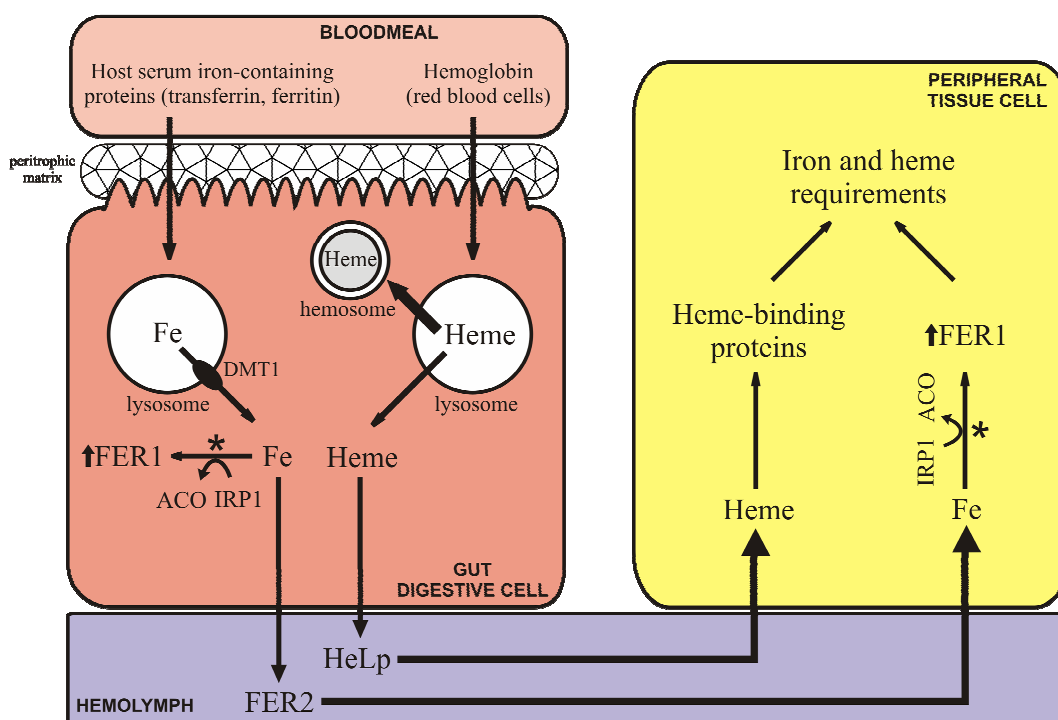
Larvy a nymfy sají na drobných obratlovcích, hlavně na hlodavcích, ptácích a plazech, nymfy vyhledávají i větší obratlovce. Dospělé samice pak sají na větších obratlovcích, hlavně na lesní zvěři, ale i na domácích zvířatech a lidech, dospělí samci nesají. Na rozdíl od jiných krevsajících parazitů, u kterých je krev trávena v lumen střeva, dochází u klíštěte k intracelulárnímu trávení v trávicích buňkách ve střevním epitelu, ve kterých se nachází soubor kyselých cysteinových a aspartátových proteáz (Sojka a kol., 2008, Horn a kol., 2009). Proteiny získané z krve jsou zdrojem energie a živin nezbytných pro vývoj a reprodukci (Grandjean, 1984).

Mezi nejvýznamnější onemocnění přenášené klíšťaty u nás patří Lymeská borelióza (způsobována spirochétami *Borrelia burgdorferi* sensu lato) a klíšťová encefalitida (původcem encefalitidy je arbovirus - TBE) (Nuttall, 1999). Zatímco vakcína proti encefalitidě je dostupná, humánní vakcína proti borelióze nebyla zatím vyvinuta.

1.2. Metabolismus železa u klíštěte *Ixodes ricinus*

Železo (Fe) je pro většinu organismů esenciální, protože působí jako akceptor a donor elektronů v řadě metabolických procesů. Na druhou stranu je díky této vlastnosti potenciálně toxické, protože pokud se vyskytuje volně v buňce, může katalyzovat přeměnu H_2O_2 na volné radikály, které poškozují DNA, proteiny i lipidy a jejich přítomnost může vést až ke smrti buňky. Z tohoto důvodu je nezbytné kontrolovat příjem, transport, uskladnění a využití železa organizovanou sadou proteinů (Hentze a kol., 2004). V posledních letech došlo k řadě významných objevů týkajících se proteinů zahrnutých v metabolismu železa u obratlovců (Dunn a kol., 2007). Mezi nejvýznamnější proteiny zahrnuté v tomto procesu patří ferritin (FER) a iron regulatory protein (IRP1 a IRP2). Ferritin, sloužící k uskladnění železa, je u obratlovců tvořen dvěma typy podjednotek - těžkým a lehkým řetězcem - a jeho translace je regulována navázáním IRP na iron responsive element (IRE) v 5' netranslatované oblasti FER mRNA (Walden a kol., 2006). Obdobný systém jako u obratlovců byl objeven u řady dalších organismů (Nichol a kol., 2002).

Na základě studia metabolismu železa u klíštěte *I. ricinus* byl vytvořen model metabolismu železa u klíšťat (Obr. 2).



Obr. 2: Model metabolismu železa u klíšťat (upraveno podle Hajdušek a kol., 2009)

Prvním proteinem popsáným v metabolismu železa u klíšťat byl vnitrobuněčný ferritin - FER1 (Kopáček a kol., 2003) - jde o homo-oligomer obsahující pouze těžké řetězce, jehož mRNA obsahuje IRE. Dále byl nalezen a charakterizován sekretovaný ferritin2 (FER2) a IRP1 (Hajdušek a kol., 2009). FER2 stejně jako FER1 obsahuje pouze těžké řetězce, IRE se v jeho mRNA nenachází.

Klíšťata postrádají metabolickou cestu syntézy (Braz a kol., 1999) a pravděpodobně i degradace hemu (absence hem-oxygenázy). Potřebují tedy vnější zdroj železa - tím je hostitelská krev - a systém dopravující železo do periferních tkání - hlavním přenašečem železa v tomto systému je FER2 (Hajdušek a kol., 2009). K expresi FER2 dochází hlavně ve střevě, sání krve ji neovlivňuje. FER2 (sekretovaný do hemolymfy) tedy hraje významnou roli v zásobování periferních tkání železem nezbytným pro jejich normální funkci. Umlčení exprese FER2 vede k potlačení syntézy proteinu FER1 v periferních tkáních, ale ne ve střevě - tam je dostatek železa z krve, ale toto železo není vzhledem k nepřítomnosti FER2 transportováno do periferních tkání. Dále umlčení exprese FER2 vede u klíšťat ke zhoršenému sání a k jejich usychání na hostiteli. Vzhledem k jeho malé homologii s ferritiny obratlovců by mohl být použit pro vývoj vakcíny proti klíšťatům nebo klíšťaty přenášeným patogenům (Hajdušek a kol., 2010).

IRP-IRE interakce je dobře popsáný mechanismus regulace translace v rámci metabolismu železa u obratlovců, který umožňuje reagovat na změny hladiny železa. U klíšťat obsahuje IRE pouze FER1. Exprese FER1 mRNA ve tkáních není závislá na sání krve, hladina proteinu FER1 u nenasátých klíšťat je velmi nízká, k jejímu výraznému zvýšení dochází při sání krve a při umlčení genu IRP1, což naznačuje *in vivo* regulaci translace FER1 pomocí IRP1. IRP1 tedy u nenasátých klíšťat inhibuje translaci FER1 navázáním na IRE na FER1 mRNA a v případě sání se IRP1 uvolňuje a dochází k expresi proteinu FER1 (Hajdušek a kol., 2009).

U obratlovců je hlavním přenašečem železa transferin, zatímco v hemolymfě klíšťat plní tuto funkci FER2 (Hajdušek a kol., 2009). Existence a funkce transferinu u klíšťat nebyla dosud známá.

1.3. Transferiny u různých organismů

Transferiny (Tf) u obratlovců tvoří rozmanitou skupinu zahrnující proteiny vázající železo jako například sérový Tf, laktoferin, melanotransferin, ovotransferin, ale také proteiny vázající malé i velké nekovové ligandy. Významným strukturním znakem proteinů z Tf rodiny je homologie mezi N-terminální a C-terminální částí molekuly, což naznačuje vznik genovou duplikací. Transferiny u obratlovců jsou multifunkční proteiny, sérový Tf je významným přenašečem železa (Aisen, 1998), jejich další funkce, obzvláště antimikrobiální, nejsou plně objasněny (Farnaud a Evans, 2003).

Studie prvního Tf u hmyzu prokázala významný strukturní rozdíl - chybějící schopnost vázat železo v C-terminální části molekuly (Bartfeld a Law, 1990). Studium dalších hmyzích transferinů ve většině případů tuto skutečnost potvrdilo, tyto studie dále prokázaly, že se stejně jako u obratlovců jedná o multifunkční proteiny. Bylo navrženo několik potenciálních rolí: transport železa, antibiotická funkce, vitelogenin protein, protein regulovaný juvenilním hormonem (Nichol a kol., 2002). V genomu řady hmyzích druhů bylo stejně jako u obratlovců nalezeno více genů kódujících různé transferiny. Porovnání aminokyselinových sekvencí těchto genů se sekvencemi Tf u člověka a dalších obratlovců prokázalo, že jsou konzervovány pouze některé aminokyseliny (aa) důležité pro vazbu železa (Fe). Na základě tohoto zjištění se nepředpokládá funkce hmyzích transferinů v metabolismu železa (Dunkov a Georgieva, 2006).

U komárů *Aedes aegypti* a *Anopheles gambiae* bylo nalezeno více genů kódujících transferin (Tf1 - Tf4). Tf1 *Aedes aegypti* má konzervované aa pro vazbu Fe v N-terminální části molekuly, ale ne v C-terminální části, kde se také nalézají rozsáhlé delece. Existuje hypotéza, že tento Tf1, podobně jako laktoferin u obratlovců, vycytává železo potřebné pro patogeny napadající organismus a delece v C-terminální oblasti je mechanismem zabraňujícím patogenům s transferinovým receptorem v získání tohoto železa (Yoshiga a kol., 1997). Zvýšení exprese Tf1 po infekci komára bakteriemi nebo vlasovci a rovněž po zvýšení hladiny Fe tuto hypotézu potvrzuje. Tf2 *Aedes aegypti* obsahuje substituce v aa pro vazbu Fe v obou terminálních oblastech, nejvyšší homologii vykazuje s melanotransferinem (MTf) savců a je exprimován v larvách, kuklách a vaječnicích. Tf2 by tedy mohl hrát určitou roli během růstu a vývoje komárů a vývoje oocytů (Zhou a kol., 2009). Při infekci komára bakteriemi se exprese na rozdíl od Tf1 snižuje, což by mohlo bránit dalšímu vývoji komára v případě infekce.

V genomu octomilky *Drosophila melanogaster* byly identifikovány tři geny pro transferin (Adams a kol., 2000). Tf1 postrádá konzervované aa pro vazbu Fe v C-terminální oblasti a rovněž obsahuje v této oblasti delece. Při nadbytku Fe dochází ke snížení jeho exprese. Při infekci bakteriemi nastává zvýšená exprese, což ukazuje na možnou funkci Tf1 *D. melanogaster* v imunitě (Yoshiga a kol., 1999). V nedávno publikované elegantní studii bylo prokázáno, že Tf2 (MTf) v buňkách drozofily je membránově vázaný protein, který je složkou přepážkových spojů („septate junction“) tvořících mezibuněčné propustné spojení v epiteliálních tkáních. Funkce Tf2 v drozofile a tím i správné uspořádání přepážkových spojů je závislé na vazbě železa a endocytóze (Tiklová a kol., 2010).

1.4. RNA interference (RNAi)

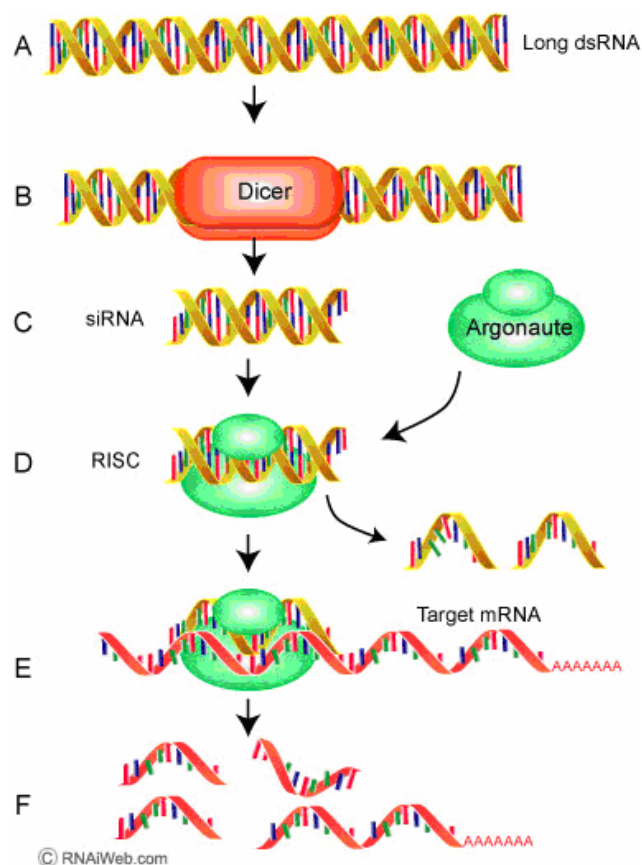
RNA interference (RNAi) je poměrně nedávno objevený a intenzivně studovaný buněčný mechanismus, který umožňuje regulaci exprese organismu vlastních genů na posttranskripční úrovni (Zamore, 2001) a zároveň potlačuje expresi cizorodých genů. Mechanismus RNAi se nejspíš vyvinul jako obrana proti invazi cizorodých a parazitických nukleových kyselin (Mourrain a kol., 2000) - obrana proti transpozónům, repetitivním sekvencím a RNA virům, které v učících stádiích tvoří dsRNA (Tabara a kol., 1999).

Podstatou RNAi je interference fragmentů dsRNA (dvouvláknové RNA) s komplementární mRNA, její následná degradace a tím potlačení syntézy cílového proteinu (Bernstein a kol., 2001). Nepřítomnost tohoto proteinu pak umožňuje sledovat případný fenotypový projev a tím identifikovat neznámou funkci cílového genu.

Poprvé byla RNAi popsána u hlístice *Caenorhabditis elegans* (Fire a kol., 1998). Původním záměrem vědců pod vedením Andrewa Firea a Craiga Mella byla inaktivace genu *unc22* *C. elegans* injikací antisense ssRNA, která měla vytvořit duplexy s komplementární mRNA a tím potlačit expresi *unc22*. K tomu sice došlo, ale stejný mutantní fenotyp byl pozorován u kontrolní skupiny *C. elegans* injikované sense ssRNA. Příčinou byl vznik malého množství dsRNA při *in vitro* přípravě ssRNA. Právě tato dsRNA byla později identifikována jako částice způsobující sekvenčně specifickou degradaci mRNA (Fire a kol., 1998). V roce 2006 obdrželi Andrew Z. Fire (Stanfordská univerzita) a Craig C. Mello (Massachusettská univerzita) za objevení fenoménu RNA interference Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu.

Proces RNAi je evolučně velmi konzervovaný, byl zjištěn u mnoha eukaryotních organismů (Cogoni a Macino, 2000), ale u některých organismů, např. u *Saccharomyces cerevisiae*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* a *Plasmodium falciparum*, úplně chybí (Cerutti a Casas-Mollano, 2006).

Mechanismus RNAi je znázorněn na Obr. 3.



