

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Glutamát – řízené chloridové kanály ze střeva
klíštěte *Ixodes ricinus* a jejich vakcinační potenciál**

Bakalářská práce

Anežka Sáčková

Školitel: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Tereza Kozelková

České Budějovice 2024

Sáčková A., 2024: Glutamát – řízené chloridové kanály ze střeva klíštěte *Ixodes ricinus* a jejich vakcinační potenciál. [Glutamate-gated chloride channels from the gut of tick *Ixodes ricinus* and their vaccination potential. Bc. Thesis, in Czech] – 44 p., The Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: This thesis focuses on the study of the problem of glutamate-gated chloride channels (GluCl) in invertebrates, in particular in the tick *Ixodes ricinus*. Based on the hypothesis that targeted anti-AgGluCl could affect the glutamate-gated chloride channels in ticks and cause the death of the parasite, the experiments described in this thesis were performed. Two recombinant proteins IrGluCl1 and IrGluCl2 were used to immunize guinea pigs. The ticks were then infested and their weight, number of larvae and hatchability recorded. An analysis was made from the collected data. In addition, an expression profile of all six *glucl1-glucl6* genes identified in the *I. ricinus* tick was generated in all tissues to investigate in which tissues they are expressed.

In this thesis, the systematics of GluCls and their function in invertebrate parasites such as ticks were investigated. In addition, different forms of defense against these parasites were described, with a focus on specific anti-AgGluCl glutamate-gated chloride channels.

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

V Českých Budějovicích dne

.....
Anežka Sáčková

Poděkování: Chtěla bych především poděkovat svým školitelům RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc. a RNDr. Tereze Kozelkové za jejich velikou trpělivost, odborné rady a ochotu pomoci mi, kdykoli bylo potřeba.

Děkuji také za přijetí do laboratoře, možnosti učit se laboratorním metodám a pracovat na zajímavých experimentech.

Velké díky patří v neposlední řadě také mé rodině, kamarádům a mému příteli za jejich bezmeznou podporu.

Obsah

1 Úvod a literární přehled	1
1.1 Klíšťata	1
1.1.1 Argasidae	1
1.1.2 Ixodidae	2
1.2 Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>)	2
1.2.1 Morfologie	2
1.2.2 Životní cyklus	3
1.2.3 Fáze sání dospělé samice	4
1.3 Iontové kanály	5
1.3.1 Chemicky řízené iontové kanály.....	6
1.3.2 Glutamát-řízené chloridové kanály (GluCl)	6
1.3.2.1 Molekulární struktura glutamát-řízených chloridových kanálů 7	
1.3.2.2 Schéma funkce glutamát-řízených chloridových kanálů	8
1.4 Ivermektin.....	9
1.5 GluCl u bezobratlých.....	10
1.6 GluCl u klíštěte obecného <i>I. ricinus</i>	11
2 Cíle práce	14
3 Materiál a metody	15
3.1 Klíšťata a pokusná zvířata	15
3.2 Transformace expresního plazmidu s DNA fragmentem IrGluCl1 a IrGluCl2 do expresních BL21 buněk, exprese a kultivace kultury.....	15
3.3 Izolace inkluzních tělísek z bakteriální kultury	17
3.4 Purifikace proteinu.....	18
3.5 Renaturace rekombinantního proteinu.....	19
3.6 Elektroforéza, Western blot	20
3.7 Infestační pokus	21
3.8 Kvantitativní Real-time PCR (RT-qPCR)	22
4 Výsledky	24
4.1 Příprava rekombinantního proteinu IrGluCl1 a IrGluCl2.....	24

4.2 Afinitní chromatografie rekombinantního proteinu IrGluCl1 a IrGluCl2 přes His-tag	24
4.3 Identifikace rekombinantního proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie	27
4.4 Kontrolní Western blot po refoldingu pro IrGluCl2	28
4.5 Experimentální imunizace a následná infestace <i>I. ricinus</i>	29
4.6 Expresní profil glutamát-řízených chloridových kanálů v klíštěti obecném 34	
5 Diskuse	36
6 Závěr	40
7 Seznam referencí.....	41

1 Úvod a literární přehled

1.1 Klíšťata

Klíšťata jsou krev sající ektoparazité taxonomicky patřící do kmene Arthropoda, třídy Arachnida, podtřídy Acari, řádu Parasitiformes a podřádu Ixodida. Dále se klíšťata rozdělují do dvou významných skupin: Argasidae – měkká klíšťata neboli klíšťáci – a Ixodidae – tvrdá klíšťata (Sonenshine, 1991). Tyto dvě skupiny se liší mimo jiné především rozdílem v morfologii, kdy tvrdá klíšťata (Ixodidae), mají vyvinuté tzv. scutum – tvrdý sklerotizovaný hřbetní štítek na dorzální straně organismu. Dodatečně je nutné zmínit ještě třetí skupinu – Nuttalliedae, ve které je popsán pouze jeden druh klíšťete *N. namaqua* (Sonenshine, 1991).

Klíšťata figurují jako významní přenašeči původců mnohých nemocí, mezi něž patří například klíšťová encefalitida, lymská borelióza nebo babezióza (de la Fuente et al., 2008).

1.1.1 Argasidae

Měkká klíšťata se od tvrdých klíšťat odlišují několika morfologickými znaky. Jak již bylo zmíněno, jedním z nich je absence skuta (namísto tvrdého ochranného plátu disponují flexibilní kožovitou kutikulou) a dále minimální odlišnost mezi pohlavími (krom pohlavních orgánů) (Sonenshine, 1991). Klíšťáci neboli měkká klíšťata se od skupiny Ixodidae liší také svým typickým životním cyklem a způsobem krmení. Na rozdíl od tvrdých klíšťat, pro které je typický tříhostitelský cyklus, parazitují Argasidae na více hostitelích. Nymfy měkkých klíšťat prochází několika vývojovými stádii a v každém sají krev hostitele. Dále také dospělé samice sají krev opakovaně. Oplodněná samice opakovaně saje malé množství krve, aby podpořila několikanásobnou produkci malých snůšek vajíček (Jongejan and Uilenberg, 1994).

Klíšťata skupiny Argasidae jsou též vektory některých onemocnění, především se jedná o rody *Ornithodoros*, *Otobius* a *Argas*. Například měkká klíšťata rodu *Argas* parazitují na drůbeži, čímž přenášejí bakterii *Borrelia anserina*, která způsobuje onemocnění spirochetosis u drůbeže. Tyto skupiny klíšťat se vyskytují v oblastech tropů a subtropů (Jongejan and Uilenberg, 1994).

1.1.2 Ixodidae

Tvrdá klíšťata se vyznačují již výše zmiňovaným sklerotizovaným plátem – scutum. U obou pohlaví je také zaznamenán výrazný pohlavní dimorfismus, například samice je výrazně větší než samec, či rozdílná velikost scutum (Sonenshine, 1991).

Pro většinu tvrdých klíšťat je typický jejich tříhostitelský cyklus (ačkoliv některé druhy podstupují pouze dvouhostitelský anebo jednohostitelský cyklus) (Sonenshine, 1991). V každé aktivní fázi vývoje (jedná se o larvu, nymfu a dospělou samici) sají klíšťata skupiny Ixodidae krev hostitele pouze jednou, na rozdíl od měkkých klíšťat, kde dospělá samice saje krev typicky opakovaně. Plně nasátá oplozená samice se odpojí od hostitele a uchýlí se na bezpečné místo, kde klade tisíce vajíček a poté umírá. Samec naopak zůstává na hostiteli mnohem déle, jelikož se může pářit opakovaně (Estrada-Peña, 2015).

Ixodidae tvoří přibližně 80 % druhů klíšťat a zahrnují mimo jiné také druhy, které jsou signifikantní přenašeči onemocnění jako je klíšťová encefalitida či lymfská borelióza (Jongejan and Uilenberg, 2004).

1.2 Klíšťe obecné (*Ixodes ricinus*)

Klíšťe obecné je jedním z nejrozšířenějších klíšťat v České republice. Patří do skupiny tvrdých klíšťat (Ixodidae). Živí se sáním krve na plazích, ptácích a savcích, přičemž v každé fázi cyklu se může stát hostitelem i člověk (Sonenshine, 1991).

1.2.1 Morfologie

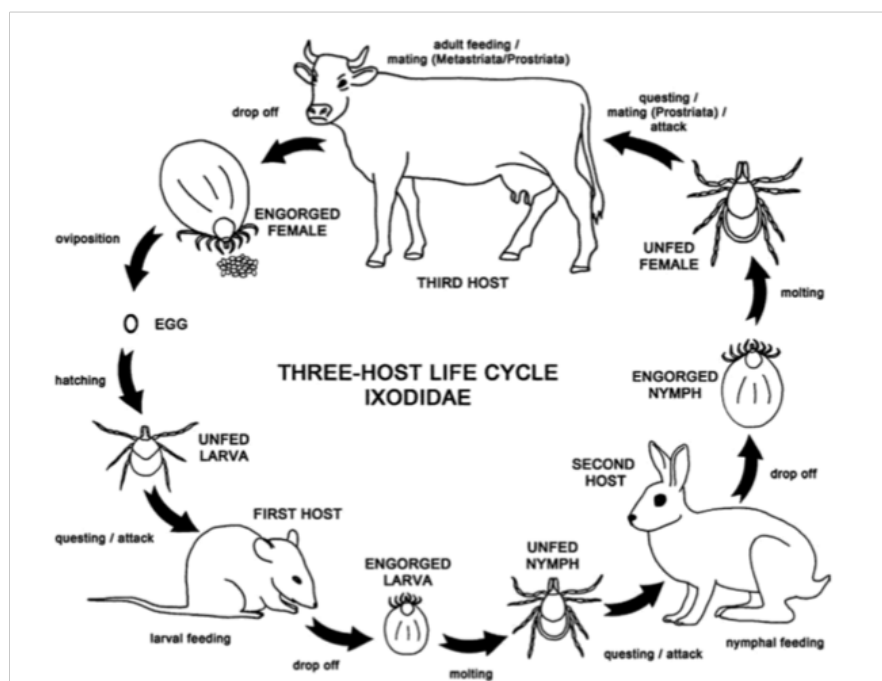
Tělo klíšťete obecného se skládá z hlavové části (gnathosoma) a tělové části (idiosoma). Hlavová část je složena především z hypostomu, chelicer a makadel. Hypostom neboli chobůtek je útvar pokrytý četnými zpětnými háčky, které slouží k průniku kůží hostitele a následné fixaci (Volf, Horák a kol., 2007). V tělové části se nachází čtyři páry končetin (u larev pouze tři páry), přičemž na prvním páru končetin je uložen Hellerův orgán pro detekci CO₂. Tento orgán slouží k nalezení hostitele (Volf, Horák et al., 2007). Dále je na dorsální straně klíšťete přítomno již výše zmiňované scutum. Samec klíšťete *I. ricinus* je tímto štítkem pokrytý celý, samice je kryta pouze z jedné třetiny. Nekrytou část tvoří alloscutulum – kožovitá,

varhánkovitě složená struktura, díky níž je samice schopna po plném nasátí krve zvětšit svůj objem až 300x (Sonenshine, 1991).