Obr. 3: Mechanismus RNAi

RNAi začíná *in vivo* nebo *in vitro* syntézou dsRNA. Po vstupu do buňky je dsRNA navázána ke specifické endonukleáze DICER (RNáza III) (Bernstein a kol., 2001,). DICER následně dsRNA štěpí za spotřeby ATP (Nykänen a kol, 2001, Zamore, 2001) na krátké dvouřetězcové siRNA (small interfering RNA - malé interferující RNA) (Elbashir a kol., 2001, Carmell a Hannon, 2004). siRNA jsou 20-25 párů bazí dlouhé úseky s nepárovými přesahy na obou koncích, na 5' konci je fosfátová skupina, na 3' konci hydroxylová skupina. Vzniklé siRNA se asociují s proteinovým komplexem RISC (RNA-induced silencing complex) (Hammond a kol., 2000), ke komplexu se navazuje protein Argonaute (endonukleázová aktivita) (Carmell a kol., 2002), dochází ke štěpení siRNA na sense a antisense vlákno, sense vlákno je degradováno a antisense zůstává navázáno na RISC. Následně dochází k vyhledání komplementární sekvence mRNA a jejímu rozštěpení zhruba uprostřed komplementárního úseku. Takto rozštěpená mRNA je buňkou rozeznána a odbourána RNázami, tím je potlačena syntéza cílového proteinu.

U klíšťat byla poprvé RNAi popsána v roce 2002 (Aljamali a kol., 2002), v následujícím roce byla uveřejněna studie o vlivu injekce HBP dsRNA na hladinu HBP (histamin binding protein - histamin vázající protein) (Aljamali a kol., 2003). Od té doby

byla publikována o RNAi u klíšťat řada prací (např. Ramakrishnan a kol., 2005, Karim a kol., 2005, de la Fuente a kol., 2007a, Decrem a kol., 2008). Metoda RNAi byla také využita při studiu metabolismu železa u klíštěte *I. ricinus* v naší laboratoři (Hajdušek a kol., 2009).

2. Cíle práce

1. Identifikovat gen pro transferin v klíštěti *Ixodes ricinus* (IrTf)
2. Zjistit kompletní kódující sekvenci IrTf
3. Porovnat sekvenci se známými transferiny ostatních živočichů
4. Připravit rekombinantní protein IrTf a pomocí protilátek se pokusit zjistit místo exprese tohoto proteinu
5. Provést umlčení exprese IrTf pomocí RNAi a pokusit se odhadnout jeho funkci

3. Materiál a metody

3.1. Použité chemikálie a primery

Tab. 1: Použité chemikálie, kity a software

DNA a RNA elektroforéza, PCR	
50x TAE pufr	2M Tris-acetát, 50mM EDTA, pH 8,0
1x TAE pufr	50x TAE pufr 50x ředěný destilovanou H ₂ O
10x TBE pufr	0,89M Tris, 0,89M kys. boritá, 20mM Na ₂ EDTA
1x TBE pufr	10x TBE pufr 10x ředěný destilovanou H ₂ O
DEPC H ₂ O	Dietylpyrokarbonát 1000x ředěný v destilované H ₂ O, odstátý, autoklávovaný
Agaróza	1% agaróza pro ELFO - pro DNA elfo v 1x TAE pufru, pro RNA elfo v 1x TBE pufru
EtBr	Ethidium bromid 0,5μg/ml
6x Loading Dye (MBI Fermentas)	10mM Tris/HCl (pH 7,6), 0,03% bromfenolová modř, 0,03% xylencyanol, 60% glycerol, 60mM EDTA
DNA Ladder	GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas) GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder (MBI Fermentas)
RNA Ladder	High Range RNA Ladder (MBI Fermentas)
Polymeráza	Taq polymeráza (Top-bio s.r.o.)
dNTPs mix (MBI Fermentas)	Směs dNTPs každý o koncentraci 2,5mM
PCR H ₂ O (Millipore)	Filtrovaná, destilovaná, autoklávovaná voda
Média a chemikálie pro pěstování bakterií	
SOC médium	2% trypton, 0,5% kvasnicový extrakt, 0,05% NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgSO ₄ , 20mM glukóza, pH 7,0, sterilní
LB (Luria-Bertani) médium	1% trypton, 0,5% kvasnicový extrakt, 0,5% NaCl, pH 7,0, sterilní
LB agar	1,5% agar v LB médiu
Antibiotika	Ampicilin (zásobní roztok 50 mg/ml)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (zásobní roztok 1M)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
Expres, purifikace a refolding rekombinantního proteinu	
Resuspendační pufr	20mM Tris/HCl, pH 8,0
Izolační pufr	20mM Tris, 2M močovina, 0,5M NaCl, 10mM imidazol, 2% Triton X-100, pH 8,0
Solubilizační pufr	20mM Tris, 6M guanidin hydrochlorid, 0,5M NaCl, 10mM imidazol, 1mM β-merkaptoethanol, pH 8,0
Vazebný a ekvilibrační pufr	8M močovina, 20mM Tris/HCl, 0,5M NaCl, 10mM imidazol, pH 7,8
Eluční pufr	8M močovina, 20mM Tris/HCl, 0,5M NaCl, 0,5M imidazol, pH 7,8
Refoldovací pufr č.1	8M močovina, 50mM Tris, 500mM NaCl, pH 8,0
Refoldovací pufr č.2	20% glycerol, 50mM Tris, 150mM NaCl, pH 9,0
Refoldovací pufr č.3	50mM Tris, 150mM NaCl, pH 9,0

SDS-PAGE a Western blot	
Vzorkový redukcující pufr	0,75M Tris/HCl, pH 6,8, 5% SDS, 50% glycerol, 0,5% dithiotreitol, 0,25% bromfenolová modř
Barvicí roztok	0,05% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol, 10% kyselina octová
Odbarvovací roztok	25% methanol, 10% kyselina octová
Proteinový standard - LMW	LMW Electrophoresis Calibration Kit (Amersham)
PBS-Tween	1x PBS, 0,05% Tween 20
Blotovací pufr	0,125M Tris, 0,96M glycin, 0,1% SDS, 20% methanol
Blokovací pufr	5% sušené mléko v PBS Tween
Roztok primární protilátky	2 ml 5% sušeného mléka v PBS Tween, 2 ml PBS Tween, 40 µl protilátky
Sekundární protilátka	SwAR-Px (ředění 1:1000 v PBS Tween)
Substrátový roztok	50 ml H ₂ O, 1,5 ml 1M Tris, 10 mg DAB, 30 µl H ₂ O ₂
10% PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,4 g KH ₂ PO ₄ , pH 7,4, 1 l H ₂ O
Syntéza dsRNA	
Proteináza K	1 µl proteinázy K (20 mg/ml) ve 150 µl 10mM Tris/HCl (pH 8,0), 2mM CaCl ₂
Použité kity	
Purifikace PCR produktu	QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)
Izolace DNA z gelu	QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
Izolace plazmidu z bakterií	QIAquick Plasmid DNA Purification Spin Miniprep Kit (Qiagen)
Exprese rekombinantního proteinu	Champion™ pET100 Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen)
Syntéza a purifikace ssRNA	MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit (Ambion)
Syntéza cDNA	Enhanced Avian HS RT-PCR 100 Kit (Sigma)
Použitý software	
Analýza DNA sekvencí	NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) http://www.expasy.org
Navržení primerů	Primer Select (DNASTAR)
Editace DNA sekvencí	EditSeq (DNASTAR), ApE (A plasmid Editor), Chromas
Clustal W	MegAlign (DNASTAR)
Predikce signálního peptidu	SignalP 3.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP)
Fotodokumentace	AlfaDigiDoc RT (Kodak)
Editace obrázků	Adobe Photoshop 7.0 (Adobe)

Tab. 2: Použité primery - primery navržené podle sekvence genu ISCW010864 *Ixodes scapularis* označeny *

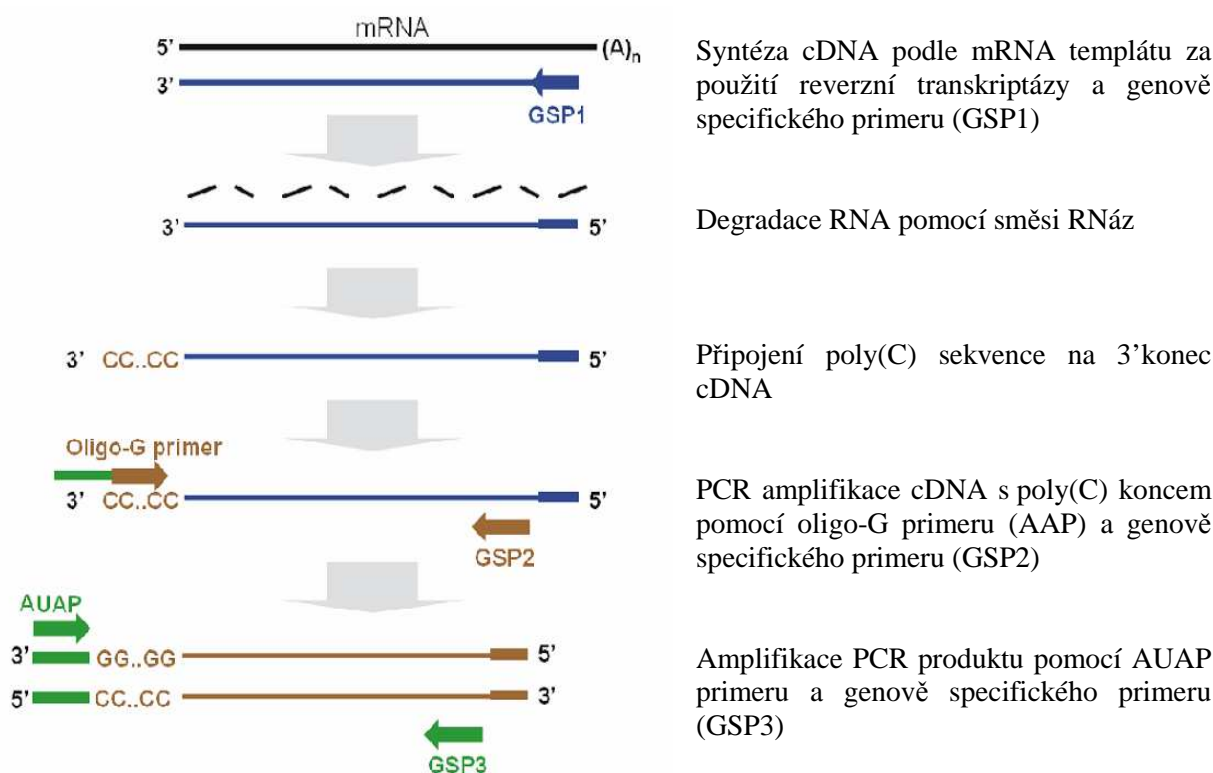
Název primeru	Použití	Sekvence
TfRACE-R5 *	5'RACE	5' - ATC CCG TAA AGG TCT GCT GG -3'
TfRACE-R6 *		5' - ACA GCT CCA CAT CTT TGC C -3'
AAP		5' - GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG -3'
AUAP		5' - GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC -3'
Tf-Exp-F	Exprese rekombinantního Tf	5' - CAC CCT CGA TGA CGT GAC TTG GTG -3'
Tf-Exp-R *		5' - GTC AGG CCA GCA GCC GAG C -3'
T7F primer	Sekvenace	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'
T7R primer		5' - GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3'
SP6 primer		5' - ATT TAG GTG ACA CTA TAG -3'
M13 forward		5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'
M13 reverse		5' - CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3'
TransfFsek		5' - CCT TAC GCG GGC TAC CA -3'
TransfRsek		5' - GCG ACC GCA GAA GTT GG -3'
TfRNAiF *		RNAi, RT-PCR
TfRNAiR *	5' - TA TCT AGA AGC AGT CGA CGA GAC GTA -3'	

3.2. Získání celé sekvence Tf *Ixodes ricinus*

V databázi VectorBase (<http://www.vectorbase.org/>) byla u klíštěte *Ixodes scapularis* nalezena pouze jedna sekvence kódující transferin (ISCW010864). Po porovnání se sekvencemi jiných transferinů bylo zjištěno, že tato sekvence je nekompletní a obsahuje chyby. Vůbec neobsahovala 5' konec kódující sekvence a uvnitř sekvence byly mezery. Jedním z cílů této práce bylo získat celou odpovídající sekvenci z klíštěte *Ixodes ricinus*.

3.2.1. 5'RACE PCR

Pro získání 5' konce kódující sekvence genu Tf byla použita metoda 5'RACE PCR - System for Rapid Amplification of cDNA Ends, version 2.0 (Invitrogen). Princip metody je schematicky znázorněn na Obr. 4.



Obr. 4: Princip metody 5'RACE PCR

5'RACE PCR byla provedena podle návodu, pro amplifikaci cDNA připravené ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* byly použity primery AAP (Abridged Anchor Primer) a TFRACE-R6 (navržen na základě sekvence ISCW010864 *Ixodes scapularis*). Po přečištění PCR produktu pomocí PCR Purification Kitu (Qiagen) následovala další PCR s primery AUAP (Abridged Universal Amplification Primer) a TFRACE-R5 (navržen na základě sekvence ISCW010864 *Ixodes scapularis*).

PCR produkt izolovaný z gelu pomocí Gel Extraction Kitu (Qiagen) byl podle manuálu zaklonován do vektoru pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) a plazmid byl transformován heat shock metodou do One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Na základě modrobílé selekce byly vybrány kolonie, které byly PCR s primery T7 a SP6 otestovány na přítomnost inzertu, pozitivní kolonie rostly přes noc v tekutém LB médiu s ampicilinem a pomocí Plasmid DNA Purification Spin Miniprep Kitu (Qiagen) z nich byly vyizolovány plazmidy.

Sekvence byla provedena na automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3130xl firmy Applied Biosystems v Laboratoři genomiky, ÚMBR, Biologické centrum AVČR. Výsledky ze sekvenátoru byly vyhodnoceny pomocí programů Chromas a DNASTAR.

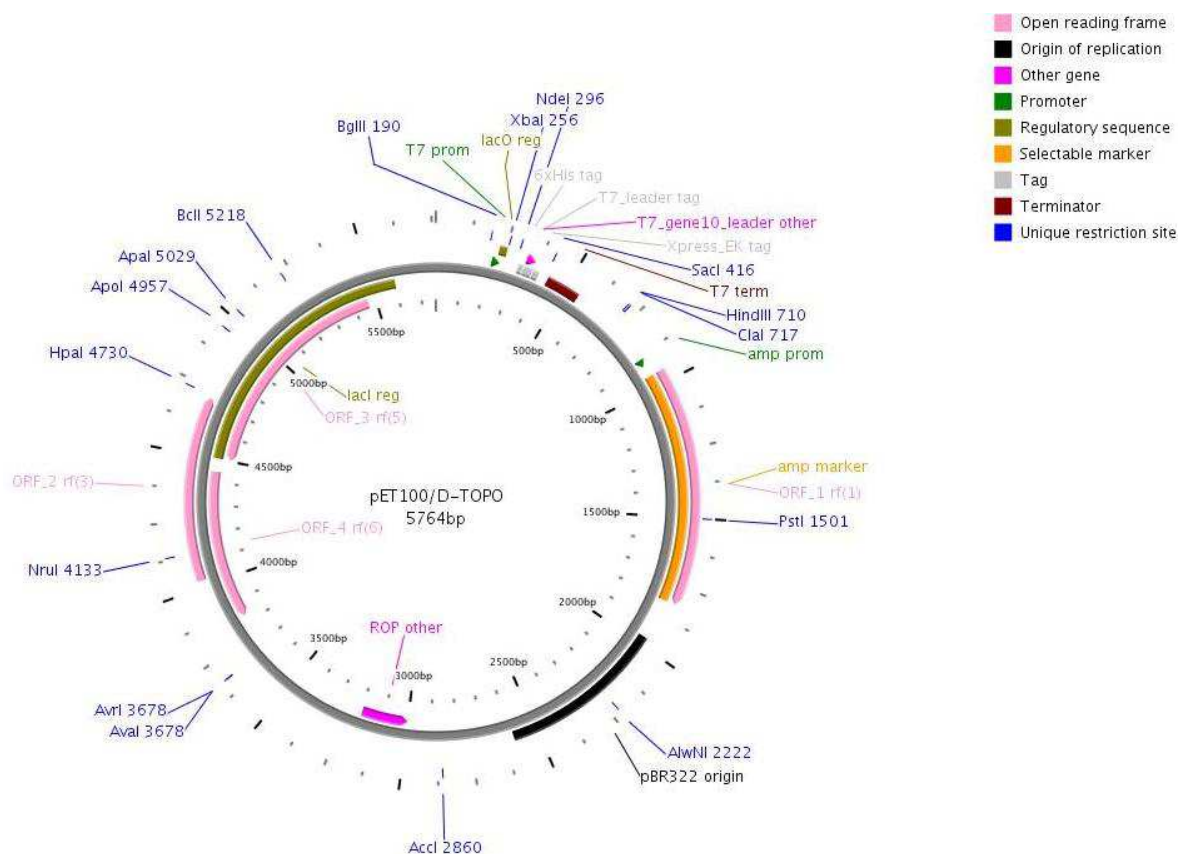
3.2.2 Zjištění zbývající sekvence Tf

Sekvence na 3' konci genu byla získána po zaklonování celého genu Tf získaného z cDNA ze slinných žláz *Ixodes ricinus* PCR amplifikací pomocí primerů Tf-Exp-R (navržen podle sekvence ISCW010864 *Ixodes scapularis*) a Tf-Exp-F (navržen podle sekvence získané 5'RACE PCR z *Ixodes ricinus*) do plazmidu pET100/D-TOPO[®] (Invitrogen) sekvenací za použití primerů T7F a T7R. Zbývající část sekvence uvnitř genu byla zjištěna sekvenováním pomocí navržených genově specifických primerů TransfFsek a TransfRsek.

3.3. Expresse rekombinantního proteinu Tf

3.3.1. Amplifikace Tf genu, ligace, transformace

Kompletní Tf gen bez sekvence pro signální peptid byl amplifikován z cDNA ze slinných žláz pomocí genově specifických primerů Tf-Exp-F (navržen podle sekvence *Ixodes ricinus*) a Tf-Exp-R (navržen podle sekvence *Ixodes scapularis*). Po PCR amplifikaci následovala gelová elektroforéza a izolace DNA z gelu (Gel Extraction Kit - Qiagen). Získaný Tf gen byl podle návodu k Champion™ pET100 Directional TOPO® Expression Kitu (Invitrogen) ligován do expresního vektoru pET100/D-TOPO® (Invitrogen) (Obr. 5), plazmid byl následně zaklonován heat shock metodou do One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Pozitivní bakteriální klon byl identifikován PCR s primery T7F a T7R a byla provedena kontrolní sekvenace.



Obr. 5: Vektor pET100/D-TOPO®

3.3.2. Expresse rekombinantního proteinu

Plazmid pET100 byl po izolaci z pozitivní kolonie (Plasmid DNA Purification Spin Miniprep Kit - Qiagen) podle návodu transformován heat shock metodou do expresních buněk BL21 Star (DE3) OneShot® Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Bakterie byly

přes noc kultivovány ve 37°C v LB médiu s ampicilinem a glukózou (10 ml LB + 10 µl amp + 200 µl 1M glukóza), následně byla po dobu 6 hodin provedena kultivace ve 37°C ve 200 ml LB média + 200 µl amp + 4 ml 1M glukózy. Po opakované centrifugaci (2500 ot/min, 10 min) a promývání bakterií v čistém LB médiu proběhla kultivace ve 400 ml čistého LB média přes noc.

Po kultivaci následovala centrifugace, pelet byl resuspendován, sonikován a bakteriální lyzát byl postupně rozdělen na jednotlivé frakce (cytoplazmatická, membránová, inkluzní tělíska) opakovanou resuspendací peletu v resuspendačním, resp. izolačním pufru (Tab. 1), sonikací a centrifugací (13000 g, 10 min). Frakce inkluzních tělísek byla získána po úplném rozpuštění peletu v solubilizačním pufru (Tab. 1) na magnetickém míchadle po dobu 8 hodin. Jednotlivé frakce byly analyzovány pomocí polyakrylamidové elektroforézy - SDS-PAGE (frakce inkluzních tělísek byla před SDS-PAGE 30 minut dialyzována proti destilované H₂O - odstranění guanidin hydrochloridu) a Western blotu za použití myší monoklonální protilátky proti His-tagu (SIGMA). Pozitivní frakce byla purifikována chelatační chromatografií využívající afinity His-tagu k Ni²⁺ iontům. Purifikace probíhala v prostředí 8M močoviny, rekombinantní Tf byl z kolony eluován zvyšující se koncentrací imidazolu a detekován spektrofotometricky. Vybrané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

3.3.3. Refolding rekombinantního Tf

Cílem refoldingu bylo, aby rekombinantní protein získal správnou 3D strukturu. Po chromatografické purifikaci byl protein v roztoku 8M močoviny s imidazolem. Refolding byl proveden dialýzou přes dialyzační membránu za použití tří refoldovacích pufrů (Tab. 1). Postupně byla snižována koncentrace močoviny, až byla úplně odstraněna. Po ukončení dialýzy byla provedena centrifugace 13000 ot/min, 10 min a supernatant i pelet byly uschovány.

3.4. Příprava králičích polyklonálních protilátek a kontrola jejich funkce

Při refoldingu rekombinantního proteinu Tf vznikl precipitát, který byl následně použit k imunizaci králíka. Před injekcí byl precipitát rozsuspendován v 500 μ l TBS a bylo přidáno 500 μ l nekompletního Freundova adjuvans. Imunizace byla provedena 4x v intervalech po 14 dnech. Krev byla odebrána 14 dní po poslední imunizaci, nechala se stát přibližně 2 hodiny v pokojové teplotě a přes noc ve 4°C. Centrifugací (2500 ot/min, 15 min, 4°C) bylo získáno sérum.

Kontrola funkce protilátek byla provedena metodou Western blot proti rekombinantnímu Tf.

3.5. RNAi experiment

3.5.1. Syntéza dsRNA

1) PCR amplifikace, restrikce PCR produktu a plazmidu p110

Úsek cDNA vybraný pro tvorbu dsRNA byl amplifikován pomocí PCR s primery TfrRNAiF a TfrRNAiR. Po elektroforéze v 1% agarózovém gelu byl PCR produkt z gelu izolován pomocí Gel Extraction Kitu (Qiagen). Následovala restrikce PCR produktu a plazmidu p110 restrikčními enzymy ApaI a XbaI po dobu 2 hodin ve 37°C. Složení restrikčních reakcí:

	Plazmid p110	PCR produkt
Pufr TANGO 10x	3 µl	3 µl
Enzymy (ApaI, XbaI)	1 µl každý	1 µl každý
DNA	20 µl	3 µl
H ₂ O	5 µl	22 µl
Celkový objem reakce	30 µl	30 µl

Po restrikci byla provedena purifikace pomocí PCR Purification Kitu (Qiagen).

2) Ligace a transformace

Ligační směs byla namíchána a ponechána přes noc ve 4°C. Složení ligační směsi:

Pufr 2x	5 µl
Plazmid p110	2 µl
DNA (PCR produkt)	2 µl
T4 ligáza	1 µl
Celkový objem reakce	10 µl

Po ligaci byl plazmid zaklonován heat shock metodou do One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Pozitivní kolonie byla identifikována PCR s primery TfrRNAiF a TfrRNAiR, následovala kultivace přes noc ve 37°C v tekutém LB médiu s ampicilinem (30 ml LB média + 30 µl amp). Plazmid byl izolován pomocí Plasmid DNA Purification Spin Miniprep Kitu (Qiagen) a odeslán na kontrolní sekvenaci s primery M13 forward a M13 reverse.

3) Restrikce plazmidu p110

Restrikce plazmidu probíhala po dobu 2 hodin ve 37°C, objem přidaného plazmidu záleží na jeho koncentraci:

	Enzym ApaI	Enzym XbaI
Plazmid p110	10 µg (~ 30 µl)	10 µg (~ 30 µl)
Pufř TANGO 10x	5 µl	5 µl
Enzym	6 µl	6 µl
H ₂ O	doplnit do 50 µl	doplnit do 50 µl
Celkový objem reakce	50 µl	50 µl

4) Purifikace linearizovaného plazmidu

Po restrikci bylo k plazmidu přidáno 25 µl proteinázy K a 3,75 µl 10% SDS, následovala inkubace 30 minut při 50°C. Po inkubaci bylo přidáno 80 µl fenol-chloroformu, směs byla promíchána na vortexu a centrifugována (13000 ot/min, 5 min). Po odebrání přibližně 80 µl vodné fáze k ní bylo přidáno 80 µl chloroformu, následovalo promíchání na vortexu a centrifugace (13000 ot/min, 5 min). Znovu bylo odebráno přibližně 80 µl vodné fáze, přidáno 56 µl izopropanolu, směs byla promíchána na vortexu, inkubována 15 minut v -20°C a centrifugována (15000 ot/min, 30 min, 4°C). Po odebrání supernatantu byl pelet promyt v 80 µl 80% ethanolu, následovala centrifugace (15000 ot/min, 10 min, 4°C). Ethanol byl odebrán, zkumavka se nechala přibližně 15 minut v boxu vyschnout a následně byl pelet rozpuštěn ve 20 µl DEPC H₂O. Koncentrace plazmidu byla zjištěna spektrofotometricky a úspěšnost restrikce byla zkontrolována elektroforézou.

5) Syntéza ssRNA

Reakční směsi pro sense a antisense ssRNA byly namíchány pomocí reagentů z MEGAscript[®] T7 High Yield Transcription Kitu (Ambion). Syntéza jednovláknové RNA probíhala po dobu alespoň 8 hodin ve 37°C, během syntézy byly směsi pravidelně promíchávány. Složení směsi pro syntézu ssRNA:

dNTPs	8 µl (2 µl každý)
Buffer (37°C, vortex)	2 µl
Lin. plazmid	x µl (1 µg, max 8 µl)
Enzyme mix	2 µl
H ₂ O	doplnit do 20 µl
Celkový objem reakce	20 µl

6) Purifikace ssRNA

Purifikace byla provedena pomocí reagentů z MEGAscript[®] T7 High Yield Transcription Kitu (Ambion). Po syntéze ssRNA byl nejprve přidán 1 µl DNázy, směs byla inkubována 15 minut při 37 °C. Následovalo přidání 115 µl H₂O a 15 µl acetátu amonného a promíchání na vortexu. Dále bylo přidáno 150 µl fenol-chloroformu, směs byla promíchána

na vortexu a centrifugována (13000 ot/min, 5 min). Po odebrání přibližně 150 µl vodné fáze k ní bylo přidáno 150 µl chloroformu, následovalo promíchání na vortexu a centrifugace (13000 ot/min, 5 min). Znovu bylo odebráno přibližně 150 µl vodné fáze, přidáno 105 µl izopropanolu, směs byla promíchána na vortexu, inkubována 15 minut v -20°C a centrifugována (15000 ot/min, 30 min, 4°C). Po odebrání supernatantu se nechala zkumavka v boxu přibližně 15 minut vyschnout a následně byl pelet rozpuštěn v 15 µl DEPC H₂O. Koncentrace ssRNA byla zjištěna spektrofotometricky (musí být > 3000 µg/ml) a ssRNA byla zkontrolována elektroforézou.

7) Hybridizace

Sense a antisense ssRNA o koncentraci 3000 µg/ml byly smíchány v poměru 1:1. Zkumavka se směsí byla umístěna do skleněného odměrného válce o objemu 2 litry obaleného hliníkovou fólií. Do válce byla nalita vroucí voda a vzorek v ní byl inkubován přes noc (alespoň 8 hodin). Výsledek hybridizace byl zkontrolován elektroforézou - na gel byl nanesen 1 µg RNA za použití Ambion loading dye.

3.5.2. Injikace dsRNA do klíšťaťat a izolace tkání

Injikace dsRNA do samic klíšťete byla provedena pomocí mikrokapiláry umístěné na mikromanipulátoru (Narishige). Do každého klíšťete bylo injikováno přibližně 0,5 µl Tf dsRNA o koncentraci 3 µg/µl, současně byla provedena injikace kontrolní GFP dsRNA (předem připravena v naší laboratoři podle stejného protokolu). Po injikaci byla klíšťata ponechána jeden den ve vlhkém prostředí za pokojové teploty a poté následovalo sání na morčeti až do úplného nasátí a pitva.

Při pitvě byla klíšťata přichycena na Petriho misku s voskem. Nejdříve byla odstraněna posteriorní část kutikuly, izolované tkáně (slinné žlázy, vaječníky, střevo) byly promyty v PBS pufru. Tkáně určené pro izolaci RNA a následnou tvorbu cDNA byly vloženy do mikrozkuvek s TRI ReagentTM (Sigma), tkáně pro Western blot byly vloženy do mikrozkuvek nasucho, všechny izolované tkáně byly uchovány v -80°C.

3.5.3. Izolace RNA a tvorba cDNA

1) Izolace RNA

Tkáně v 0,5 ml TRI ReagentTM (Sigma) byly rozbity homogenizátorem, bylo přidáno 0,1 ml chloroformu, směs promíchána na vortexu. Po centrifugaci (15000 ot/min, 15 min,

4°C) byla odebrána vodná fáze obsahující RNA, k ní bylo přidáno 0,25 ml izopropanolu, směs byla promíchána na vortexu, 30 minut inkubována v -20°C a centrifugována (15000 ot/min, 30 min, 4°C). Po odebrání supernatantu byl pelet promyt v 0,5 ml 75% ethanolu, následovala centrifugace (15000 ot/min, 10 min). Ethanol byl odebrán, zkumavka se nechala přibližně 15 minut v boxu vyschnout a následně byl pelet rozpuštěn ve 20 µl DEPC H₂O. Koncentrace RNA byla zjištěna spektrofotometricky, kvalita RNA byla ověřena elektroforézou. Izolovaná RNA byla uložena v -80°C.

2) Syntéza cDNA

Syntéza cDNA byla provedena metodou reverzní transkripce pomocí Enhanced Avian HS RT-PCR 100 Kit (Sigma). Nejprve byla namíchána reakce:

RNA templát	x µl (0,5 µg, max 8 µl)
Deoxynucleotide Mix	1 µl
Oligo(dT) ₂₃	1 µl
H ₂ O	doplnit do 10 µl
Celkový objem reakce	10 µl

Následovalo promíchání na vortexu, centrifugace, inkubace 10 minut v 70°C, 2 minuty na ledu a opět centrifugace. Poté bylo k reakci přidáno:

10x buffer for eAMV-RT	2 µl
Enhanced Avian RT	1 µl
RNase inhibitor	1 µl
H ₂ O	6 µl
Celkový objem reakce	20 µl

Po inkubaci směsi 50 minut v 45°C byla získaná cDNA uložena v -20°C, před použitím na RT-PCR byla cDNA naředěna 1:10.