1.2.2 Životní cyklus

Životní cyklus klíštěte *I. ricinus* je charakterizován typickým tříhostitelským cyklem dle schématu larva – nymfa – dospělec (Obr. 1). V každé vývojové fázi (s výjimkou vajíček a dospělého samce) je pro klíšťata nezbytně nutné konzumovat krev hostitele proto, aby se mohla vyvinout do dalšího vývojového stádia (to platí pro larvu a nymfu), anebo klást vajíčka a zajistit reprodukci (to platí pro dospělou samici) (Jongejan and Uilenberg, 1994).

Páření je pro klíšťata nezbytným krokem pro zajištění reprodukce. Nejčastěji dochází k oplození samice přímo na hostiteli, a to z praktického hlediska, jelikož právě na hostiteli se samec se samicí setkají s největší pravděpodobností. Zároveň však není vyloučeno páření klíšťat mimo hostitele. Samice je nejčastěji oplozena přímo při sání (dospělý samec krev nesaje) a samec jí zároveň se spermatoforem předává i faktory, které spouští produkci vajíček a jsou esenciální pro stimulaci fáze tzv. rychlého sání samice. Po oplození nastává fáze rychlého sání, kdy samice dosáhne plného nasátí a následně opouští hostitele (Sonenshine, 1991). Kompletní životní cyklus klíštěte trvá zpravidla 1–3 roky (Volf, Horák et al., 2007).



Obrázek 1: Tříhostitelský cyklus tvrdých klíšťat (Převzato ze Sonenshine, 1991).

Z oplozeného vajíčka se líhne larva, která saje na malých obratlovcích. Z larvy se vyvíjí nymfa, která opět saje krev na malých či větších obratlovcích. Nasátá nymfa metamorfuje v dospělého samce nebo v dospělou samici, která jako hostitele volí velké obratlovce. Plně nasátá samice odpadá z hostitele a klade vajíčka.

1.2.3 Fáze sání dospělé samice

Jak již bylo výše zmíněno, dospělá samice prochází určitými fázemi sání (Balashov, 1972). Tyto fáze jsou celkem tři a přicházejí následovně: **1. je přípravná fáze**, kdy samice ustanovuje své místo na hostiteli, odkud následně saje. Tato fáze trvá asi 1 den. **2. následuje fáze pomalého sání**, kdy samice 6–9 dní saje krev a zvyšuje svou váhu až 10× oproti nenasátému stavu. **3. probíhá fáze rychlého sání**, trvající opět asi 1 den (přibližně 12–24 hodin). V této fázi samice zvyšuje svou váhu sáním krve opět 10× oproti stavu na konci pomalé fáze. Tím dosáhne až stonásobného zvětšení oproti původní hmotnosti (Horn et al., 2009). Díky tomuto stavu dojde samice do kritického bodu pro započítí vitellogeneze a produkci zralých vajíček. V tomto momentě odpadá samice z hostitele (tím se výše zmíněné procesy spustí), klade tisíce vajíček a následně během několika dní umírá (Sonenshine, 1991).

1.3 Iontové kanály

Iontové kanály jsou membránové proteiny zasazené v cytoplazmatické membráně či jiných membránách některých organel buněk. Umožňují pasivní průchod anorganických iontů skrz membránu (Cooper and Hausman, 2006). Jedná se o proteinové hetero- či homo-tetramery, pentamery nebo hexamery, kdy každá jednotka kanálu obsahuje dva až šest transmembránových helixů (Koolman and Röhme, 2012).

Ionty difundují kanálem pasivně pomocí koncentračního spádu iontu a elektrickým nábojem membrány. Rovnováha elektrických gradientů vně a uvnitř buňky určuje rychlost a směr toku iontů (Koolman and Röhme, 2012).

Otevírání a zavírání kanálu (neboli změna konformace proteinů, která umožní či znemožní průchod iontů) je řízeno několika faktory. Dle těchto faktorů lze iontové kanály rozdělit do několika skupin:

- 1. Iontové kanály stále otevřené** – jelikož proteiny těchto kanálů mají nestálou konformaci, neustále tak mění svůj tvar a kmitají tak mezi otevřeným a zavřeným stavem.
- 2. Iontové kanály řízené napětím** – změna napětí vně či uvnitř buňky reguluje otevírání kanálu.
- 3. Iontové kanály řízené mechanicky** – zde je iniciátorem změny konformace proteinu cytoskelet.
- 4. Iontové kanály řízené teplem** – tyto kanály se otevírají na základě podnětu změny teploty.
- 5. Iontové kanály řízené světlem** – tyto kanály reagují na proud fotonu, kdy se po expozici otevírají. Tento typ byl identifikován pouze u bakterií.
- 6. Iontové kanály senzitivní ke kyselosti** – iniciátorem otevření kanálu je zde změna pH.
- 7. Iontové kanály řízené chemicky** – tyto kanály reagují na chemický podnět (Mysliviček et al., 2022).

Pro účely této bakalářské práce jsou stěžejní právě chemicky řízené iontové kanály, které jsou podrobněji popsány níže.

1.3.1 Chemicky řízené iontové kanály

Tyto iontové kanály jsou v drtivé většině případů proteinové pentamery. Existuje více chemických podnětů, na které kanály reagují, například přímým či nepřímým působením G proteinu (Cooper, 2000). Pro tuto bakalářskou práci jsou významné iontové kanály řízené ligandem.

Ligand, nejčastěji neurotransmitter, je součástí iontového kanálu. Ligandem může být například glycinový receptor, nikotinový acetylcholinový receptor, GABA_A receptor a glutamátový receptor (Mysliveček et al., 2022).

Glutamát je významný neurotransmitter v savčí, a tedy i lidské nervové soustavě. Váže se jako ligand na ionotropní glutamátové receptory, již výše zmiňované iontové kanály. Společně jsou zodpovědní za synaptickou neurotransmisi a zasahují do procesů jako je učení a vznik paměti (Watkins and Jane, 2006). Glutamátové receptory propouští Na⁺ a někdy i Ca⁺ ionty a existují ve více podtypech jako například NMDA typ, kainátový typ či AMPA typ (Traynelis et al., 2010).

Glutamát-řízené iontové kanály jsou tedy velmi důležitou složkou v komunikaci nervové soustavy, a to jak v savčích soustavách, tak u bezobratlých. Na rozdíl od savců, u bezobratlých organismů propouští glutamát-řízené iontové kanály Cl⁻ ionty, nazývají se proto glutamát-řízené chloridové kanály. Dalším rozdílem je také odlišná skladba aminokyselin v transmembránových helixech (Wolstenholme, 2012). Společným znakem však zůstává důležitost v nervové soustavě organismů.

1.3.2 Glutamát-řízené chloridové kanály (GluCl)

Glutamát-řízené chloridové kanály jsou proteinové homopentamery zasazené ve fosfolipidové membráně buněk. Jako mediátory transportu Cl⁻ iontů byly zaznamenány pouze u bezobratlých živočichů jako například červ z kmene hlístic *Caenorhabditis elegans*, klíště obecné *I. ricinus* a další zástupci z říše bezobratlých (Wolstenholme, 2012). Vyskytují se v buňkách nervového systému, které kontrolují příjem potravy, senzorické funkce, rozmnožování a pohyb. Právě proto slouží tyto kanály jako mediátory přenosu rychlé chemické reakce, která díky neurotransmiteru umožňuje komunikaci mezi buňkami. V tomto případě se jedná o neurotransmitter glutamát, který řídí otevírání a zavírání kanálu dle potřeby. Pokud je kanál otevřený, proudí skrze něj chloridové anionty, které zásobují nervový systém bezobratlých

(Jesús-Pérez et al., 2016). Jelikož chloridové anionty proudí kanálem z extracelulárního prostoru skrz fosfolipidovou membránu do intracelulárního prostoru, dochází tak k hyperpolarizaci elektrického potenciálu přes membránu, a tím se snižuje elektrický potenciál v intracelulárním prostoru (Lynch and Barry, 2007).

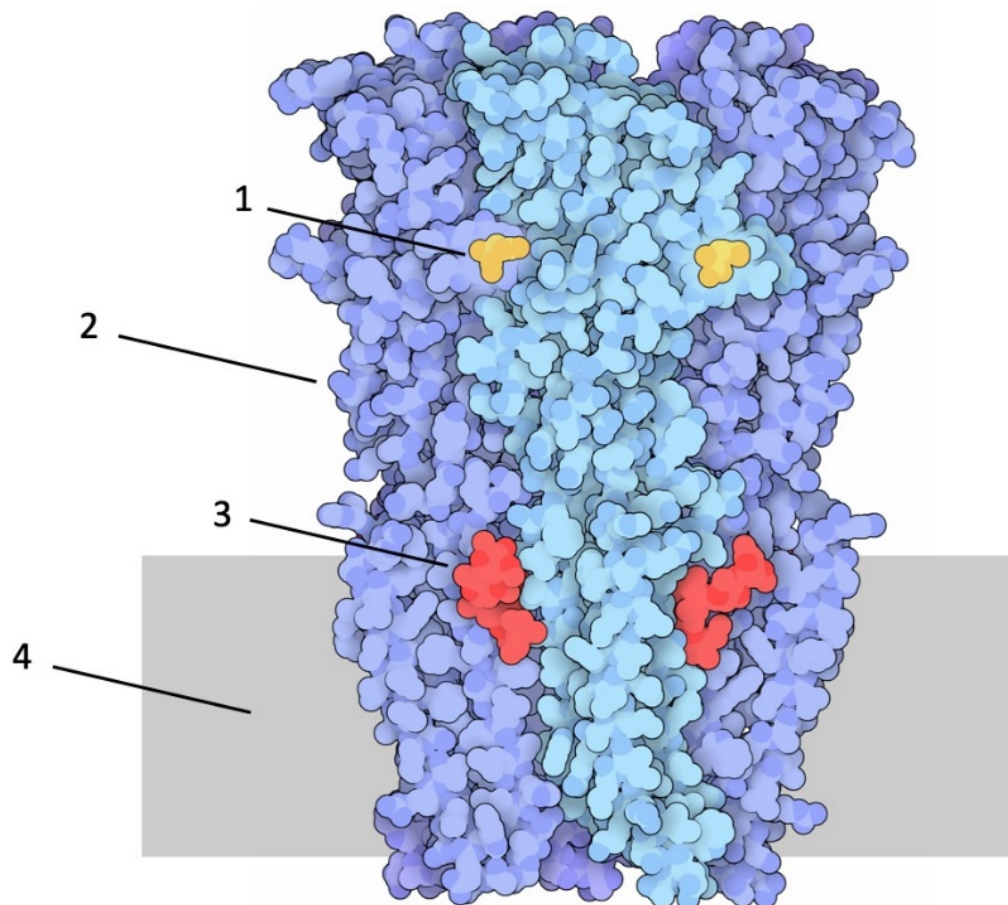
1.3.2.1 Molekulární struktura glutamát-řízených chloridových kanálů