3.5.4. Tkáňový profil (RT-PCR)

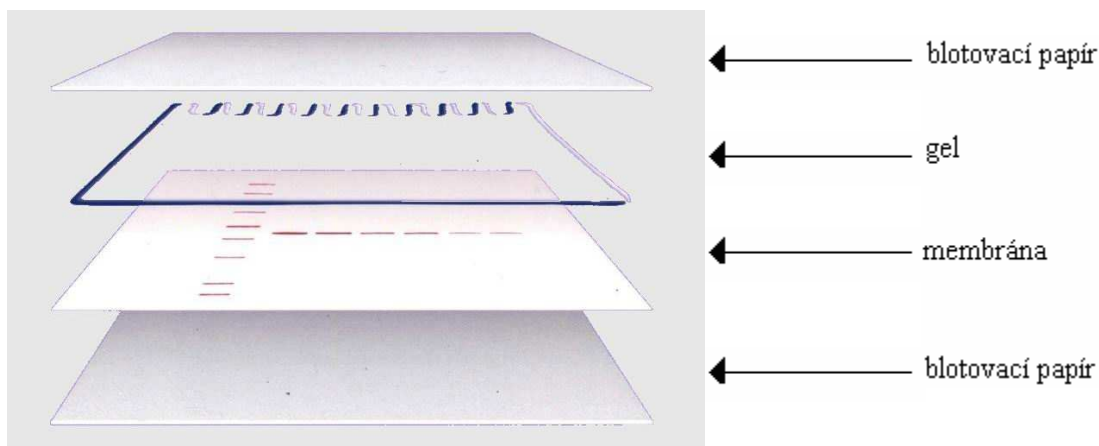
Templátem pro RT-PCR byla cDNA získaná z izolovaných tkání (slinné žlázy, vaječníky, střevo). Byly použity primery TfrRNAiF a TfrRNAiR, pro kontrolní reakci byly použity genově specifické primery pro aktinový gen, jehož exprese je ve všech tkáních konstantní.

3.5.5. Western blot analýza exprese proteinu Tf

Proteiny byly rozděleny vertikální polyakrylamidovou elektroforézou (SDS-PAGE) v gradientovém gelu (5-17%) při konstantním napětí 200V. Vzorky byly před SDS-PAGE smíchány s vzorkovým redukcujícím pufrem v poměru 3:1 (15 µl vzorku + 5 µl pufre) a

denaturovány po dobu 5 minut při 100°C, jako marker molekulových hmotností byl použit proteinový standard LMW (Amersham).

Po SDS-PAGE byl gel, nitrocelulózová membrána a blotovací papíry promyty 5 minut v blotovacím pufru s methanolem (200 ml pufru + 50 ml methanol), následně byl sestaven sendvič na Western blot - blotovací papír Whatman, gel, membrána, blotovací papír Whatman (Obr. 6).



Obr. 6: Sendvič na Western blot

Proteiny byly přenášeny na membránu při 150mA po dobu 120 minut. Poté byla odříznuta část membrány s markerem, 5 minut byla barvena v PBS Tween s amidoblackem, přes noc ponechána v odbarvovacím roztoku a druhý den promyta v destilované vodě. Zbytek membrány byl blokován v 5% roztoku sušeného mléka v PBS Tween (blokovací pufr) po dobu 1 hodiny, následovala inkubace v roztoku primární protilátky (2 ml mléka + 2 ml PBS Tween + 40 µl protilátky) přes noc. Po promytí v PBS Tween (3 x 5 min) proběhla inkubace v roztoku sekundární protilátky SwAR-Px (ředění 1:1000 v PBS Tween) po dobu 1 hodiny. Po dalším promytí v PBS Tween (3 x 5 min) byly proteiny na membráně obarveny pomocí substrátového roztoku 3,3'-diaminobenzidinu - DAB, který se během reakce peroxidázy s H₂O₂ oxiduje a barví se do hněda. Reakce byla zastavena promytím membrány v destilované vodě.

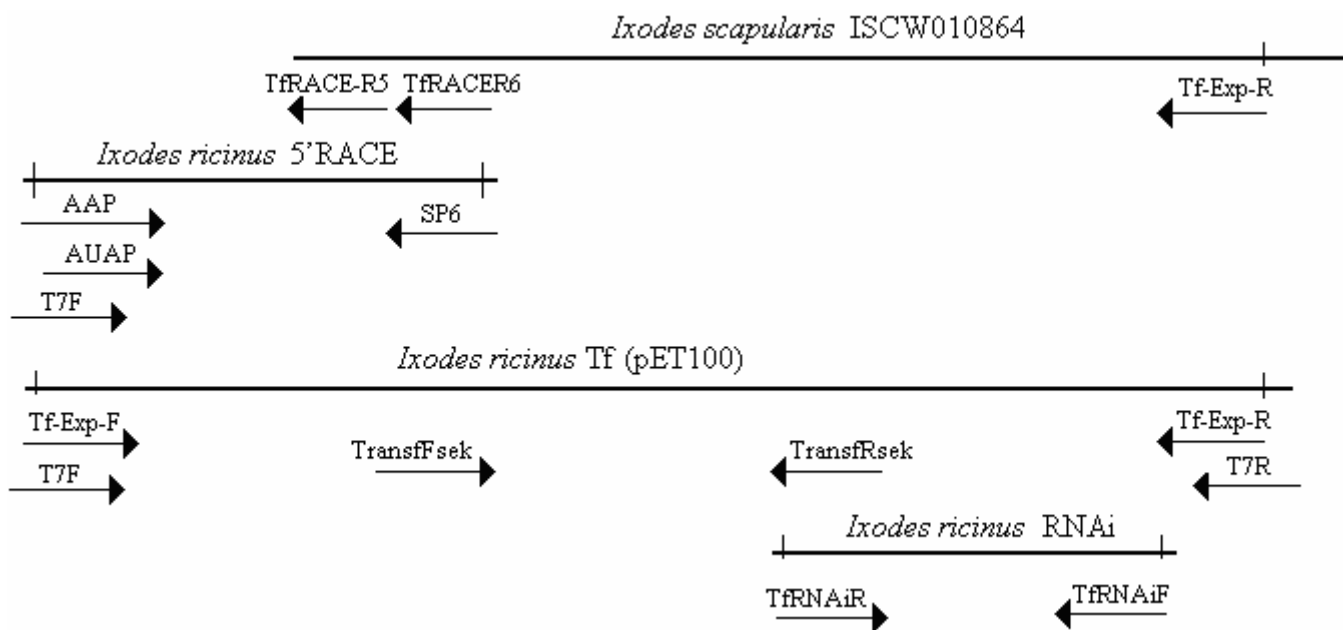
3.5.6. Vliv umlčení genu Tf na přežívání a sání samic

Po injikaci Tf dsRNA a kontrolní GFP dsRNA byla klíšťata ponechána jeden den ve vlhkém prostředí za pokojové teploty a poté následovalo sání na morčeti až do úplného nasátí. Byla sledována schopnost samic plně se nasát a po sání byla srovnávána jejich hmotnost.

4. Výsledky

4.1. Získání celé sekvence Tf *Ixodes ricinus*

Porovnáním sekvence genu ISCW010864 (Obr. 8) klíštěte *Ixodes scapularis* se sekvencemi jiných transferinů bylo zjištěno, že je nekompletní. Na základě sekvence tohoto genu byly navrženy primery TFRACE-R5 a TFRACE-R6, s jejichž pomocí byla provedena 5'RACE PCR. Byl získán 5' konec kódující sekvence genu Tf u klíštěte *Ixodes ricinus* a podle něj navržen primer Tf-Exp-F. Ten byl společně s primerem Tf-Exp-R (navrženým podle sekvence *Ixodes scapularis*) použit pro PCR amplifikaci celého genu Tf *Ixodes ricinus*, který byl zaklonován do vektoru pET100 a sekvenací pomocí primeru T7R byla získána sekvence na jeho 3' konci. Zbývající část sekvence uvnitř genu byla zjištěna sekvenováním pomocí navržených genově specifických primerů TransfFsek a TransfRsek. Postupnou sekvenací (Obr. 7) tak byla získána celá sekvence Tf *Ixodes ricinus*.



Obr. 7: Schéma postupné sekvenace Tf *Ixodes ricinus*

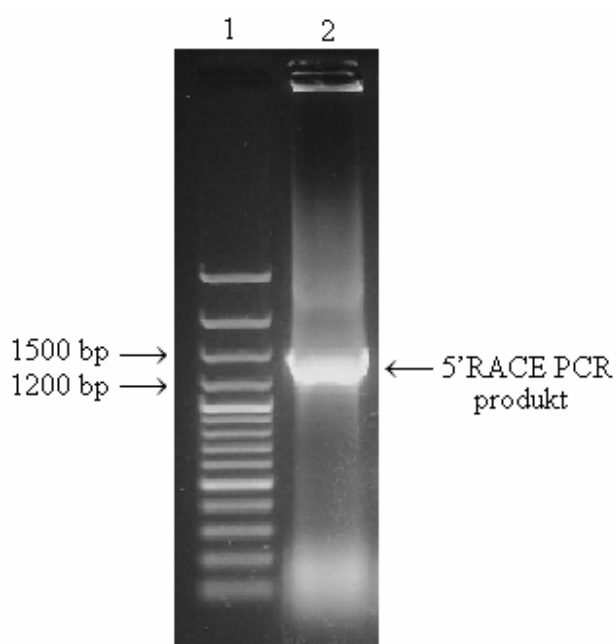
1	ccggcaggtgacaatccgcagaagatgtgcgagctgtgtggcggccgcctggggagcgc	60
	P A G D N P Q K M C E L C G G R P G E R	
61	tgctcgggcaacgacccttacgcgggctaccagggggcgggtgcggtgcctagcggagcgc	120
	C S G N D P Y A G Y Q G A V R C L A E R	
121	ggagacgtggcctttgtgaagcacacgaccctggacgaggtgctgccccgggagccat	180
	G D V A F V K H T T L D E V L R G R S H	
181	gcctttcgctgctctgcccacgggggacacggctgctacggaccagttccggtcgtgc	240
	A F R L L C P S G D T A A T D Q F R S C	

241	aactggggctttgtgcccgaatgtagtggtgaccacctcggacacacggctggccgtg	300
	N W G F V P P N V V V T T S D T R L A V	
301	cgggagcagtaccaggacttcctcagggtagccacaaggcgaccagtcaaggcgca	360
	R E Q Y Q D F L R V G S H K A T S Q G A	
361	ttgcttttgtgcttccatgcagccaacgagtgacactggagtggtgagatatttttgg	420
	L L L C F H A A N E C T W S V L Q Y F W	
421	agttccaccacggagcggcgcgtgtttgtcaacgcaactgagctgtcgcggttctacctg	480
	S S T T E R P L F V N A T E L S R F Y L	
481	tttgccaacggggccacgctatggcaatgccaccaacctcctgctgcaggacctgacgacg	540
	F A N G P R Y G N A T N L L L Q D L T T	
541	gagtttgccgctgcacgggaa ccagcagacctttacgggat acctg ggcaaagatgtg	600
	E F V P L H G N Q Q T F T G Y L G K D V	
601	gagctgt tcacaaagttgcggaagtgcccgggtccatccggccaagttgtgctggtctct	660
	E L F H K L R K C P V H P A K L C V V S	
661	gacaaggagatggagaagtgccatcgaatgaagactgccttcaagtcacagatgctgaag	720
	D K E M E K C H R M K T A F K S Q M L K	
721	ccagacttgaactgcatcaagagcgcagagccatctgcagtgatgcacatgatccgaaat	780
	P D L N C I K S E S H L Q C M H M I R N	
781	gggtgcgccgacttgggtgttctcagggccggggatctctatcgggcaggccagtcactc	840
	G V A D L V V L E A G D I Y R A G Q S L	
841	gggctgattccataatcgcagaacagtacaatttggatgaaccatactactacgtcgtg	900
	G L I P I I A E Q Y N L D E P Y Y Y V V	
901	gcagtgactttccaaggggacaaggagacagacctgttgactctcaaaggcaagtgccgg	960
	A V T F Q G D K E T D L L T L K G K C R	
961	cggcggctgctgccacacgggcatcaaccaggcggcggctgggtggtgcccctcagcttc	1020
	R R S C H T G I N Q A A G W V V P L S F	
1021	ctcatcagcaacgagcggatgccccgtacacgtgacactccccacgctcggcgtcggag	1080
	L I S N E R M R A Y T C D S P R S A S E	
1081	ttcttccaagagctgcgttccgggttcgctgtcgcgcgagtttgtgagctccgagcgc	1140
	F F S K S C V P G S L S R E F V S S E R	
1141	agctacaagaacctgtgacactgtgccacggcatggggccaacttctgcggctcgaat	1200
	S Y K N L C D L C H G M G S N F C G R N	
1201	geggaggagcccttctacggccacacgggtgccttctcgtgcctggctcagggcggcggc	1260
	A A E P F Y G H T G A F R C L V E G G G	
1261	aacatcgcctttgtgaagcacacgaccgtgttcgagaacacggcgggccaacagcatg	1320
	N I A F V K H T T V F E N T A G R N S M	
1321	tggtgggcacgaacatctcggccggagactttgagctgggtgtgccgcgatggctcgcga	1380
	W W A R N I S P G D F E L V C R D G S R	
1381	cggctcgcaggacaagtacgccgagtgcaacctgggcaaggtggcttccaatgcaattgtc	1440
	R S Q D K Y A E C N L G K V A S N A I V	
1441	accagtcceggcaagccacagcagctgatcgcgcctacatcgacctgttcgtgtacgcg	1500
	T S P G K P Q H V I D A Y I D L F V Y A	
1501	cagcagttctacgggtccaagtacagccaggacttcaccttcaagatgtttgtctccgag	1560
	Q Q F Y G S K Y S Q D F T F K M F V S E	
1561	tcggcctatcgcgacctcatctttcaggattcggcacagcaactcaaaccagtgacctctg	1620
	S A Y R D L I F Q D S A Q Q L K P V P L	
1621	gcacgccgaattacaggactacctgggctctgacttccctgcaggcgggtacgtctcgtc	1680
	A R R N Y R D Y L G S D F L Q A V R L V	
1681	gactgctcggcggcggctcgtcgtcgtcggcctctctctcacggctgcactgggtgtgg	1740
	D C S A A G S L A A R L S L T V A L V W	
1741	gtg ctcggctgctggcctGA ccggaccctcggggagcgcctcccttgggtgccagcaact	1800
	V A R L L A *	
1801	ctgaacggcagggagtggtgcccaagtttctccttcatcgaagcctcctacctgggggtgg	1860

Obr. 8: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence genu ISCW010864 *Ixodes scapularis* - stop kodon vyznačen velkými písmeny a tučně, barevně označeny primery navržené podle sekvence genu ISCW010864 - TFRACE-R5, TFRACE-R6, Tf-Exp-R

4.1.1. 5'RACE PCR

Metodou 5'RACE PCR, jejíž princip je schematicky znázorněn na Obr. 4, byla získána sekvence na 5' konci genu Tf. cDNA ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* byla amplifikována PCR s primery AAP a TfRACE-R6, následovala PCR s primery AUAP a TfRACE-R5. PCR produkt o očekávané velikosti (Obr. 9) byl zaklonován do vektoru pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) a plazmid byl transformován do One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Na základě modrobílé selekce byly vybrány kolonie, které byly PCR s primery T7 a SP6 otestovány na přítomnost inzertu, pozitivní kolonie rostly přes noc v tekutém LB médiu s ampicilinem a z nich byly vyizolovány plazmidy. Sekvence (Obr. 10) byla získána sekvenací pomocí primerů T7 a SP6.