Glutamát-řízený chloridový kanál (Obr. 2) patří do rodiny Cys-loop ligand-gated ion channels (CysLGs), kam lze zařadit kanály řízené například histaminem, dopaminem a dalšími strukturami (Wolstenholme, 2012). Jak již bylo zmíněno, skládá se z pěti stejných proteinových podjednotek. Každá podjednotka je dále složena z extracelulární a intracelulární části, jelikož je celá struktura zasazena ve fosfolipidové membráně. V extracelulární části kanálu se nachází cys-loop struktura (klička), typická spojením skrz disulfidický můstek. Právě tato cys-klička je společným jmenovatelem celé rodiny těchto kanálů (Wolstenholme, 2012).

V intracelulární části podjednotky se nachází intracelulární klička (nebo také M3-M4 loop), která ve spojení s ostatními podjednotkami vytváří záchytný koš pro procházející ionty. Ionty tak zůstávají v intracelulární části v blízkosti fosfolipidové membrány a jejich záporný náboj umožní snížit efektivně elektrický potenciál intracelulární domény. Dále se v podjednotce vyskytují čtyři alfa helixy, které zasahují přímo do fosfolipidové membrány – pojmenované M1, M2, M3 a M4 (Obr. 3). Alfa helix M2 je usazen nejbližší ke středu homopentamery a za ním směrem od středu jsou usazené alfa helixy M1 a M3, přičemž M1 je spojen s M2 v intracelulární části, zatímco M2 s M3 jsou propojeny v extracelulární části buňky. Jako poslední je připojen alfa helix M4 nejdále od středu homopentamery a s alfa helixem M3 je spojen již zmiňovanou intracelulární kličkou. Z alfa helixu M4 poté vychází zakončení proteinu COOH skupinou v extracelulární části buňky (Keramidas et al., 2004; Lynch, 2004).

Alfa helixy M2 společně v celé struktuře kanálu narušují fosfolipidovou membránu a formují pór ve středu kanálu, kterým prochází chloridové anionty. Každý alfa helix M2 je polypeptid o 7 otáčkách, přičemž na vnitřní straně směrem do póru na pozici 9^o je aminokyselina Leucin (L254), na pozici 2^o je uložena

aminokyselina Threonin (T247) a na pozici -2' je aminokyselina Prolin (P243). Tyto aminokyseliny se vyznačují svými hydrofobními vlastnostmi. Díky těmto aminokyselinám se v celé homopentamerní struktuře vytváří hydrofobní brány směrem do póru, které nepropouští vodu a ionty (Nemecz et al., 2016; Cully et al., 1996).



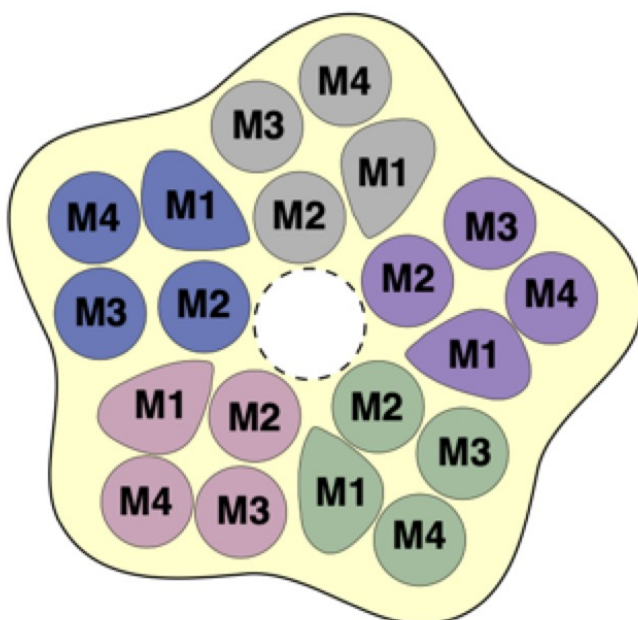
Obrázek 2: Glutamát-řízený chloridový kanál (Převzato z <https://pdb101.rcsb.org/motm/191>).

1. Glutamát – ligand vázající se do extracelulární části kanálu. 2. Iontový kanál. 3. Ivermectin – antiparazitikum vázající se do transmembránového prostoru kanálu. 4. Membrána, ve které je kanál zasazen.

1.3.2.2 Schéma funkce glutamát-řízených chloridových kanálů

Glutamát je ligand, vázající se na extracelulární část kanálu vždy mezi dvě podjednotky v místě mezi dvěma alfa helixy M2 (Obr. 3) (Keramidas et al., 2004). Pokud ligand není navázán, brány tvořené aminokyselinami Leucin, Threonin a Prolin jsou uzavřené a ionty neproudí kanálem. Pokud se glutamát naváže, způsobí otočení alfa helixů M2, tím vychýlí zmiňované aminokyseliny a znemožní jim tak

tvorit zátku pro průchod iontů. To znamená, že pór je volně průchozí (otevřený) a ionty proudí do intracelulární části. Pokud nastane situace, kdy je v organismu konstantní přísun glutamátu a je tedy vždy navázán na kanálu, přizpůsobí se kanál zavřeným tzv. closed/desensitized stavem a je schopen střídavě měnit otevřený a closed/desensitized stav i přes stálou přítomnost glutamátu dle aktuální potřeby chloridových aniontů. Pokud se glutamát vyváže, kanál se uzavře nevratně až do chvíle, než se opět glutamát naváže zpět (Madden, 2002; Connolly and Wafford, 2004).



Obrázek 3: Schéma transmembránových proteinů v iontovém kanálu (Převzato z Keramidas et al., 2004).

Pohled shora – jednotlivé proteinové helixy (M1-M4) a jejich uspořádání kolem póru (bílý kruh), kterým prochází ionty.

1.4 Ivermektin

Ivermektin je širokospektré antiparazitikum ze skupiny akaricidů, které je široce využívané pro boj s parazity. Patří do skupiny makrocyclických laktonů, stejně jako doramectin či abamectin (Martin et al., 2021). Ivermektin cílí na specifická místa na glutamát-řízených chloridových kanálech a způsobuje tak změny v jejich struktuře a tím i jejich funkci. Naváže se mezi dvě podjednotky kanálu v místě průchodu kanálu fosfolipidovou membránou (Obr. 2) a způsobí trvalé pootočení alfa helixů M2, které díky hydrofobním aminokyselinám mířeným do póru kanálu tvoří zátku pro průchod

chloridových aniontů. Jelikož je tato zátka trvale odstraněna, proudí z extracelulární domény do intracelulární části neregulované množství chloridových aniontů. To vede k hyperpolarizaci neuronů a jejich následné overinhibici. Tímto dojde k dysfunkci nervového systému, což má za následek poruchu svalového systému a sensorických schopností. To vše vede ke smrti parazita (Lynagh and Lynch, 2012; Chen and Kubo, 2018). Díky těmto vlastnostem je ivermektin považován za velmi účinné antiparazitikum a je hojně využíván v boji proti citlivým parazitům jako jsou různé druhy hlístic, roztočů, klíšťat či vší, způsobující různá onemocnění jak u zvířat, tak u člověka (Ashour, 2019).

1.5 GluCl u bezobratlých

Aktuálně využívané chemické pesticidy, jako je například skupina makrocyclických laktonů, kam spadá antiparazitikum ivermektin, jsou velice účinné v boji s parazity (Wolstenholme and Rogers, 2005). Aby byl účinek antiparazitik co největší, využívá se širokospektrých insekticidů, což vedlo k rozvinutí resistance u parazitů (Wolstenholme and Kaplan, 2012). Proto byly provedeny experimenty k nalezení alternativ likvidování parazitů jinak než chemickými pesticidy, které mimo jiné nejsou příliš ekologické. Mezi takové patří experiment (Meyers et al., 2015), který popisuje efekt imunoglobulinu G (IgG) cílící na extracelulární doménu glutamát-řízených chloridových kanálů z komárů *Anopheles gambiae* (AgGluCl). Studie sleduje míru přežití tří důležitých komárů (*A. gambiae*, *Aedes aegypti*, *Culex tarsalis*), kteří přenášejí původce závažných onemocnění.

V tomto experimentu (Meyers et al., 2015) byly vytvořeny polyklonální anti-AgGluCl IgG protilátky v králících z extracelulární domény AgGluCl. Dále byli komáři rodu *A. gambiae* krmeni krví obsahující AgGluCl IgG protilátky a jako kontrola byly použity nespecifické polyklonální králíčí protilátky. Pokus ukázal, že v závislosti na velikosti dávky anti-AgGluCl IgG protilátky je ovlivněna úmrtnost komárů, naopak kontrolní dávka neprokázala vyšší mortalitu komárů.

Dále byly ty samé protilátky injikovány přímo do hemocoelu komárů. To bylo provedeno pro ověření hypotézy, že anti-AgGluCl IgG protilátky jsou po požití v krvi translokovány přes střeva komára do hemocoelu, kde cílí na glutamát-řízené chloridové kanály. Opět bylo potvrzeno, že po vpravení dávky anti-AgGluCl IgG

protilátek se výrazně zvýší mortalita komárů oproti kontrolní dávce. Jelikož bylo prokázáno, že tyto protilátky mají vysoký potenciál, byl ten samý experiment proveden i pro jiné rody komárů (*A. aegypti* a *C. tarsalis*). Zde bylo prokázáno, že anti-AgGluCl IgG protilátky zabijí komáry, pokud jsou podány přímo do hemocoelu pomocí intrathorakální injekce, ne však skrz krmení na krvi (Meyers et al., 2015).