Obr. 9: PCR produkt 5'RACE PCR: 1 - GeneRuler[™] 100bp Plus DNA Ladder, 2 - PCR produkt 5'RACE PCR

1	ggccacgcgctcgactagtagggggg	26
27	ggggggacaccttttgcggttaccctgtttactctcttgtgcagcttgttatggtcgta	86
87	gcttgaaatntagagcggtgaaa ATG cggtggctcgctcctggctcgcagttttgcac	146
	M R W S S S W L A V L H	
147	cttggttagccacgctcgtcttctgggctggggc ctcgatgacgtgacttggtg cacc	206
	L G L A H V A L L G W G L D D V T W C T	
207	gtgagcgacatggaacacctcaagtgcactgagtttgccgagggcggttcgtgccagcagg	266
	V S D M E H L K C T E F A E A V R A S R	
267	acattctcgttgcaactcaagtgcaagcgtgccgccttcaaagaccagtgcatgaacttc	326
	T F S L Q L K C K R A A F K D Q C M N F	
327	cttgacaatggccaggtgcacctggaggcttgatccccggggaggttactcggccggt	386
	L D N G Q V H L V E L D P G E V Y S A G	
387	cgtttccacagcgtcatccccatcctggcagagcgctacggggcagggcaggggaagctggc	446
	R F H S V I P I L A E R Y G P G R E A G	

447	tactactctgtggcagtggtccatgccaaagacagagtacaagtcgctcctggacctaag	506
	Y Y S V A V V H A K T E Y K S L L D L K	
507	aacaagtctgtgtgcttcacgagtggtggatggccggctgggtcatccccatggcc	566
	N K S V C F T S V G D M A G W V I P M A	
567	accctggatgcatgagaacgtccttgaagtaagcgactgcaacaaccttgtcaagagcgcc	626
	T L V H E N V L E V S D C N N L V K S A	
627	tegactttctttgggcccagctgtgcccccaactccctcattgacaagcacaaccaaca	686
	S T F F G P S C A P N S L I D K H N P T	
687	ggtgacaatccgcagaagatgtgagctgtgcccggcggccctggggagcgctgctcg	746
	G D N P Q K M C E L C G G R P G E R C S	
747	ggcaacgaccttacgcgggctaccaggggctgggtgcctggcgggagcgcgagac	806
	G N D P Y A G Y Q G A V R C L A E R G D	
807	gtggcctttgtgaagcacagacctggacgaggtgctgccccggggccacgccttt	866
	V A F V K H T T L D E V L R G R G H A F	
867	cgcttgctctgccccctcaggcgacacggctgctacggaccagttccggctgcaactgg	926
	R L L C P S G D T A A T D Q F R S C N W	
927	ggcttctgcccgaatgttgggtgaccacctcggacacacggctggccgctgccccgag	986
	G F V P P N V V V T T S D T R L A V R E	
987	cagtaccaggacttctcaggagggcggtgagcacatttggcaagccaccgggtgggctac	1046
	Q Y Q D F L R R A V S T F G K P P V G Y	
1047	gagagcccgtggttccacccgaaccagacgagcgtcagccagaacccccgactggaactgg	1106
	E S P W F H P N Q T S V S Q N P D W N W	
1107	tccaatcagagcgtgtggtcagggggacagcccacctcgccgcccctgggtggcagagttcc	1166
	S N Q S V W S G G Q P T S P P W W Q S S	
1167	accacggagcggccgctgtttgtcaacgcaactgagctgtcgcgggttctacctgtttgcc	1226
	T T E R P L F V N A T E L S R F Y L F A	
1227	aacgggcccgcgtatggcaatgccgccaacctctgctgcaggacctgacgacggagttt	1286
	N G P R Y G N A A N L L Q D L T T E F	
1287	gtgccgctgcacgggaa tcagcagacctttacgggat	1323
	V P L H G N Q Q T F T G	

Obr. 10: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence 5'RACE PCR produktu - start kodon vyznačen velkými písmeny a tučně, predikovaná sekvence signálního peptidu růžově, barevně označeny primery: AUAP, TFRACE-R5, Tf-Exp-F, přisyntetizovaná polyG sekvence podtržena

4.1.2. Zjištění zbývající sekvence Tf

Na základě sekvence získané 5'RACE PCR (Obr. 10) byl navržen primer Tf-Exp-F (za sekvencí kódující signální peptid), ten byl spolu s primerem Tf-Exp-R použit pro PCR amplifikaci celého genu Tf *Ixodes ricinus*, který byl zaklonován do vektoru pET100/D-TOPO[®] a sekvenací pomocí primeru T7R byla získána sekvence na jeho 3' konci. Zbývající část sekvence uvnitř genu byla zjištěna sekvenováním pomocí navržených genově specifických primerů TransfFsek a TransfRsek (Obr. 11).

1	ATG cggggttctcatcat	18
	M R G S H H	
19	catcatcatcatggatggctagcatgactgggtggacagcaaatgggtcgggatctgtac	78
	H H H H G M A S M T G G Q Q M G R D L Y	
79	gacgatgacgataaggatcatccctt caccctcgatgacgtgacttgggtg caccgtgagc	138
	D D D D K D H P F T L D D V T W C T V S	
139	gacatggaacacctcaagtgcactgagtttgccgagggcggttcgtgccagcaggacattc	198
	D M E H L K C T E F A E A V R A S R T F	
199	tcgcttgaactcaagtgcaagcgtgcccgccttcaaagaccagtgcattgaacttcccttgac	258
	S L Q L K C K R A A F K D Q C M N F L D	

259 aatggccaggtgcacctggtggagcttgatccccggggaggtctactcggccgggtcgtttc 318
N G Q V H L V E L D P G E V Y S A G R F
319 cacagcgtcatccccatcctggcagagcgctacggggccaggcaggaagctggctactac 378
H S V I P I L A E R Y G P G R E A G Y Y
379 tctgtggcagtggtccatgccaaagacagagtacaagtcgctcctggacctaagaacaag 438
S V A V V H A K T E Y K S L L D L K N K
439 tctgtgtgcttcacgagtggtgggagatggccgggtgggtcatccccatggccaccctg 498
S V C F T S V G D M A G W V I P M A T L
499 gtgcatgagaacgtccttgaagtaagcgactgcaacaaccttgtcaagagcgcctcgact 558
V H E N V L E V S D C N N L V K S A S T
559 ttctttgggcccagctgtgcccccaactcctcattgacaagcacaaccaacaggtgac 618
F F G P S C A P N S L I D K H N P T G D
619 aatccgcagaagatgtgagctgtgagcgccgcccctggggagcgtgctcgggcaac 678
N P Q K M C E L C G G R P G E R C S G N
679 gac **ccttacgccccctacca**ggggggcggtgaggtgcctggcggagcgcggagacgtggcc 738
D P Y A G Y Q G A V R C L A E R G D V A
739 tttgtgaagcacacgaccctggacgaggtgctgccccggggggccacgcctttcgcttg 798
F V K H T T L D E V L R G R G H A F R L
799 ctctgcccctcaggcgacacggctgctacggaccagttccggctcgtgcaactggggcttc 858
L C P S G D T A A T D Q F R S C N W G F
859 gtgcccgaatggtgtggtgaccacctcggacacacggctggccggtgccccgagcagtac 918
V P P N V V V T T S D T R L A V R E Q Y
919 caggacttctcaggagggcggtgagcacatttggcaagccaccgggtgggctacgagagc 978
Q D F L R R A V S T F G K P P V G Y E S
979 ccgtggttccaccgaaccagacgagcgtcagccagaaccccgactggaactggccaat 1038
P W F H P N Q T S V S Q N P D W N W S N
1039 cagagcgtgtggtcagggggacagcccacctcgccgcccctgggtggcagagttccaccacg 1098
Q S V W S G G Q P T S P P W W Q S S T T
1099 gagcggccgctgtttgtcaacgcaactgactgtgcgggttctacctgtttgccaacggg 1158
E R L F V N A T E L S R F Y L F A N G
1159 ccgcgctatggcaatgccccaacctcctgctgcaggacctgacgacggagtttgtgcccg 1218
P R Y G N A A N L L L Q D L T T E F V P
1219 ctgcaaggggaatcagcagacctttacgggatacctgggcaaagatgtggagctgttccac 1278
L H G N Q Q T F T G Y L G K D V E L F H
1279 aagttgcgcaagtgcccggtccatccggccaagttgtgctggtctctgacaaggaaatg 1338
K L R K C P V H P A K L C V V S D K E M
1339 gagaagtgccatcggatgaagactgccttcaagtacagatgctgaagccagacttgaac 1398
E K C H R M K T A F K S Q M L K P D L N
1399 tgcataagagcagagccatctgcagtgcatgcacatgatccgaaatgggtgttgcggac 1458
C I K S E S H L Q C M H M I R N G V A D
1459 ttggtgttctcggggccggggacatctatcgggcaggccagtcactcgggctgattccc 1518
L V V L G A G D I Y R A G Q S L G L I P
1519 ataattgccgaacaatacaatttggacgaaccataactactacgttgtggcagtgactttc 1578
I I A E Q Y N L D E P Y Y Y V V A V T F
1579 caaggggacaaggagacagacctgttgactctcaaagggcggcggtcgtgccacacgggc 1638
Q G D K E T D L L T L K G R R S C H T G
1639 atcaaccaggcggccggctgggtggtgcccctcagcttccctcatcagcaacgagcggatg 1698
I N Q A A G W V V P L S F L I S N E R M
1699 cgggtatacacgtgagactctccacgctcggcgtcggagttcttctccaagagctgcggt 1758
R V Y T C D S P R S A S E F F S K S C V
1759 cggggttcgctgtcgcgcgagtttgtgagctccgagcgcagctacaagaacctatgcgac 1818
P G S L S R E F V S S E R S Y K N L C D
1819 ctgtgccatggcatggggt **ccaacttctgccccgc**aacgcccgggagcctttctatggc 1878
L C H G M G S N F C G R N A A E P F Y G
1879 cacacgggggcttttcgctgcctggctcagggggcggcggcaacatcgcctttgtgaagcac 1938
H T G A F R C L V E G G G N I A F V K H
1939 acgactgtgtttgagaacacggcgggcccgaacagcatgtggtgggacgaaacatctcg 1998
T T V F E N T A G R N S M W W A R N I S
1999 cccggagactttgagctgggtgtgcccgcgacggctcgcgacggctcgcaggacaagtacgcc 2058
P G D F E L V C R D G S R R S Q D K Y A

2059	gagtgcaacctgggcaaggtggcttccaatgccattgtgaccagtcctgggcaagccacag	2118
	E C N L G K V A S N A I V T S P G K P Q	
2119	cacgtgatcgacgcctacatcgacctgttcgtgtacgcgcagcagttctacgggtccaag	2178
	H V I D A Y I D L F V Y A Q Q F Y G S K	
2179	tacagccaggacttcaccttcaaggtgtttgtctccgagtcggcctaccgcgactttatc	2238
	Y S Q D F T F K V F V S E S A Y R D F I	
2239	tttcaggactcggcacagcaactcaaaccagtgacctctggcacgccgaattacagggac	2298
	F Q D S A Q Q L K P V P L A R R N Y R D	
2299	tacctgggctccgacttcctgcaggcggtagctctcgtcgcactgctcggcggccggctcg	2358
	Y L G S D F L Q A V R L V D C S A A G C S	
2359	ctcgtgccccgcctctcgtcctcagggccgcactgggtgtgggctcggctggctggcctTGA	2418
	L A A R L S L T A A L V W A A R L L A *	

Obr. 11: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence rekombinantního proteinu Tf: start a stop kodon vyznačeny velkými písmeny a tučně, sekvence vektoru označena světle šedě, sekvence His-tagu podtržena, barevně označeny primery: Tf-Exp-F, Tf-Exp-R, TransfFsek, TransfRsek, teoretická molekulová hmotnost je 90,2 kDa, pI = 7,46

Na základě získaných sekvencí byla vytvořena kompletní sekvence Tf *Ixodes ricinus* (Obr. 12).

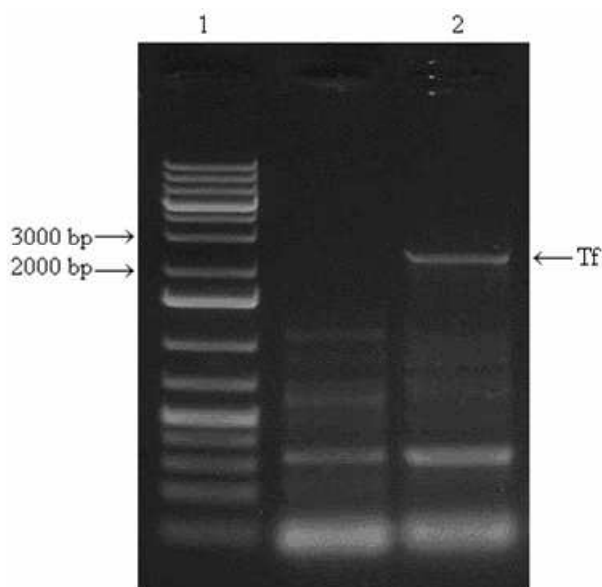
1	ATG cggtggctcgtcgtcctggctcgcagttttgcac	36
	M R W S S S W L A V L H	
37	cttggtttagccacgctcgtcttctgggctggggcctcgatgacgtgacttgggtgcacc	96
	L G L A H V A L L G W G L D D V T W C T	
97	gtgagcgcacatggaacacctcaagtgcactgagtttgcgaggcgggttcgtgccagcagg	156
	V S D M E H L K C T E F A E A V R A S R	
157	acattctcgttgcaactcaagtgcaagcgtgccccttcaaagaccagtgcatgaacttc	216
	T F S L Q L K C K R A A F K D Q C M N F	
217	cttgacaatggccaggtgcacctgggtggagcttgatccccggggaggtctactcggccggt	276
	L D N G Q V H L V E L D P G E V Y S A G	
277	cgtttccacagcgtcatccccatcctggcagagcgtacggggccaggcaggggaagctggc	336
	R F H S V I P I L A E R Y G P G R E A G	
337	tactactctgtggcagtggtccatgccaaagacagagtacaagtcgctcctggacctaaag	396
	Y Y S V A V V H A K T E Y K S L L D L K	
397	aacaagtctgtgtgcttcacgagtggtgacatggccggctgggtcatccccatggcc	456
	N K S V C F T S V G D M A G W V I P M A	
457	accctgggtgatgagaacgtccttgaagtaagcactgcaacaaccttgtcaagagcgc	516
	T L V H E N V L E V S D C N N L V K S A	
517	tcgactttcttgggcccagctgtgcccccaactccctcattgacaagcacaaccaaca	576
	S T F F G P S C A P N S L I D K H N P T	
577	ggtgacaatccgcagaagatgtgagcgtgtgcccggccgcccctggggagcgtgctcg	636
	G D N P Q K M C E L C G G R P G E R C S	
637	ggcaacgaccttacgcgggctaccagggggcgggtgcggtgctggcgggagcgcggagac	696
	G N D P Y A G Y Q G A V R C L A E R G D	
697	gtggcctttgtgaagcacacgacctggacgaggtgctgccccggggggccacgccttt	756
	V A F V K H T T L D E V L R G R G H A F	
757	cgcttgctctgcccctcaggcgacacggctgctacggaccagttccggctcgtgcaactgg	816
	R L L C P S G D T A A T D Q F R S C N W	
817	ggcttcgtgcccgaatggtgtgggtgaccacctcggacacacggctggccggtgcgggag	876
	G F V P P N V V V T T S D T R L A V R E	
877	cagtaccaggacttcctcaggagggcggtagcacatttggcaagccaccgggtgggctac	936
	Q Y Q D F L R R A V S T F G K P P V G Y	
937	gagagcccgtggttccaccgaaccagacgagcgtcagccagaaccccgactggaactgg	996
	E S P W F H P N Q T S V S Q N P D W N W	
997	tccaatcagagcgtgtggtcagggggacagcccactgcgccctgggtggcagagttcc	1056
	S N Q S V W S G G Q P T S P P W W Q S S	
1057	accagggagcggcgtgtttgtcaacgcaactgagctgtcgcggttctacctgtttgcc	1116
	T T E R P L F V N A T E L S R F Y L F A	

1117	aacgggcccgcgctatggcaatgccgccaacctcctgctgcaggacctgacgacggagttt	1176
	N G P R Y G N A A N L L L Q D L T T E F	
1177	gtgccgctgcacgggaatcagcagacctttacgggatacctgggcaaagatgtggagctg	1236
	V P L H G N Q Q T F T G Y L G K D V E L	
1237	ttccacaagttgcaagtgcccggtccatccggccaagttgtgctgggtctctgacaag	1296
	F H K L R K C P V H P A K L C V V S D K	
1297	gaaatggagaagtgccatcgatgaagactgccttcaagtacagatgctgaagccagac	1356
	E M E K C H R M K T A F K S Q M L K P D	
1357	ttgaactgcatcaagagcagagccatctgcagtgcacatgatccgaaatgggtgtt	1416
	L N C I K S E S H L Q C M H M I R N G V	
1417	gccgacttgggttctcggggccgggacatctatcgggcaggccagtcactcgggctg	1476
	A D L V V L G A G D I Y R A G Q S L G L	
1477	attcccataattgccgaacaatacaatttgacgaaccatactactacgttgtggcagtg	1536
	I P I I A E Q Y N L D E P Y Y Y V V A V	
1537	actttccaaggggacaaggagacagacctggtgactctcaaagggcggcggtcgtgccac	1596
	T F Q G D K E T D L L T L K G R R S C H	
1597	acgggcatcaaccaggcggccggctgggtgggtgccctcagcttctcatcagcaacgag	1656
	T G I N Q A A G W V V P L S F L I S N E	
1657	cggatgcgggtatacacgtgcgactctccacgctcggcgtcggagttcttctccaagagc	1716
	R M R V Y T C D S P R S A S E F F S K S	
1717	tgcgttccgggttcgctgtcgcgcgagtttgtgagctccgagcgcagctacaagaacct	1776
	C V P G S L S R E F V S S E R S Y K N L	
1777	tgcgacctgtgccatggcatgggtccaacttctgcggtcgcaacgcggcggagcctttc	1836
	C D L C H G M G S N F C G R N A A E P F	
1837	tatggccacacgggggcttttcgctgcctggctgagggcggcggaacatcgctttgtg	1896
	Y G H T G A F R C L V E G G G N I A F V	
1897	aagcacagactgtgtttgagaacacggcgggccaacagcatgtggtgggcacgaaac	1956
	K H T T V F E N T A G R N S M W W A R N	
1957	atctgccccgagactttgagctgggtggccgcgacggctcgcgacggctcgcaggacaag	2016
	I S P G D F E L V C R D G S R R S Q D K	
2017	tacgccgagtgcaacctgggcaaggtggctccaatgccattgtgaccagtcccggcaag	2076
	Y A E C N L G K V A S N A I V T S P G K	
2077	ccacagcaactgatcgacgcctacatcgacctgttcgtgtacgcgcagcagttctacggg	2136
	P Q H V I D A Y I D L F V Y A Q Q F Y G	
2137	tccaagtacagccaggacttcaccttcaaggtgtttgtctccgagtcggcctaccgcgac	2196
	S K Y S Q D F T F K V F V S E S A Y R D	
2197	tttatctttcaggactcggcacagcaactcaaaccagtgctctggcagcggcgaattac	2256
	F I F Q D S A Q Q L K P V P L A R R N Y	
2257	agggactacctgggctccgacttccctgcagggcgtacgtctcgtcgactgctcggcggcc	2316
	R D Y L G S D F L Q A V R L V D C S A A	
2317	ggctcgtcgtcgtcccgccctctcgtcaccggccgcaactgggtgtgggcggtcggctcgtg	2376
	G S L A A R L S L T A A L V W A A R L L	
2377	gccTGA	2382
	A -	

Obr. 12: Kompletní nukleotidová a aminokyselinová sekvence Tf *Ixodes ricinus*: start a stop kodon vyznačeny velkými písmeny a tučně, predikovaná sekvence signálního peptidu růžově, úsek použitý pro RNAi podtržen, barevně označeny primery: TfrNAiF, TfrNAiR

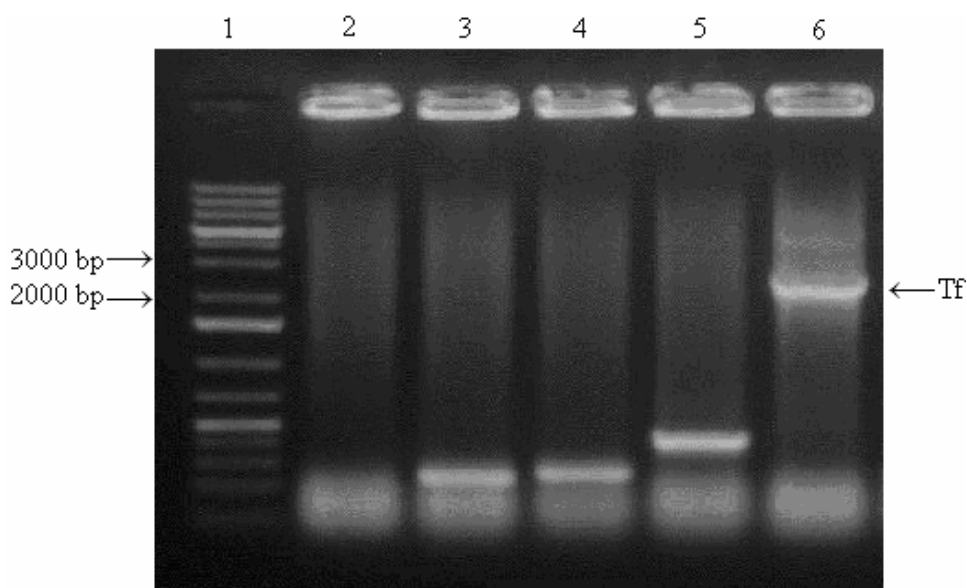
4.2. Expresse rekombinantního proteinu Tf

Ze slinných žláz klíštěte *Ixodes ricinus* byla získána cDNA, z ní byl následně pomocí PCR s primery Tf-Exp-F a Tf-Exp-R amplifikován gen pro Tf (bez sekvence kódující signální peptid) (sekvence viz Obr. 11).



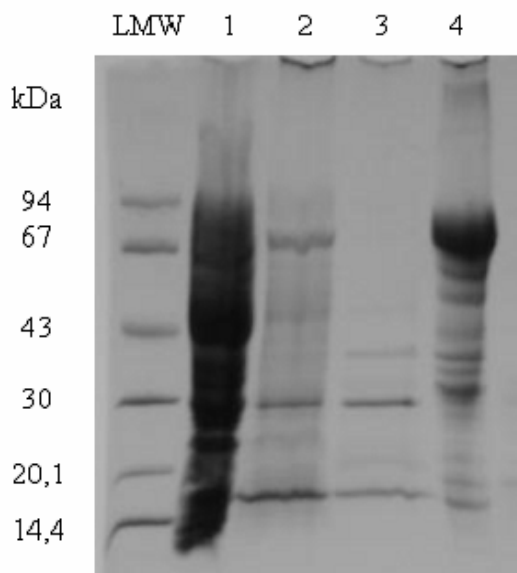
Obr. 13: Amplifikace genu Tf: 1 - GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder, 2 - PCR produkt obsahující gen Tf

Získaný Tf gen byl po izolaci z gelu (Obr. 13) ligován do expresního vektoru pET100/D-TOPO® (Invitrogen), plazmid byl následně zaklonován do One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Pomocí PCR s primery T7F a T7R byl identifikován pozitivní klon (Obr. 14) a provedena sekvenace.



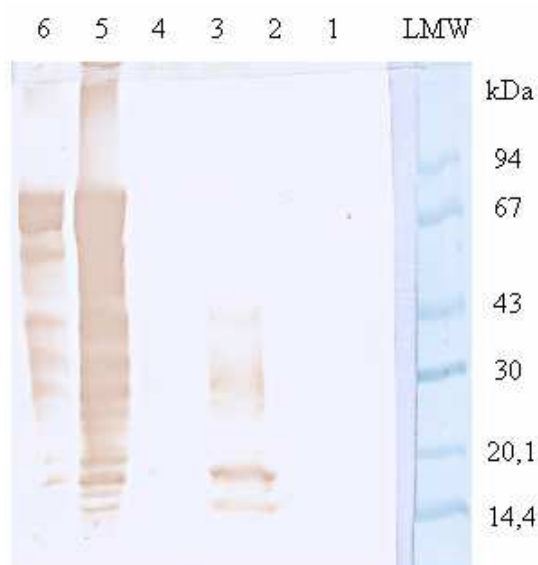
Obr. 14: Ověření přítomnosti insertu ve vybraných koloniích: 1 - GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder, 2 - 6 - testované kolonie, 6 - pozitivní klon - izolovaný plazmid použit k transformaci do expresních buněk BL21 Star (DE3) OneShot® Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen)

Plazmid pET100 byl po izolaci z pozitivní kolonie transformován do expresních buněk BL21 Star (DE3) OneShot[®] Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen). Po kultivaci byl bakteriální lyzát postupně rozdělen na jednotlivé frakce (cytoplazmatická, membránová, inkluzní tělíska) a ty následně analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 15).



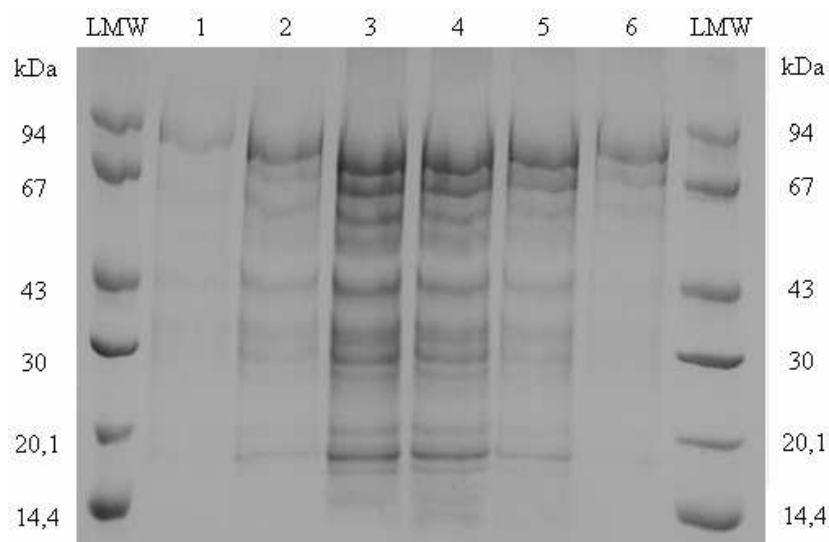
Obr. 15: SDS PAGE analýza jednotlivých proteinových frakcí: LMW, 1 - cytoplazmatická frakce, 2 a 3 - membránová frakce, 4 - frakce inkluzních tělísek

Provedená SDS-PAGE analýza prokázala přítomnost proteinu o velikosti odpovídající rekombinantnímu Tf (90,2 kDa) ve frakci inkluzních tělísek (Obr. 15). Jeho přítomnost byla ověřena metodou Western blot za použití myší monoklonální protilátky proti His-tagu (SIGMA).



Obr. 16: Detekce rekombinant. Tf pomocí protilátky proti His-tagu: LMW, 1 - cytoplazmatická frakce, 2 - cytoplazmatická frakce ředěná 1:5, 3 a 4 - membránová frakce, 5 - frakce inkluzních tělísek, 6 - frakce inkluzních tělísek ředěná 1:5

Přítomnost rekombinantního Tf ve frakci inkluzních tělísek byla Western blotem potvrzena (Obr. 16). Kromě tohoto proteinu reagovala protilátka proti His-tagu s řadou proteolytických štěpů, které nejspíš vznikly proteolýzou během exprese, izolace nebo purifikace. Frakce inkluzních tělísek byla následně purifikována chelatační chromatografií využívající afinitu His-tagu k Ni^{2+} iontům. Purifikace probíhala v prostředí 8M močoviny, rekombinantní Tf byl z kolony eluován zvyšující se koncentrací imidazolu a detekován spektrofotometricky. Vybrané frakce byly analyzovány pomocí SDS-PAGE (Obr. 17).

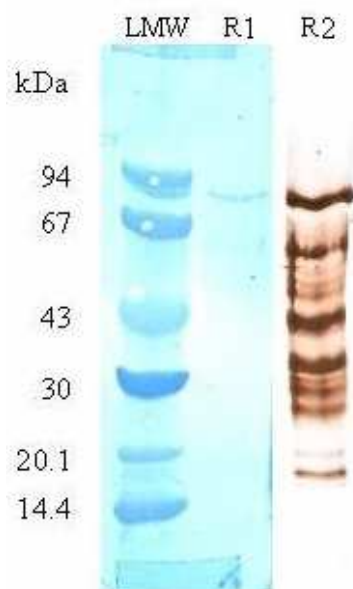


Obr. 17: SDS-PAGE analýza chromatograficky získaných frakcí: LMW, 1 - 6 - jednotlivé frakce

SDS-PAGE analýza prokázala přítomnost proteinu o velikosti rekombinantního Tf (90,2 kDa) a řady proteolytických štěpů. Tyto štěpy byly rozeznány při SDS-PAGE analýze po chromatografické purifikaci (afinita His-tagu k Ni^{2+} iontům) i při analýze rekombinantního proteinu Western blotem (protilátka proti His-tagu).

4.3. Příprava králičích polyklonálních protilátek a kontrola jejich funkce

Protilátky byly připraveny imunizací králíka suspenzí precipitátu vzniklého při refoldingu rekombinantu. Kontrola funkce protilátek byla provedena metodou Western blot proti rekombinantnímu Tf. Králičí protilátka rovněž rozpoznávala kromě celého Tf i jeho proteolytické štěpy (Obr. 18).