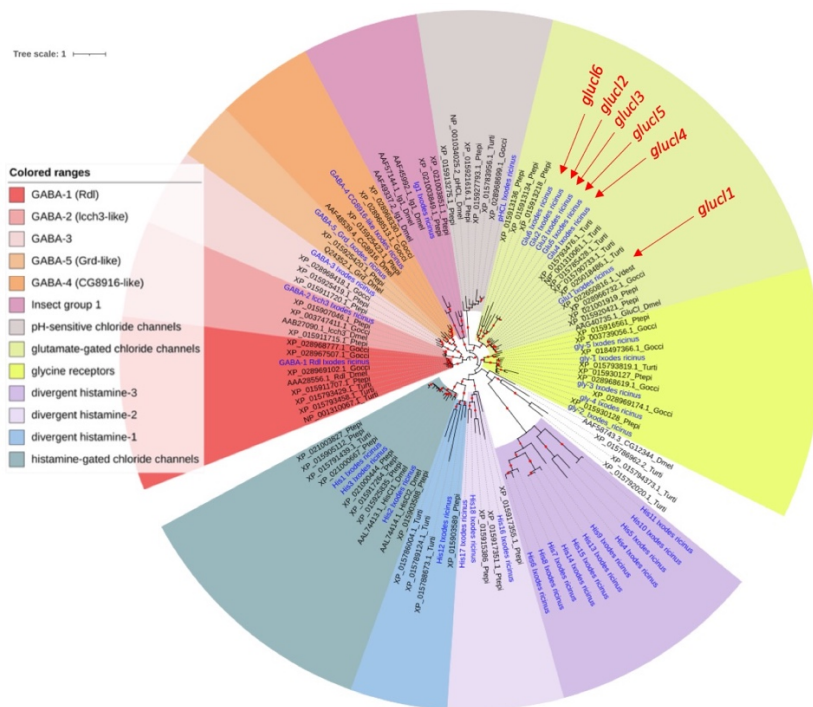
1.6 GluCl u klíštěte obecného *I. ricinus*

Relativně nedávno byl rozklíčován a popsán celý genom klíštěte *I. ricinus*, což přineslo veliký posun v porozumění evoluci klíšťat (Cerqueira de Araujo et al., 2024).

Studie (Cerqueira de Araujo et al., 2024) provedená v oblasti genomiky klíštěte *I. ricinus* odhalila přítomnost genů kódujících glutamát-řízené chloridové kanály. Dle článku byl vůbec poprvé analyzován kompletní genom klíštěte *I. ricinus* a dalších klíšťat (*I. pacificus*, *I. persulcatus*, *I. hexagonus*) a byly mimo jiné identifikovány sekvence genů kódující glutamát-řízené chloridové kanály.

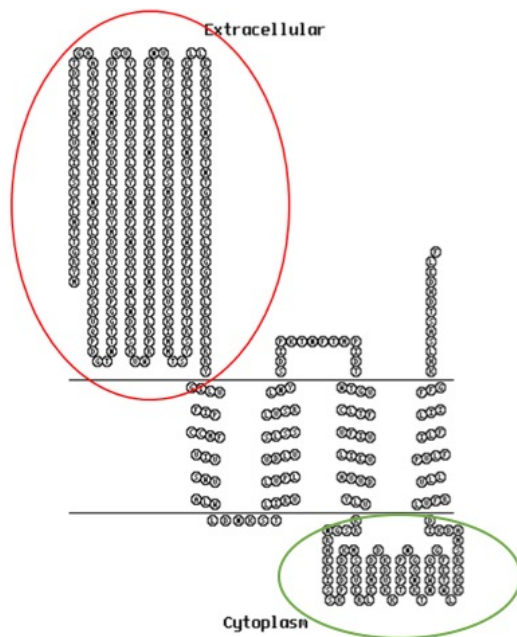
Již dříve byly popsány sekvence genů pro glutamát-řízené chloridové kanály v jiných bezobratlých živočiších, například v hlístici *C. elegans* (O'Halloran, 2022) či v moučném červu *Tribolium castaneum* (Qian et al., 2023). Nikdy předtím však nebyly odhaleny v genomu klíštěte *I. ricinus*. Tato studie tak přináší důležité poznatky o genomu klíštěte *I. ricinus* a umožňuje další a podrobnější studium těchto parazitů.

V transkriptomu synganglionu (nervová masa formující centrální nervový systém klíšťat, zajišťující mnohé životně důležité pochody) (Roma et al, 2012) bylo při podrobném studiu cys-loop ligand vázajících iontových kanálů v bezobratlých nalezeno šest transkriptů kódujících právě glutamát-řízené chloridové kanály (Obr. 4) (Rispe, 2022).



Obrázek 4: Fylogenetický strom Cys-loop ligand vázajících iontových kanálů (převzato z Ripe, 2022).

Fylogenetická analýza cys-loop ligand iontových kanálů u bezobratlých. Modře zvýrazněné sekvence: *I. ricinus*. Glutamát-řízené chloridové kanály jsou zvýrazněné červeně.



Obrázek 5: Molekulární schéma glutamát-řízeného chloridového kanálu.

Červený kruh – extracelulární část, cys-klička. Zelený kruh – intracelulární část, intracelulární klička. Predikce provedena ze sekvence *I. ricinus*.

Jak již bylo výše popsáno, glutamát-řízený chloridový kanál se sestává z extracelulární části (zde je formována cys-klička spojená disulfidickým můstkem), transmembránové části (zde jsou uloženy transmembránové helixy M1-M4 formující pór pro průchod iontů) a intracelulární části (zde je uložena M3-M4 klička, umožňující záchyt prošlých iontů) (Keramidas et al., 2004). Molekulární struktura (Obr. 5), popsaná obecně pro glutamát-řízené kanály v bezobratlých, je identická i pro klíště *I. ricinus* a shoduje se tak svým složením jednotlivých aminokyselin.

V klíštěti *I. ricinus* bylo nedávno identifikováno celkem šest genů kódujících glutamát-řízené kanály (Obr. 4) (Rispe, 2022; Cerqueira de Araujo et al., 2024). Pro tuto bakalářskou práci byly vybrány dva, označené jako IrGuCL1 a IrGuCL2, které byly již dříve nalezeny ve střevních transkriptomech klíštěte *I. ricinus* (Perner et al., 2016). Cílem této bakalářské práce bylo prozkoumat potenciální využití specifických protilátek reagujících s extracelulárními doménami těchto dvou glutamát-řízených kanálů jako možných akaricidů.

2 Cíle práce

- Navržení přípravy rekombinantních extracelulárních domén IrGluC11 a IrGluC12
- Expresse rekombinantních proteinů v bakteriálním systému, purifikace a refolding
- Experimentální imunizace morčat rekombinantními IrGluC11, 2 a příprava protilátek
- Infestační experimenty na imunizovaných morčatech a jejich statistické vyhodnocení
- Expresní profil glutamát-řízených chloridových kanálů v klíštěti *I. ricinus*

3 Materiál a metody

3.1 Klíšťata a pokusná zvířata

Dospělé samice a samci klíšťete *I. ricinus* byli sbíráni pomocí metody vlnkování v lesích Jihočeského kraje. Klíšťata byla použita pro infestační experimenty a uchovávána v oddělených nádobách. Pro zachování dostačujících životních podmínek byla zachována vlhkost 95 %, teplota 24 °C a perioda den/noc v poměru 15/9 hod. Dále byla použita pro infestační experimenty laboratorní morčata, přičemž morčata byla vakcinována a poté na nich sály samice klíšťat do odpadnutí.

Se všemi laboratorními zvířaty bylo zacházeno dle Zákona České národní rady na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb., etické schválení č. 25/2018.

3.2 Transformace expresního plazmidu s DNA fragmentem IrGluC11 a IrGluC12 do expresních BL21 buněk, exprese a kultivace kultury

Nejdříve byla provedena ligace DNA fragmentu proteinu IrGluC11 (v genomu anotováno jako *glucl4*) a dále také vždy stejným postupem IrGluC12 (v genomu anotováno jako *glucl6*) do expresního vektoru pET100 plazmidu. Pro celý pokus byl použit již předem připravený zaklonovaný plazmid, nebyla tedy nutná izolace z tkání a následná klonovací reakce. Buňky byly po vyjmutí z mrazničky o teplotě -80 °C krátce inkubovány na ledu. K buňkám byl přidán plazmid (1 µl) a jemně promíchán. Buňky byly ponechány na ledu a dále bylo přistoupeno k transformaci pomocí přidání pET100 plazmidu s příslušným fragmentem DNA do expresních buněk BL21 StarTM (DE3) chemicky kompetentních *E.coli* (Invitrogen). Buňky byly nejdříve inkubovány 20 minut na ledu a následně podstoupily 40 s heat shock při teplotě 42 °C. Dále byly po dobu 2 min ponechány na ledu a poté přepipetovány do 10 ml sterilního LB média s ampicilinem, o cílové koncentraci 50 µg/ml a glukózou, pro zvýšení proliferace buněk, o cílové koncentraci 20 mM. Takto byla kultura inkubována přes noc na třepačce při 37 °C. Následně byla kultura převedena do 200 ml sterilního LB média s ampicilinem o cílové koncentraci 50 µg/ml a glukózou o cílové koncentraci 20 mM a opět inkubována 8 hodin na třepačce při 37 °C. Buňky

byly následně centrifugovány 2 500 x g/4 °C/10 min, výsledný pelet byl resuspendován v malém množství LB média a převeden do 400 ml čistého LB média. Dále bylo přidáno IPTG pro zvýšení exprese buněk o výsledné koncentraci 10 mM a celá kultura byla inkubována přes noc na třepačce při 37 °C. Následně byly buňky centrifugovány při 2 500 x g/4 °C/10 min a pelet uložen do mrazničky při teplotě -20 °C.

3.3 Izolace inkluzních tělísek z bakteriální kultury

Získaný bakteriální pelet byl resuspendován v resuspendačním pufru (Tab. 1) a následně sonikován při amplitudě 40 % v pravidelných intervalech 3× po 60 s. Po centrifugaci při 16 000 x g/4 °C/10 min byl získaný supernatant uschován jako cytosolická frakce a získaný pelet opět resuspendován v izolačním pufru (Tab. 1), sonikován a centrifugován za stejných podmínek. Se získaným peletem se proces opakoval opět s izolačním pufrem celkem 3×, dokud nebyl získaný supernatant téměř průhledný. Finální supernatant byl uschován jako membránová frakce. Následně byl k peletu přidán solubilizační pufr (Tab. 1) a směs byla nechána přes noc na míchačce při pokojové teplotě do úplného rozpuštění frakce inkluzních tělísek. Buňky se postupně vlivem sonikace rozdělí na tři frakce: cytosolickou, membránovou a inkluzních tělísek. Z předchozích experimentů již bylo známo, že daný protein je uložen v inkluzních tělískách, a proto bylo rovnou přistoupeno k afinitní chromatografii bez dalšího ověřování.