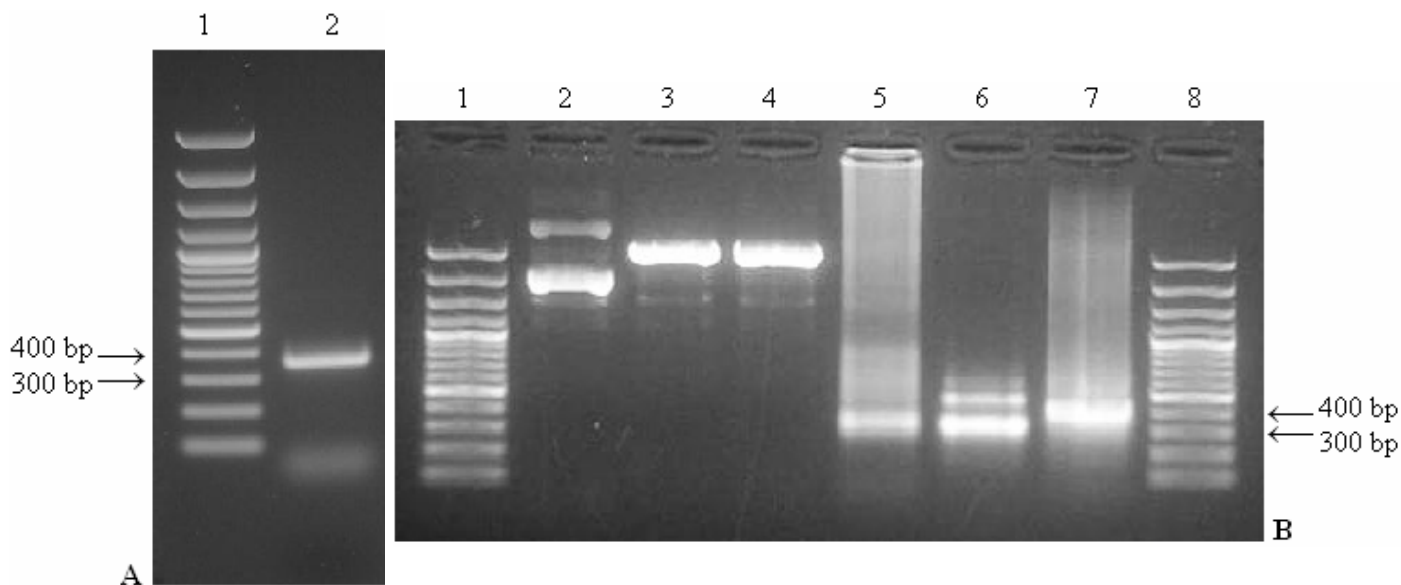


Obr. 18: Western blot kontrola funkce protilátek: LMW, R1 a R2 - rekombinantní Tf ředěný 1:10, LMW a R1 - barveno Amidoblackem, R2 - detekce králičí protilátkou, barveno DAB

4.4. RNAi experiment

4.4.1. Syntéza dsRNA

Pomocí PCR s primery TfRNAiF a TfRNAiR byl amplifikován úsek cDNA vybraný pro tvorbu dsRNA (vyznačen na Obr. 12 - úsek 1967-2307bp v kompletní sekvenci Tf). Tento úsek byl následně podle RNAi protokolu ligován do plazmidu p110, ten byl štěpen restričními enzymy ApaI a XbaI a vytvořena dsRNA (Obr. 19).

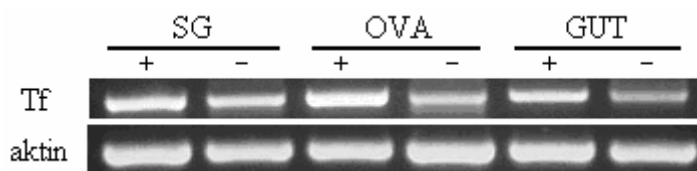


Obr. 19: Příprava Tf dsRNA: panel A - PCR amplifikace úseku cDNA: 1 - GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, 2 - PCR produkt, panel B - kontrola plazmidu, štěpení restričními enzymy a tvorba dsRNA: 1 a 8 - GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, 2 - neštěpený plazmid p110, 3 - plazmid štěpený ApaI, 4 - plazmid štěpený XbaI, 5 - sense ssRNA, 6 - antisense ssRNA, 7 - dsRNA

4.4.2. Tkáňový profil (RT-PCR) a expresní tkáňový profil

Vytvořená dsRNA byla mikrokapilárou injikována do samic klíštěte, současně byla provedena kontrolní injekce GFP dsRNA (předem vytvořena v naší laboratoři podle stejného protokolu). Po injekci byly samice ponechány jeden den ve vlhkém prostředí ve zkumavce a poté následovalo sání na morčeti až do úplného nasátí.

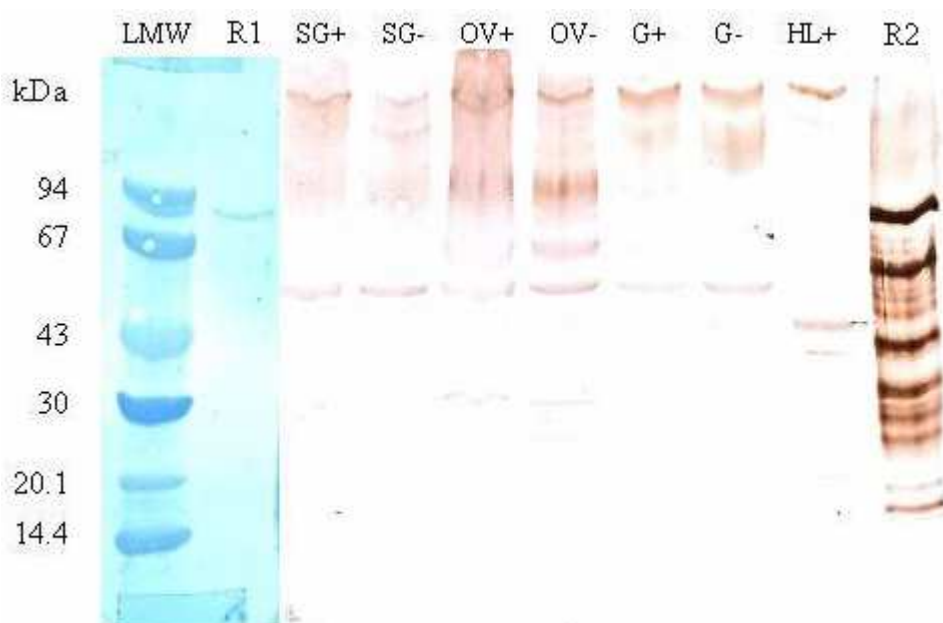
Po skončení sání byly z klíšťat izolovány jednotlivé tkáně (slinné žlázy, vaječníky, střevo), následovala izolace RNA a tvorba cDNA (pro RT-PCR) a analýza exprese (Western blot).



Obr. 20: Tkáňový profil Tf vytvořený pomocí RT-PCR: SG - slinné žlázy, OVA - vaječníky, GUT - střevo, symbolem + označeny tkáně z klíšťat injikovaných GFP dsRNA, symbolem - označeny tkáně z klíšťat injikovaných Tf dsRNA, aktin použit jako kontrola

RT-PCR byla prokázána přítomnost Tf ve všech tkáních (Obr. 20), RNAi tedy nevedla k úplnému umlčení exprese genu, přesto byla hladina RNA snížena.

Dále jsem se pokusila analyzovat expresi proteinu Tf v tkáních izolovaných z klíšťat po injikaci Tf dsRNA a kontrolní GFP dsRNA.



Obr. 21: Western blot analýza exprese Tf v homogenátech tkání: LMW, R1 a R2 - rekombinantní Tf ředěný 1:10, SG - slinné žlázy, OV - vaječníky, G - střevo, HL - hemolymfa, symbolem + označeny tkáně z klíšťat injikovaných GFP dsRNA, symbolem - označeny tkáně z klíšťat injikovaných Tf dsRNA, LMW a R1 - barveno Amidoblackem, SG+ - R2 - detekce králičí protilátkou, barveno DAB

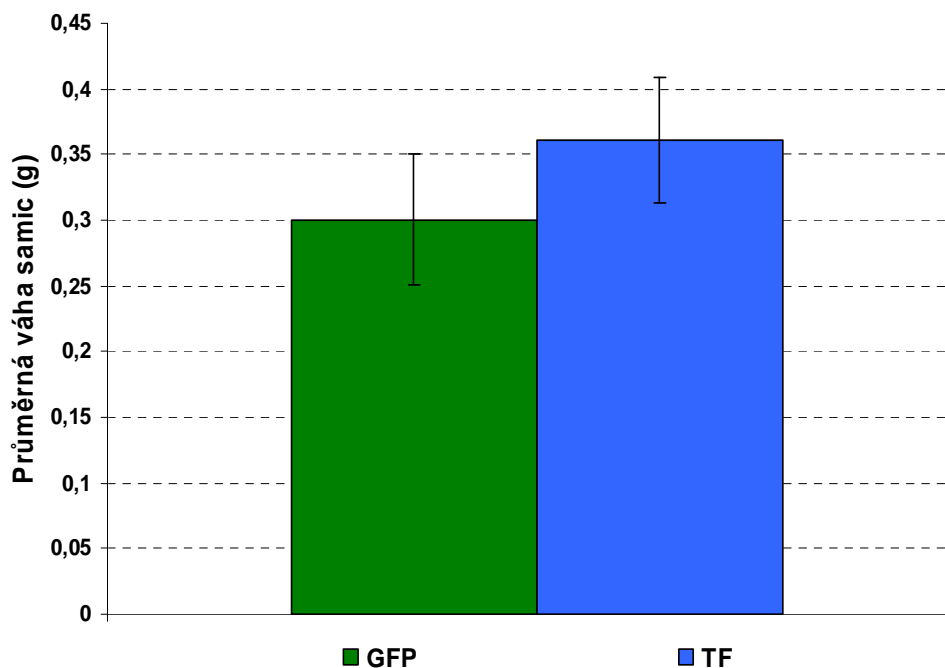
Western blotem nebyla detekována exprese Tf v žádné z tkání (Obr. 21), důvodem je nejspíš nízká hladina exprese nebo její úplná absence.

4.4.3. Vliv umlčení genu Tf na přežívání a sání samic

Po injikaci kontrolní GFP dsRNA a Tf dsRNA byla sledována schopnost samic plně se nasát a po sání byla srovnávána jejich hmotnost (Tab. 3).

Tab. 3: Vliv umlčení genu Tf

Typ injikované dsRNA	Počet nasátých samic	Průměrná hmotnost (g)
GFP	25 z 25	0,301 ($\pm 0,049$)
Tf	24 z 25	0,361 ($\pm 0,047$)

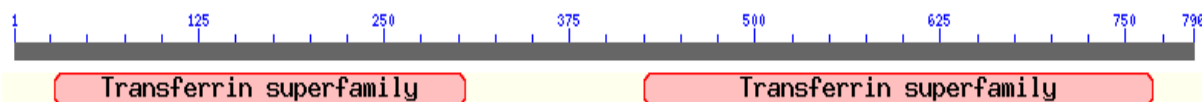


Obr. 22: Porovnání průměrné hmotnosti nasátých samic po injikaci GFP dsRNA a Tf dsRNA

Porovnání schopnosti sání a průměrné hmotnosti samic po injikaci GFP dsRNA a Tf dsRNA nevedlo ke zjištění žádného výrazného rozdílu, dokonce bylo zjištěno nepatrné zvýšení hmotnosti po injikaci Tf dsRNA (Obr. 22), ale vzhledem k neúplnému umlčení exprese genu Tf jsou výsledky tohoto pozorování neprůkazné.

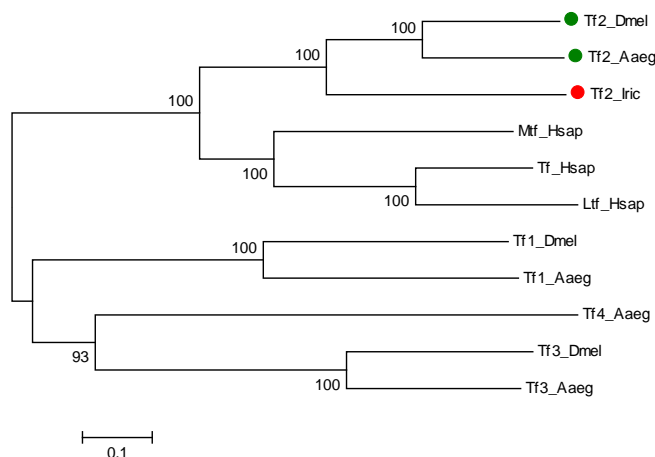
5. Diskuze

Na základě získané sekvence bylo zjištěno, že transferin z klíštěte *Ixodes ricinus* obsahuje podobně jako další transferiny dvě konzervované domény (Obr. 23).



Obr. 23: Transferinové domény

Na základě porovnání získané sekvence Tf *Ixodes ricinus* se sekvencemi transferinů z jiných organismů byl vytvořen fylogenetický strom (Obr. 24). Z tohoto stromu je patrné, že patří do skupiny transferinů typu 2 (melanotransferiny).



Obr. 24: Fylogenetický strom transferinů u člověka, *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* a *Ixodes ricinus*: Nezakořeněný strom byl vytvořen na základě aminokyselinových sekvencí metodou Neighbor-joining (NJ), sekvence byly porovnány pomocí programu ClustalX. Čísla u kořenů větví představují hodnoty bootstrapu spočítané pomocí metod NJ a minimal evolution s 1000 opakováními pro každou hodnotu. Měřítko představuje vzdálenost 0.1 substituce na jednu aminokyselinu. Tf2 *Ixodes ricinus* (označen červeně) patří do skupiny transferinů2 (označeny zeleně).

Dále bylo prokázáno, že aminokyseliny důležité pro vazbu železa jsou oproti lidskému Tf více než z 50% modifikovány (Obr. 25). Některé z těchto modifikací jsou stejné i u Tf2 (MTf) *Drosophila melanogaster*, což společně s přítomností místa potenciální GPI (glykofosfatidylinositol) modifikace (kotvy) v Tf2 *I. ricinus* naznačuje, že by mohly plnit stejnou funkci. Funkce Tf2 (MTf) *D. melanogaster* byla popsána teprve nedávno - jde o membránově vázaný protein (vazba přes GPI kotvu), který je složkou přepážkových spojů („septate junction“) tvořících propustné mezibuněčné spojení v epitelálních tkáních (Tiklová a kol., 2010).