Tabulka 1: Pufry použité při izolaci jednotlivých frakcí.

Resuspendační pufr	20 mM TRIS/HCl pH = 8
Izolační pufr	20 mM TRIS/HCl 2 M urea 0,5 M NaCl 10 mM imidazol pH = 8
Solubilizační pufr	20 mM TRIS/HCl 1 mM B-mercapthoethanol 0,5 M NaCl 10 mM imidazol 6 M guanidine hydrochlorid pH = 8

3.4 Purifikace proteinu

Nejdříve byla promyta Co^{2+} kolona (HiTrap IMAC FF, GE Healthcare) od předchozích purifikací 1× destilovanou vodou, dále 1× EDTA 0,5 M a poté 2× destilovanou vodou. Takto připravená kolona byla umístěna v přístroji ÄKTA FPLC chromatograf (GE Healthcare Life Sciences) a promyta pufrům B (Tab. 2). Dále byla na kolonu nanášena frakce inkluzních tělísek proteinu GluCl. Purifikace probíhala za použití pufrů A a B (Tab. 2) za použití gradientu imidazolu a při absorbanční 280 nm. Frakce byly postupně sbírány a následně analyzovány SDS-PAGE elektroforézou.

Tabulka 2: Pufry použité při purifikaci proteinů.

Pufr A	50 mM TRIS/HCl 8 M urea 0,5 M NaCl pH = 8
Pufr B	50 mM TRIS/HCl 8 M urea 0,5 M NaCl 0,5 M imidazol pH = 8

3.5 Renaturace rekombinantního proteinu

Jednotlivé frakce obsahující purifikovaný protein byly slity a převedeny do dialyzačního střeva VISKING® (Serva) o průměru 16 mm (v rozsahu 12 000 – 14 000 kDa). Protein byl postupně dialyzován v refoldovacích roztocích za účelem snížení koncentrace močoviny z 8 M na 0 M (Tab. 3). Roztoky byly postupně obměňovány v pravidelných intervalech po 6 hodinách, přičemž nejdříve byly použity roztoky A a B v poměru 1:1 (snížení močoviny na 4 M), dále roztok B (snížení močoviny na 2 M), dále roztok C (snížení močoviny na 1 M) a nakonec byl roztok C opět obměněn za čerstvý roztok C (snížení močoviny na 0 M). Po proběhnutí dialýzy za účelem renaturace proteinu, byl protein stočen při 2 500 x g/4 °C/10 min a uschován v mrazničce všude při -20 °C.

Tabulka 3: Roztoky použité při renaturaci proteinů.

Roztok A (pH = 9)	150 mM NaCl 50 mM TRIS/HCl 8 M Urea 16 µl beta-Mercaptoethanolu na 100 ml
Roztok B (pH = 9)	20 % Glycerol 150 mM NaCl 50 mM TRIS/HCl 16 µl beta-Mercaptoethanolu na 100 ml
Roztok C (pH = 9)	10 % Glycerol 150 mM NaCl 50 mM TRIS/HCl 8 µl beta-Mercaptoethanolu na 100 ml

3.6 Elektroforéza, Western blot

Vždy 10 μ l vzorku proteinu bylo smícháno se vzorkovým pufrem obsahujícím 5 μ l NuPage (LDS Sample Buffer, Invitrogen) a 5 μ l 1 M DTT a následně povařeno při 90 °C/10 min. Dále byly vzorky ochlazeny na ledu, vortexovány a centrifugovány. Vzorky byly poté nanášeny do jamek gelu, vždy po 20 μ l na jamku. Do první jamky byla nanášena 3 μ l směs proteinových standardů (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo scientific), která sloužila pro odhad molekulové hmotnosti při následné vizualizaci proteinů. Proteiny byly separovány v gradientovém polyakrylamidovém gelu (Crierion TGX Stain-Free Precast Gel, Biorad) za přítomnosti elektroforetickém pufru (25 mM TRIS, 192 mM glycin, 0,1 % SDS), pod napětím 120 V. Po rozdělení proteinů byl gel v případě elektroforézy barven 1 hod. v Coomassie (CBB, Coomassie Brilliant Blue) a následně dostatečně odbarven v odbarvovacím roztoku (methanol: kyselina octová: voda, 50:10:40). V případě Western blotu byl gel vizualizován pomocí TGX Stain Free technologie a proteiny byly následně převedeny na PVDF membránu (polyvinyliden diflorid) pomocí blotovacího zařízení (Trans-Blot Turbo System, Biorad) s blotovacím pufrem (0.125 M Tris, 0.96 M glycin, 0.1 % SDS, 20 % metanol). Byl vytvořen tzv. sendvič, který byl složen z papírových ručníků namočených v blotovacím pufru, dále membráně namočené v methanolu a poté v blotovacím pufru, následně byl položen gel se separovanými proteiny a dále byly přiloženy dva ručníky opět namočené v blotovacím pufru. Takto připravený sendvič byl vložen do blotovacího zařízení při 25 V/7 min.

Jelikož je pro membránu, použitou pro Western blot, typická vysoká afinita k proteinům, a tedy i k protilátkám, je třeba blokovat membránu tak, aby se protilátky vázaly specificky ke svým antigenům na vzorcích proteinů, a ne k celému povrchu membrány. Proto je membrána blokována v tzv. blokovacím roztoku za účelem vyplnění volných míst na membráně. Membrána byla tedy po vyjmutí krátce promyta v methanolu a ponechána po 1 hod v PBS-Tween obsahující 3 % sušené mléko. Dále byla membrána přenesena do roztoku PBS-Tween s 1 % sušeným mlékem a primární protilátkou ředěnou v různých poměrech dle potřeby aktuálního pokusu (Tab. 4) a ponechána na výkyvné třepačce v chladové místnosti přes noc. Poté byla membrána promyta v PBS-Tween od primární protilátky a přenesena do

roztoku PBS-Tween s 1 % sušeným mlékem a sekundární protilátkou ředěnou taktéž v různých poměrech dle pokusu (Tab. 4). Takto byla membrána ponechána 1 hod., poté byla opakovaně promyta v PBS-Tween. K vyvolání membrány byl použit Immobilion Classico Western HRP Substrate (Millipore) a signál byl zachycen vyvolávacím přístrojem ChemiDoc MP (Biorad).

Tabulka 4: Ředění protilátek dle pokusu.

Pokus	Primární protilátka	Sekundární protilátka
Ověřovací WB po purifikaci	His tag (1:10 000)	-
Infestační pokus s post-imunním sérem	Post-imunní sérum (1:2 000)	Anti-morčecí (1:5 000)
Infestační pokus s pre-imunním sérem	Pre-imunní sérum (1:2 000)	Anti-morčecí (1:5 000)

3.7 Infestační pokus

Pro provedení infestačního pokusu bylo použito šest morčat, tři pokusná a tři kontrolní. Kontrolní morčata byla injikována posledním pufrem z refoldingu (pufr C, Tab. 3). Pokusná morčata byla injikována rekombinantním proteinem. Pro imunizaci morčat byly vytvořeny jednotlivé dávky složené ze 100 μ l vzorku a 100 μ l nekompletního Freundovo adjuvants (Sigma – Aldrich).

Pokus probíhal dle schématu 4 dávky po 14 dnech. Následovala infestace po 14 dnech od poslední imunizace. Před 1. imunizací byla všem morčatům odebrána krev a zpracována jako pre imunní sérum. Krev byla ponechána 1 hod. při pokojové teplotě a poté 24 hod. v chladové místnosti. Následně byla krev stočena při 2 500 x g/4 °C/10 min. Vlivem centrifugace se oddělila složka krevního séra a krvinek. Sérum z horní části stáčené zkumavky bylo odebráno a uloženo do mrazničky. Dva týdny po 3. imunizaci následoval opět odběr krve, která byla zpracována stejným způsobem a uložena jako post imunní sérum.

U získaných sér byly ověřeny protilátky pomocí metody Western blot, jako primární protilátka bylo použito post imunní sérum, jako sekundární protilátka bylo použito anti-morčecí sérum, ředění probíhalo dle Tabulky 4.

Pro infestaci bylo použito celkem 150 samic nasbíraných ve volné přírodě Jihočeského kraje a na každé morče bylo přidáno stejný počet samců pro zajištění oplodnění všech samic. Samice byly rozděleny rovnoměrně po 25 samicích na každé morče a byly ponechány do plného nasátí a odpadnutí z morčete.

Samice klíšťat byly poté jednotlivě zváženy a ponechány odděleně do naklazení vajíček. Poté byla samice odstraněna a snůška zvážena. Snůšky byly poté opět ponechány až do vylíhnutí larev a byla sledována líhnivost. Všechny hodnoty byly náležitě zaznamenány a následně vyhodnocovány.

3.8 Kvantitativní Real-time PCR (RT-qPCR)

Vzorky cDNA, získané z jednotlivých tkání klíštěte *I. ricinus* byly v nezávislých biologických triplikátech analyzovány pomocí metody RT-qPCR za použití analyzátoru LightCycler 480 (Roche). Analýza byla provedena pomocí dostupného laboratorního archivu připraveného z tkání klíštěte *I. ricinus*. Vzorky cDNA v technických triplikátech byly pipetovány do 96 jamkové destičky a do každé jamky byl dále přidán Fast Star Universal SYBR Green Master Mix (Roche), příslušné primery (forward, reverse) a MiliQ PCR H₂O (množství dle Tab. 5). Pro reakci byl použit amplifikační program (Tab. 6). Primery *gluc11*, *gluc12*, *gluc13*, *gluc14* (GluC11), *gluc15* a *gluc16* (GluC12) byly designovány pomocí programu Primer 3 Input (<https://primer3.ut.ee>). Relativní exprese byla vypočítána za pomocí matematického modelu $\Delta\Delta C_t$ method (Pfaffl, 2001) a normalizována pomocí elongačního faktoru a_1 (*efa1*) (Nijhof et al., 2009) za použití EF primerů. Použité primery jsou uvedeny v Tabulce 7.

Tabulka 5: Použité reagensie při qRT-PCR a jejich množství.

Reagensie	Množství (na jamku)
Templát (cDNA)	2 μ l
MiliQ PCR H ₂ O	8,5 μ l
Primery (forward, reverse)	1 μ l + 1 μ l
Master mix	12,5 μ l

Tabulka 6: qRT-PCR amplifikační program.

-	-	Teplota	Čas	Počet cyklů
Hold stage	Počáteční denaturace	95 °C	5 min	1
PCR stage	Denaturace	95 °C	20 s	50
	Annealing	60 °C	30 s	
	Elongace	72 °C	30 s	
Melting curve stage		95 °C	15 s	1
		60 °C	1 min	
		95 °C	15 s	

Tabulka 7: Použité primery.

Název primeru	qRT-PCR primery (5'-3')
<i>gluc11</i>	GluC11 F CCACACGATCCAAACGCATC
	GluC11 R CATCTTCCTTGTCTTCCCGGA
<i>gluc12</i>	GluC12 F ACTCACCGGTCGACATTCTC
	GluC12 R GAACGAATGCAGCTGGGAAA
<i>gluc13</i>	GluC13 F ACGTCTGGACCGGAATATGC
	GluC13 R CACTCTGACCGTCACTACCC
<i>gluc14</i> (GluC11)	GluC14 F CCATCAGCCAGTTCAACCAC
	GluC14 R AGTAGTCCACGATCGTCACG
<i>gluc15</i>	GluC15 F CGGTAGTGACGGTCTGAGTG
	GluC15 R CAAACCCGGTGA CTTCGAAG
<i>gluc16</i> (GluC12)	GluC16 F TTGAGGTAGCTGTCTGTCGAC
	GluC16 R CATTGGCCCAGGTGTGTTT
EF	EF F ACGAGGCTCTGACGGAAG
	EF R CACGACGCAACTCCTTCAC

4 Výsledky

4.1 Příprava rekombinantního proteinu IrGluC11 a IrGluC12

Dříve připravené plazmidy kódující fragment proteinu IrGluC11 a IrGluC12 (Dr. Lenka Grunclová) byly zaligovány do expresního vektoru PET100 a následně transformovány do BL21 buněk *E. coli*.

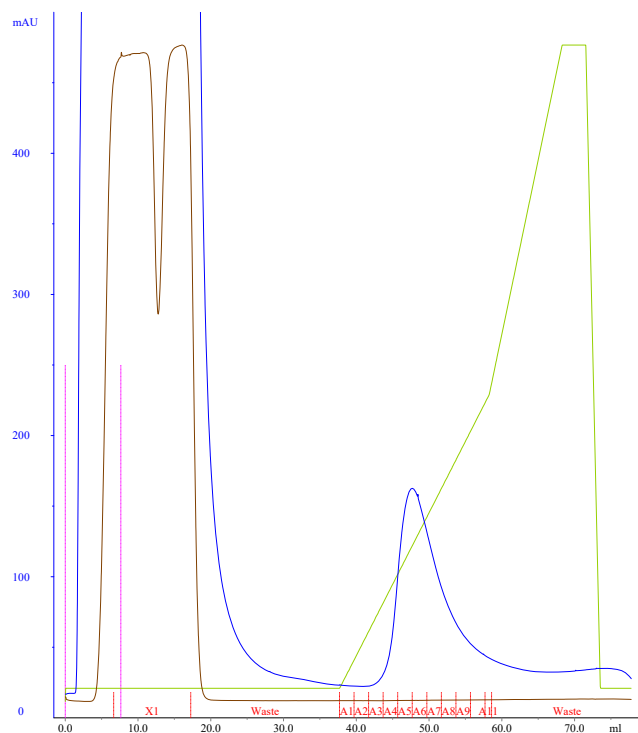
Po expresi byly postupně izolovány pomocí metody sonikace jednotlivé frakce z bakteriálního peletu – cytosolická, membránová a frakce inkluzních tělísek. Jelikož již bylo předem známo, že většinové množství rekombinantního proteinu IrGluC11 a IrGluC12 je agregováno v inkluzních tělískách, bylo přistoupeno k afinitní purifikaci na kobaltové koloně bez dalšího ověřování. Žádný kontrolní Western blot již nebyl před samotnou afinitní chromatografií proveden.

4.2 Afinitní chromatografie rekombinantního proteinu IrGluC11 a IrGluC12 přes His-tag

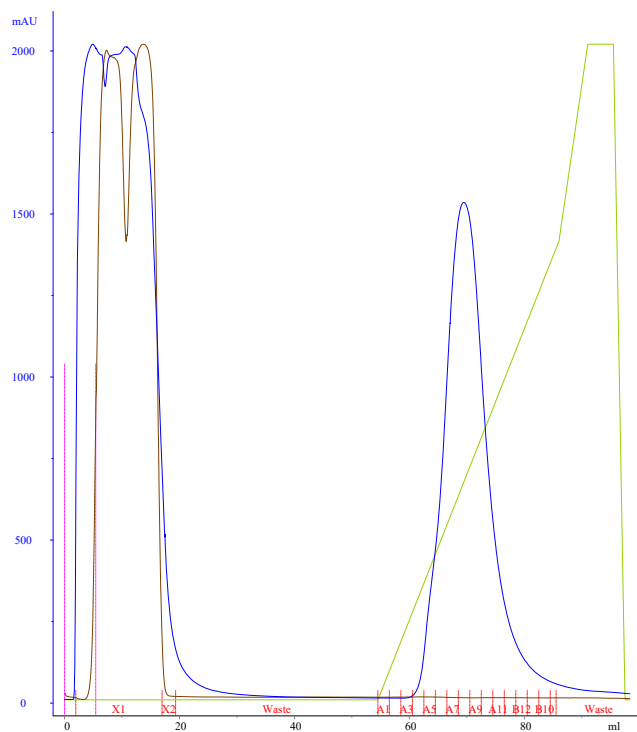
Rekombinantní protein uložený v inkluzních tělískách byl purifikován metodou chelatační chromatografie s vysokou afinitou ke kobaltu. Purifikace byla provedena za přítomnosti 8 M močoviny. Po nanesení proteinu na ekvilibrovanou kolonu a následném promytí bylo provedeno specifické eluování pomocí lineárního gradientu imidazolu. Při purifikaci byly monitorovány a sbírány postupně uvolňované jednotlivé frakce při stálé absorbanci 280 nm (Obr. 6, Obr. 7). Jednotlivé frakce byly následně ověřeny pomocí SDS-PAGE elektroforézy (Obr. 8, Obr. 9).

Při porovnání ON a FT sloupců (ON – vzorek navázaný na kolonu, FT – proteklý vzorek po purifikaci) vidíme, že z homogenátů expresních buněk se na purifikační kolonu navázal protein. Tento protein byl eluován z kolony při cca 200 mM koncentraci imidazolu (Obr. 8, sloupce 4-8; Obr. 9, sloupce 4-9).

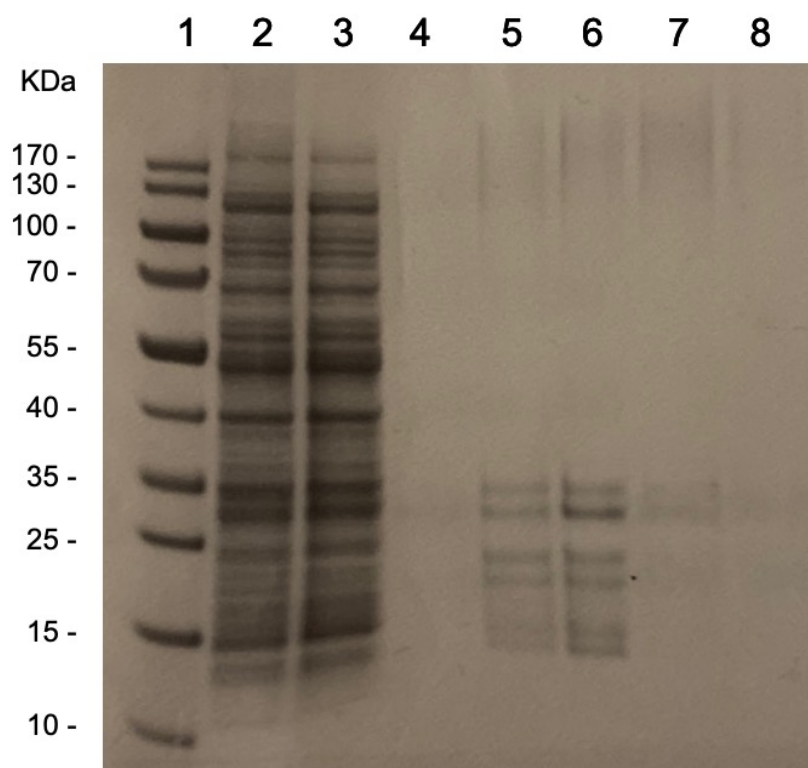
Pro IrGluC11 byly následně spojeny frakce 5 a 6. Pro IrGluC12 byly spojeny frakce 7 a 8. Takto spojené frakce pro IrGluC11 a IrGluC12 byly dále použity pro refolding a poté na imunizaci.



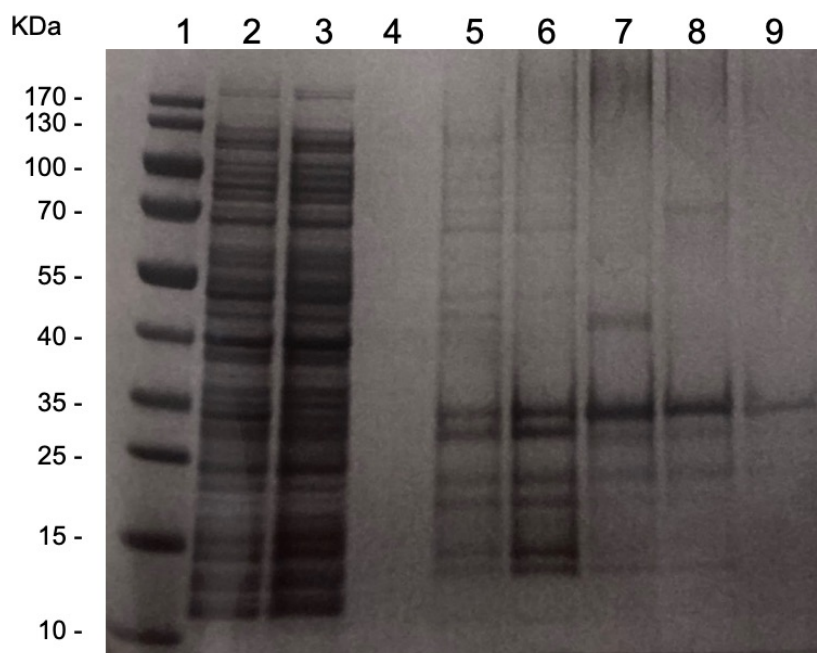
Obrázek 6: Chromatogram z afinitní chromatografie pro IrGluC11. Modrá barva – UV absorbance (280 nm), zelená barva – koncentrace imidazolu, hnědá barva – vodivost pufru, červená barva – čísla frakcí.