TF-Ixodes	1	MRWSSSLAWLHLCLAHVALLCGCLD LVDT-----MC TVSDYBHLRCKTEFAEAVRASR-----T ESLQTRCR R A FKD QCL
HumanTF	1	----- RLAVGALVCA MLGLCLAV PKT VR-----MC AVS EBEA TKC QSFRDH AKSVI P-----SDG PS AC VVK KASY LDC H
Dm-Tf2	1	MAS SLV F ALV GM LC FT LANA QH HD HK T - TRM WC TR S QAB Q YK C Q NL TVA ERD RAL TF EV FL NLT CF MAY SAD EC H
AaegTF2	1	-- HQL VL LFW LL LF S GL CY CH HN EN W EL CG TE LI MC ATS EV EL YK CR NLT VA LER D HCL FD NY FL W VS CF CP DQ D EC H
TF-Ixodes	71	N FD LM Q VEL W ED D CE VY S AG - R H S VI PI TA ER Y CP ER-- E AG Y SV AV WH-- A RT EY RS LD LR NR S V CF T SV GD ME
HumanTF	69	R AT A AN ED CA NT LD AG L V Y DA Y LA P NN LE PT VA EF Y GS K ED PC T F Y AV AV V RR KDS CF Q LN-- Q LR CK RS CH CL GR SA
Dm-Tf2	80	H HT RE KA HT TT LD AC D V ET AG - R Y N SL IP IM Q ER LE CG-- E AD Y Q S V AV IK KS IP DL ANN LD M NR K R V CF FP V GS LA
AaegTF2	79	R LI TE CK A H AM LD ACE VY T AG - R H S L V P IM Q EC Y D CG-- F T Q Y H AV AV IK KDS I RE WT SL R HL R CK R K AC PS W V GS Y A
TF-Ixodes	146	G W IP EA T L W H EM V L EV SD C ML V RS AS T F CP S CA PN SL LD R HM PT CD NP Q KK CL CC ER - P GR EC SC ND PY AG Y Q CA V
HumanTF	146	G GN IP IG L Y CD--- L PE PR K PL ER AV AN F SC SC AP----- C AD G T D F P QL CL LC--- P CC CS T LN Q Y CF YS GA F
Dm-Tf2	156	G W IP I HT LQ RE CG ME VD C NN Q V RT AS Y F MM S CA V Y SL SD R H MP IG DN SD KL CL LC T CK IP CG CC S AD P Y CF Y E GA F
AaegTF2	155	G W IP I Y TL Q RE CG ME VD C NN H V RT A D Y F CP S CA V ML VD R Y NP IG DN SD KL CL LC T CK IP CG CC SP SD PY AG F E GA F
TF-Ixodes	225	R CL AE R GD V AF UK HT TD EV IR G----- R - CH AF RL LC PS GD TA AT DQ FR SC MC RV PP NV W VT TS D TR LA V RE Q Y Q D E
HumanTF	212	R CL RE CA GD V AF UK HT IF EN LAN --- K AD RD Q Y EL L CL DN TR PV DE Y ED CH LA Q V PS HT W ARS IC -- E K D L I W EL
Dm-Tf2	236	R CL LE R GD V AF LR HT TV NE IQ TT EP NT AD TF EL LC DD CP AS IN D Y RC NC Q V PA DA IV TS ARS FS DR Q Y Q D E
AaegTF2	235	Q CL LE A GD V AF LK HT TV NE IQ ES GL VE GV TD Q F EL LC DD CP VS Y TR Q CH Q LA CS AM W V SS ARS T AR RR Y K R E
TF-Ixodes	298	L RR AV ST CK PP V G Y ES P W F H P N Q T S V S Q MP D IN WS Q S W VS CG Q PT SP PW Q SS T TE RP ----- L EV--- N - A EL
HumanTF	286	L N Q AQ EH CK ----- DK -----
Dm-Tf2	315	L K R IA EL Y SD GT ED DS R Q CG QS F NS RM IN D Q MA Y Q Q - E DN D PY RT Q ND Q Y R S E LD SS -FA ER N Q D GT MT S IL
AaegTF2	314	F T Q W ML Y SS RT RS MS TL SS LD D RY R Q ND R MS NR -Y DA R AD D RF R ET TT TT TE RY S Y CG FN ER S FE - Q NET Q F
TF-Ixodes	366	S R F L F AN CP RY Q NA ML L LD EL LT E F V EL H Q N Q Q T F CY LC - K D VE LF H K ER K-- CP W HP AK LC W SD - R EM ER K CH IR M E
HumanTF	298	S K LR Q LF S EP -H GR D -- L L R DS A H G FL R V PP - R MD AK N Y L G Y E Y W T AT RM RE CT CP E AP TD E CK P V K W CA SH HE RL R
Dm-Tf2	393	Y E K R IF E S R Y CG P -W LL F DS S EA T W IP ED D Q S TR Y LC -P AL NI Y CI RE-- CP W P AN T LC V T SE - N E LD K C IR M E
AaegTF2	392	Y E K D LF E S R Y CR Q IN L H Q D T AR Y AP TE EN Q Q FN Y LC -S EL D Y I Y CV RS-- CP VS R UT LC V T SE -A EM ER K C IR M E
TF-Ixodes	442	T AF ES Q ML K P DL NC IES ESH Q CM EM IR MG V AD LV VL CA GD TY AG Q SL CL IP I AR Q YN LD E ----- P Y Y W AV W T F
HumanTF	374	C D EW S V NS V CK IE CV SA ET TE DC IA R IM NG EA D MS LD CF EV Y LAG - FC GL VP V LA EM Y NR KS OM CD TP C AG Y RA V AV W E
Dm-Tf2	468	T AL K A HL IK P EL IC R EM H SM CM Q F EA CK AD TS W F AG D V Y T C CL NY DL VP F MS EV Y NL CE ----- P E Y W AV AV R
AaegTF2	468	T AL K A QL IK P EM QC FA HS H DC MP HW NS Q AD W IV LD AS D V Y T C CL K Y DL LP F MS EV Y DL C Q----- P E Y W AV AV R
TF-Ixodes	515	Q CK ET D L L TK R RS CH IC IN QA CG W VP IS EL IS NR EW Y TC D SP ES SE FF SK CV PG ST SR EV SS ERS Y K N
HumanTF	453	K S AS DL T WD N L R GR RS CH TA NG RI AG GM IP MC LL Y N --- R IN H CR--- F DE FF EG CA PG SK K--- D SS-----
Dm-Tf2	541	E DD PD T EL TY L K CR NT CH IC IN TA AG TY PM AL IS NG W IR PY CG DS Y RA AA E Y TK SC V PG AI S NE Y NT IC - W PY D S
AaegTF2	541	E DD PD T EL TY L R Y T CH SC IN TA AG TY PM AL IS NG W IR PY CG DS Y RA AA E Y TK SC V PG AI S NE Y NS C - W PY D N
TF-Ixodes	592	L CD L CH EM CS NE CC RM A EP Y CH T GA F R CL VE CG CM L AF WR HT TV F ENT AG NS MM W ARN IS EC DF EL V CR DC S RR S D
HumanTF	510	L CL LC MG S CL ML CE PM NR E Y CY TC AF R CL VE CG -D VA F VR Q TV P Q NT CG R NP Q W AR N LN ER D VEL L CL DC T R K W E
Dm-Tf2	614	M CD L CH CT SY RY CR DA SE E Y CH T GA F R CL VE CG CH V AF R K HT TV MS TC CK RR EW ARN EL MD DF EL L CL DC T R A EL C
AaegTF2	614	L CB L CH GS SY RY CR DA SE E Y CH T GA F R CL VE CG CH V AF V R HT TV V ENT CG CK R EW ARN LD P DD F EL L CL DC T R A EV N
TF-Ixodes	672	K RA EC ML GR W AS AI VT SP CS-- P QH V DA Y ID LF Y A Q Q F Y CS YS Q DF - F K W VS ES AY ED F IF Q SA Q CL RP V LA
HumanTF	589	E Y AN CH LA AP NP AV VT R K D --- E --- AC V H K IL R Q Q HL FS N V T DC SC MF CL RE SET -- S DL L RE DD TV CL AK LH - E
Dm-Tf2	694	D Y K EC ML GR W K AA AV VT RC W Y NET Q MA Y IN LL TY A Q Q Y GR EV DA FS -F S MR SS PI CH Y DL IF Q D AT R CL Q VI IP N
AaegTF2	694	E Y K EC ML GR W K AA AV VT RC GS Y NA T Q MA F IN L F TY A Q Q F Y GR ED ANE FS - F S L Y S NP F Y ED L IF Q D AT R EL IF CL
TF-Ixodes	749	R W Y RD Y LC SD FI Q AV RI V SE AG S LA AR LS TA AL W A ER LA ---
HumanTF	660	R NT Y RY LC E Y Y W AW C N L R CK ST SS L EA C AF RP ---
Dm-Tf2	773	R RY DA YL CS DF MR ARR IT DC H AG AS CL ALS--- V EL L LV GS V AM L
AaegTF2	773	R RW DA YL CA DF MR ARR IT DC H AG AS CL RL S LN VAL L L EL Y K L L

Obr. 25: Porovnání aminokyselinové sekvence Tf2 *Ixodes ricinus* se sekvencemi transferinu člověka, *Drosophila melanogaster* Tf2 a *Aedes aegypti* Tf2: fialově označena signální sekvence Tf2 *I. ricinus*, žlutě a modře označeny aminokyseliny důležité pro vazbu Fe na N-konci a C-konci proteinu - zeleně a znaménkem + označena shoda s lidským transferinem, červeně a znaménkem - označena rozdílnost sekvence, zeleně - C - označeno predikované potenciální místo GPI modifikace

Předpokládáme tedy, že Tf2 je membránově vázaný protein plnicí obdobnou funkci jako Tf2 (MTf) *D. melanogaster* (Tiklová a kol., 2010). Tato skutečnost by vysvětlovala absenci klíštěcího Tf2 v hemolymfě.

RT-PCR byla prokázána mRNA exprese ve všech zkoumaných tkáních (slinné žlázy, vaječníky, střevo). Analýza exprese proteinu Western blotem neprokázala jeho přítomnost v žádné z tkání, důvodem je nejspíš nízká hladina exprese. Pro lokalizaci proteinu by patrně byla vhodnější mikroskopická imunolokalizace za použití vytvořené protilátky.

Rekombinantní protein Tf2 (90,2 kDa, pI 7,46) byl exprimován v bakteriálním systému a s použitím tohoto rekombinantu byly připraveny protilátky. Kromě proteinu o předpokládané velikosti byla detekována řada proteolytických štěpů, které byly rozeznány při SDS-PAGE analýze po chromatografické purifikaci (afinita His-tagu k Ni^{2+} iontům), při analýze rekombinantního proteinu Western blotem (protilátka proti His-tagu) i při ověření funkce králičí protilátky. Tyto štěpy nejspíš vznikly proteolýzou během exprese, izolace nebo purifikace.

RNAi experiment nevedl ke zjištění žádného výrazného rozdílu ve schopnosti samic plně se nasát. Při srovnání hmotnosti nasátých samic bylo dokonce zjištěno nepatrné zvýšení hmotnosti po injekci Tf2 dsRNA, ale vzhledem k neúplnému umlčení exprese genu Tf2 jsou výsledky tohoto pozorování neprůkazné. Vzhledem k nedávno prokázané funkci Tf2 (MTf) *D. melanogaster* (Tiklová a kol., 2010) bude zřejmě nutné hledání příslušného fenotypu po RNAi eliminaci Tf2 zaměřit na strukturní vlastnosti epiteliálních tkání.

6. Závěr

V klíštěti *Ixodes ricinus* byl identifikován gen kódující transferin. Byla zjištěna jeho kompletní nukleotidová sekvence (2382 bp). Porovnáním se sekvencemi transferinů jiných organismů bylo zjištěno, že patří do skupiny transferinů typu 2 (melanotransferiny). V bakteriálním expresním systému byl produkován rekombinantní protein Tf2 (90,2 kDa, pI = 7,46) a s jeho pomocí byla imunizací králíka připravena protilátka detekující tento rekombinant. Metodou RT-PCR byla prokázána exprese Tf2 mRNA ve všech zkoumaných tkáních, Western blot neprokázal přítomnost proteinu Tf2 v žádné z tkání. Umlčení exprese pomocí RNAi nebylo úplně úspěšné, přesto byla hladina mRNA snížena. RNAi experiment nevedl ke zjištění žádného výrazného rozdílu ve schopnosti samic plně se nasát. Při srovnání hmotnosti nasátých samic bylo dokonce zjištěno nepatrné zvýšení hmotnosti po injikaci Tf2 dsRNA, ale vzhledem k neúplnému umlčení exprese genu Tf2 jsou výsledky tohoto pozorování neprůkazné.

7. Použitá literatura

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW a kol. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.

Aisen P (1998) Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells. *Met Ions Biol Syst* 35: 585-631.

Aljamali MN, Sauer JR, Essenberg RC (2002) RNA interference: applicability in tick research. *Exp Appl Acarol* 28: 89-96.

Aljamali MN, Bior AD, Sauer JR, Essenberg RC (2003) RNA interference in ticks: a study using histamine binding protein dsRNA in the female tick *Amblyomma americanum*. *Insect Mol Biol* 12: 299-305.

Barker SC, Murrell A (2008) Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Tick - Biology, Disease and Control*, eds Bowman AS a Nuttall PA (Cambridge University Press, Cambridge) pp 1-39.

Bartfeld NS, Law JH (1990) Isolation and molecular cloning of transferrin from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Sequence similarity to the vertebrate transferrins. *J Biol Chem* 265: 21684-21691.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonucleose in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.

Braz GR, Coelho HS, Masuda H, Oliveira PL (1999) A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Curr Biol* 9: 703-706.

Carmell MA, Xuan Z, Zhang MQ, Hannon GJ (2002) The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 16: 2733-2742.

Carmell MA, Hannon GJ (2004) RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 11: 214-218.

Cerutti H, Casas-Mollano JA (2006) On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet* 50: 81-99.

Cogoni C, Macino G (2000) Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr Opin Genet Dev* 10: 638-643.

Decrem Y, Mariller M, Lahaye K, Blasioli V, Beaufays J, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Cérutti M, Brossard M, Vanhamme L, Godfroid E (2008) The impact of gene knock-down and vaccination against salivary metalloproteases on blood feeding and egg laying by *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol* 38: 549-560.

de la Fuente J, Kocan KM, Almazán C, Blouin EF (2007a) RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks. *Trends Parasitol* 23: 427-433.

Dunkov B, Georgieva T (2006) Insect iron binding proteins: insights from the genomes. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 300-309.

Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR (2007) Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol* 17: 93-100.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15: 188-200.

Farnaud S, Evans RW (2003) Lactoferrin - a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol Immunol* 40: 395-405.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.

Grandjean O (1984) Blood digestion in *Ornithodoros moubata* Murray sensu stricto Walton (Ixodoidea: Argasidae) females. I. Biochemical changes in the midgut lumen and ultrastructure of the midgut cells, related to intracellular digestion. *Acarologia* 25: 147-165.

Hajdušek O, Sojka D, Kopáček P, Burešová V, Franta Z, Šauman I, Winzerling J, Grubhoffer L (2009) Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 1033-1038.

Hajdušek O, Almazán C, Loosová G, Villar M, Canales M, Grubhoffer L, Kopáček P, de la Fuente J (2010) Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. *Vaccine* 28: 2993-2998.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.

Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC (2004) Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117: 285-297.

Horn M, Nussbaumerová M, Šanda M, Kovářová Z, Srba J, Franta Z, Sojka D, Bogyo M, Caffrey CR, Kopáček P, Mareš M (2009) Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chem Biol* 16:1053-63.

Jongejan F, Uilenberg G (2004) The global importance of ticks. *Parasitology* 129: S3-14.

Karim S, Miller NJ, Valenzuela J, Sauer JR, Mather TN (2005) RNAi-mediated gene silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood feeding. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 1336-1342.

Kopáček P, Zdychová J, Yoshiga T, Weise C, Rudenko N, Law JH (2003) Molecular cloning, expression and isolation of ferritins from two tick species - *Ornithodoros moubata* and *Ixodes ricinus*. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 103-113.

- Mourrain P, Béclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Rémoúé K., Sanial M, Vo TA, Vaucheret H (2000) *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101: 533-542.
- Nichol H, Law JH, Winzerling JJ (2002) Iron metabolism in insects. *Annu Rev Entomol* 47: 535-559.
- Nuttall PA (1999) Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zentralbl Bakteriol* 289: 492-505.
- Nykänen A, Haley B, Zamore PD (2001) ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107: 309-321.
- Ramakrishnan VG, Aljamali MN, Sauer JR, Essenberg RC (2005) Application of RNA interference in tick salivary gland research. *J Biomol Tech* 16: 297-305.
- Singh SK, Girschick HJ (2003) Tick-host interactions and their immunological implications in tick-borne diseases. *Curr Sci* 85: 1284-1298.
- Sojka D, Franta Z, Horn M, Hajdušek O, Caffrey CR, Mareš 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.
- Sonenshine DE (1991) *Biology of ticks*, vol. 1. (Oxford University Press, New York).
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC (1999) The *rde-1* gene, RNA Interference, and Transposon Silencing in *C. elegans*. *Cell* 99: 123-132.
- Tiklová K, Senti KA, Wang S, Gräslund A, Samakovlis C (2010) Epithelial septate junction assembly relies on melanotransferrin iron binding and endocytosis in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 12: 1071-1077.
- Walden WE, Selezneva AI, Dupuy J, Volbeda A, Fontecilla-Camps JC, Theil EC, Volz K (2006) Structure of dual function iron regulatory protein 1 complexed with ferritin IRE-RNA. *Science* 314: 1903-1908.
- Yoshiga T, Hernandez VP, Fallon AM, Law JH (1997) Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12337-12342.
- Yoshiga T, Georgieva T, Dunkov BC, Harizanova N, Ralchev K, Law JH (1999) *Drosophila melanogaster* transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection. *Eur J Biochem* 260: 414-420.
- Zamore PD (2001) RNA interference: listening to the sound of silence. *Nat Struct Biol* 8: 746-750.
- Zhou G, Velasquez LS, Geiser DL, Mayo JJ, Winzerling JJ (2009) Differential regulation of transferrin 1 and 2 in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 39: 234-244.