Obrázek 7: Chromatogram z afinitní chromatografie pro IrGluC11. Modrá barva – UV absorbance (280 nm), zelená barva – koncentrace imidazolu, hnědá barva – vodivost pufru, červená barva – čísla frakcí.



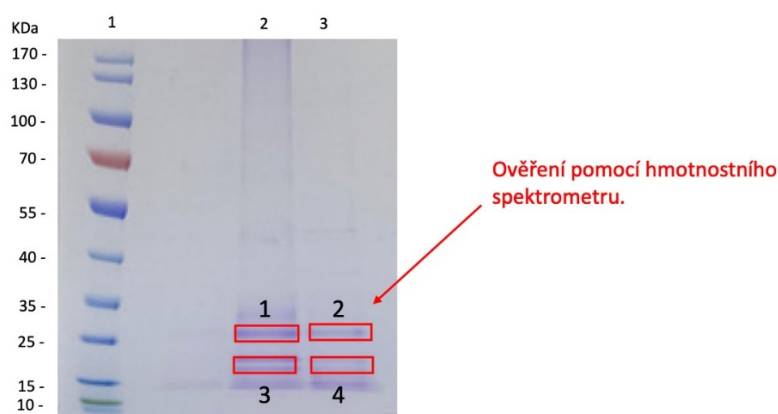
Obrázek 8: Ověřovací SDS-PAGE elektroforéza jednotlivých frakcí pro IrGluC11. 1 – marker, 2 – ON, 3 – FT, 4 – frakce proteinu A4, 5 – frakce proteinu A5, 6 – frakce proteinu A6, 7 – frakce proteinu A7, 8 – frakce proteinu A8 + A9.



Obrázek 9: Ověřovací SDS-PAGE elektroforéza jednotlivých frakcí pro IrGluC12. 1 – marker, 2 – ON, 3 – FT, 4 – frakce proteinu A4, 5 – frakce proteinu A5 + A6, 6 – frakce proteinu A7 + A8, 7 – frakce proteinu A9 + A10, 8 – frakce proteinu A11 + A12, 9 – frakce proteinu B12 + B11.

4.3 Identifikace rekombinantního proteinu pomocí hmotnostní spektrometrie

Identita získaného rekombinantního proteinu IrGluC11 po refoldingu byla ověřena hmotnostní spektrometrií jak v precipitátu, tak v zakoncentrovaném supernatantu. Celkem 4 proužky z gelu byly vyříznuty (Obr. 10) a odeslány na analýzu MALDI TOF. Analýza byla zpracována Dr. Filipem Dyčkou na Jihočeské Univerzitě v Českých Budějovicích. Bylo prokázáno, že proužky o velikosti 15 a 25 kDa vykazují shodu se sekvencí IrGluC11 (Obr. 11).



Obrázek 10: Ověřovací SDS-PAGE elektroforéza pro IrGluC11. 1 – marker, 2 – precipitát IrGluC11, 3 – koncentrovaný supernatant IrGluC11, červené obdélníky značí proužky poslané na analýzu.

```

1
MRGSHHHHHGMSMTGGQQMGRDLYDDDDKHPFTQPDGNTTGGPVQVDVDMYVISLR
DVSVMNMDYTVQVYLRKWTDSRLRYDNKPGNVKYLNLNDPSKVWRPDLFISNEKEAHFH
EILLPNSFLHIYPQGNVHYSVRLTLKLACSMDFSRFPFDQVCKIMMTSYSRTTDALVFE
WKKGDPLVVKELHLLEHKLLESKTGYCNSRTNTGEYSCLKGGFVLERDLRRYGILVFIP
CCMFVIVSWVALWL

2
MRGSHHHHHGMSMTGGQQMGRDLYDDDDKHPFTQPDGNTTGGPVQVDVDMYVISLR
DVSVMNMDYTVQVYLRKWTDSRLRYDNKPGNVKYLNLNDPSKVWRPDLFISNEKEAHFH
EILLPNSFLHIYPQGNVHYSVRLTLKLACSMDFSRFPFDQVCKIMMTSYSRTTDALVFE
WKKGDPLVVKELHLLEHKLLESKTGYCNSRTNTGEYSCLKGGFVLERDLRRYGILVFIP
CCMFVIVSWVALWL

3
MRGSHHHHHGMSMTGGQQMGRDLYDDDDKHPFTQPDGNTTGGPVQVDVDMYVISLR
DVSVMNMDYTVQVYLRTKWTDSRLRYDNKPGNVKYLNLNDPSKVWRPDLFISNEKEAHFH
EILLPNSFLHIYPQGNVHYSVRLTLKLACSMDFSRFPFDQVCKIMMTSYSRTTDALVFE
WKKGDPLVVKELHLLEHKLLESKTGYCNSRTNTGEYSCLKGGFVLERDLRRYGILVFIP
CCMFVIVSWVALWL

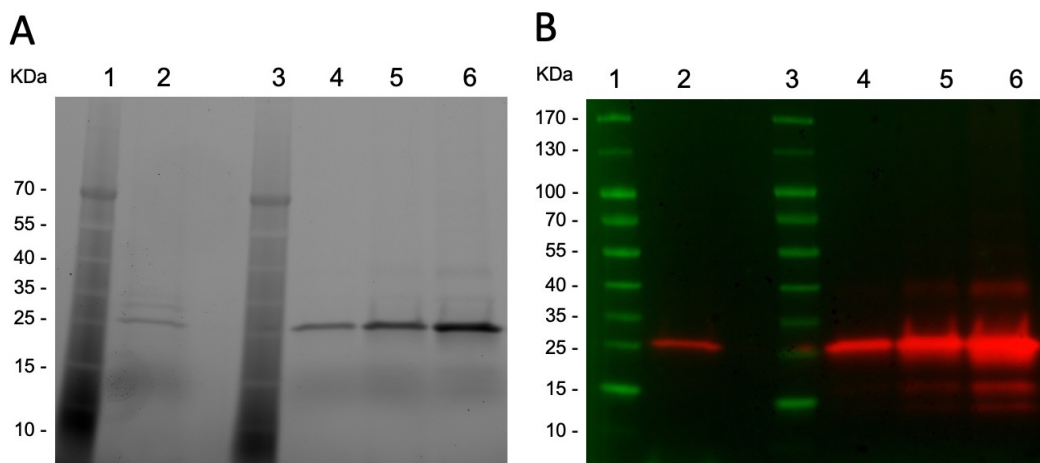
4
MRGSHHHHHGMSMTGGQQMGRDLYDDDDKHPFTQPDGNTTGGPVQVDVDMYVISLR
DVSVMNMDYTVQVYLRKWTDSRLRYDNKPGNVKYLNLNDPSKVWRPDLFISNEKEAHFH
EILLPNSFLHIYPQGNVHYSVRLTLKLACSMDFSRFPFDQVCKIMMTSYSRTTDALVFE
WKKGDPLVVKELHLLEHKLLESKTGYCNSRTNTGEYSCLKGGFVLERDLRRYGILVFIP
CCMFVIVSWVALWL

```

Obrázek 11: Výsledky MALDI TOF analýzy. Sekvence *I. ricinus* GluC11 s his-tag přidanou sekvencí. Červeně jsou znázorněny peptidy identifikované v jednotlivých proužcích. Číslování 1-4 značí vyříznuté proužky z gelu (odpovídající v Obr. 10).

4.4 Kontrolní Western blot po refoldingu pro IrGluCl2

Po proběhnutí metody refoldingu za účelem snížení molarity močoviny z 8 M na 0 M byla pozorována precipitace rekombinantního proteinu IrGluCl2. Proto byl proveden kontrolní Western blot pro ověření přítomnosti v samotném precipitátu či supernatantu. Byla ověřena úměrná koncentrace proteinu GluCl2 pro následnou imunizaci. Na gel byl nanesen supernatant proteinu IrGluCl2 (Obr. 12, sloupec 2) a dále rozpuštěný pelet rekombinantního proteinu IrGluCl2 ředěný 50× (Obr. 12, sloupec 4), ředěný 25× (Obr. 12, sloupec 5), ředěný 10× (Obr. 12, sloupec 6). Jako primární protilátka byl použit myší anti-His-tag a jako sekundární protilátka byla použita králičí anti-mouse protilátka s konjugovanou peroxidázou, jelikož ještě neproběhla imunizace a nebyly tak k dispozici specifické protilátky. Na gelu je zřejmě vidět, že IrGluCl2 rekombinantní protein byl přítomen především v precipitátu, ale v menší míře i v supernatantu. Po vyhodnocení bylo přistoupeno k imunizaci s proteinem v supernatantu smíchaným s peletem (Obr. 12, sloupce 2, 4-6).



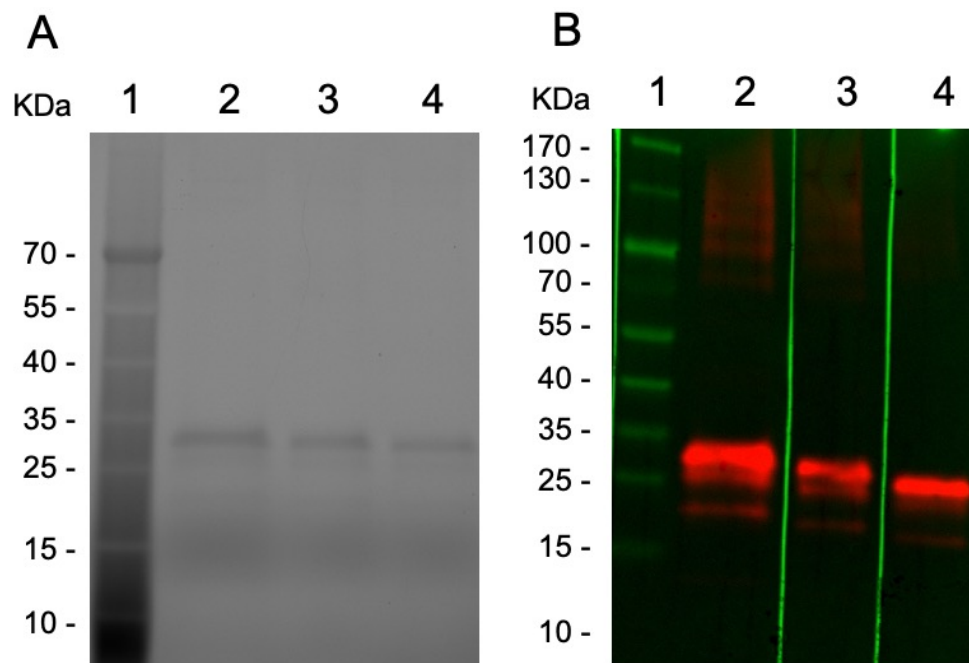
Obrázek 12: Ověřovací Western blot po refoldingu pro IrGluCl2. A: TGX – stain free gel: 1 – marker, 2 – supernatant GluCl2, 3 – marker, 4 – pelet rekombinantního proteinu GluCl2 ředěný 50×, 5 - pelet rekombinantního proteinu GluCl2 ředěný 25×, 6 - pelet rekombinantního proteinu GluCl2 ředěný 10×. B: Western blot: 1 - marker, 2 – supernatant GluCl2, 3 – marker, 4 – pelet rekombinantního proteinu GluCl2 ředěný 50×, 5 - pelet rekombinantního proteinu GluCl2 ředěný 25×, 6 - pelet rekombinantního proteinu GluCl2 ředěný 10×.

4.5 Experimentální imunizace a následná infestace *I. ricinus*

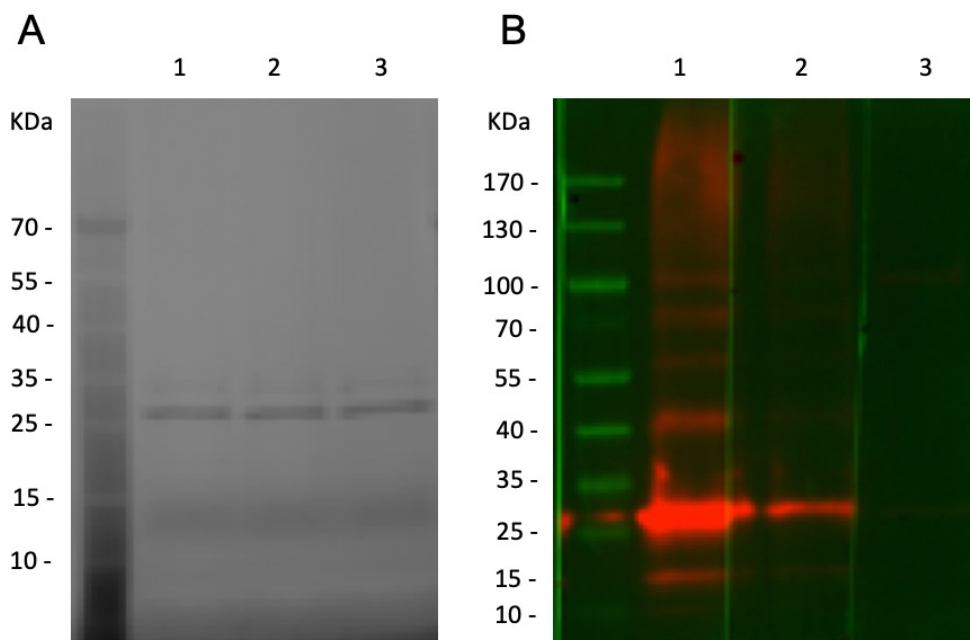
Tři pokusná morčata byla imunizována čtyřmi dávkami rekombinantního proteinu, tři byla imunizována pouze pufrem C z refoldingu (Tab. 3). Ve všech dávkách bylo přítomno nekompletní Freundovo adjuvans (Sigma – Aldrich).

V průběhu imunizačního pokusu byla odebrána krev všem pokusným morčatům, a to před první a po čtvrté dávce imunizace. Odebraná krev byla zpracována jako sérum a uložena do mrazničky. Dále byla séra ověřena pomocí metody Western blot. Cílem ověření bylo zjistit, zda si morčata, imunizovaná rekombinantním proteinem, vytvořila protilátky. Stejně množství rekombinantního proteinu IrGluC11 a IrGluC12 (Obr. 13A, 14A) bylo nanášeno na gel. Následně byla při Western blot pokusu jako primární protilátky použita séra z imunizovaných morčat odebraných po 4. dávce imunizace (Obr. 13B, 14B).

Je zřejmé, že u IrGluC11 (Obr. 13) si všechna tři pokusná morčata vytvořila protilátky proti danému rekombinantnímu proteinu. Na rozdíl od imunizace s rekombinantním proteinem IrGluC12 (Obr. 14) si protilátky vytvořila pouze dvě morčata. Následná infestace byla provedena, i přes negativní výsledek u jednoho z morčat (Obr. 14, sloupec 4), na všech pokusných zvířatech.

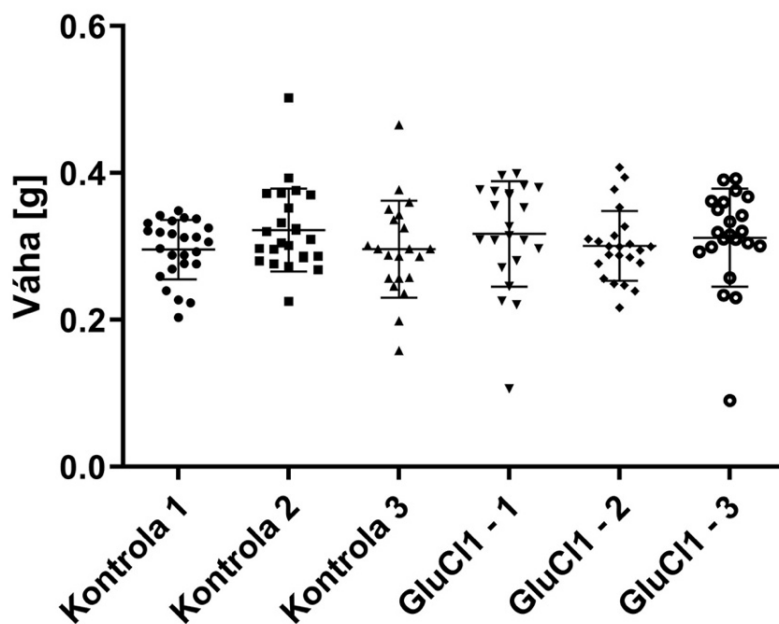


Obrázek 13: Ověření protilátek u morčat pro IrGluC11. A: TGX – stain free gel: 1 – marker, 2, 3, 4 – rekombinantní protein IrGluC11. B: Ověřovací Western blot po imunizaci: 1 - marker, 2, 3, 4 – sérum z morčat imunizovaných rekombinantním proteinem IrGluC11.

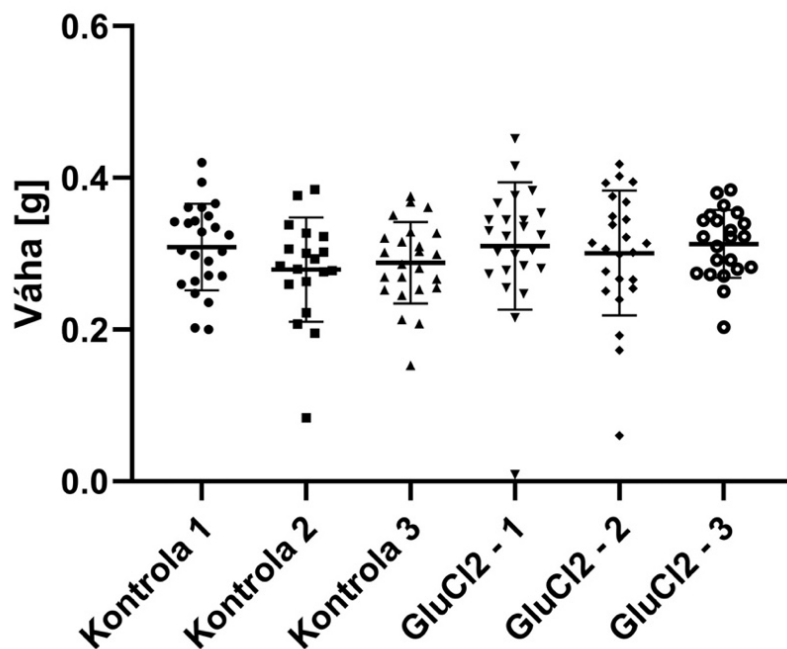


Obrázek 14: Ověření protilátek u morčat pro IrGluCl2. A: TGX – stain free gel: 1 – marker, 2, 3, 4 – rekombinantní protein IrGluCl2. B: Ověřovací Western blot po imunizaci: 1 - marker, 2, 3, 4 – sérum z morčat imunizovaných rekombinantním proteinem IrGluCl2.

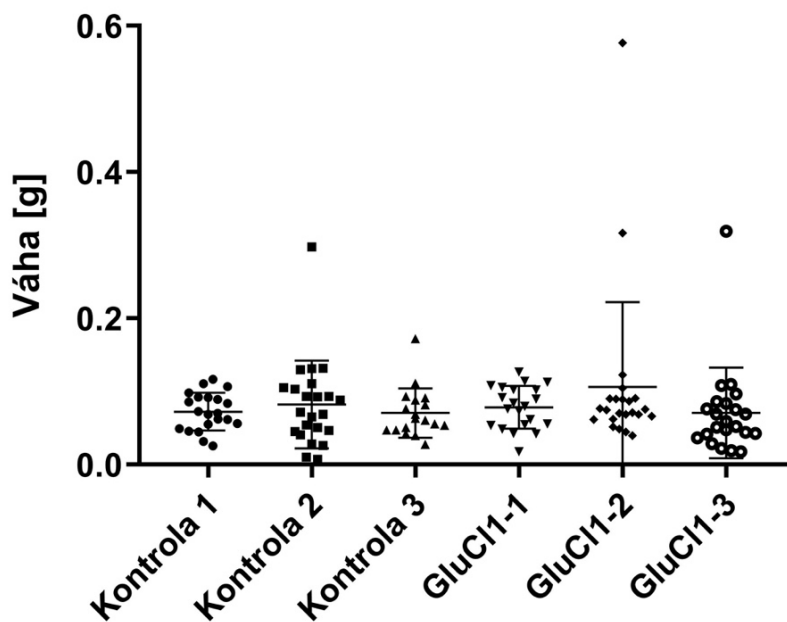
Při infestačním pokusu sála klíšťata přirozeně až do odpadnutí v počtu 25 samic na morče. Plně nasátá klíšťata byla zvážena a samostatně uschována. Vážení nasátých samic neukázalo žádný signifikantní rozdíl mezi klíšťaty sajícími na imunizovaných morčatech rekombinantním proteinem IrGluCl1 a IrGluCl2 a klíšťaty sajícími na kontrolních morčatech (Obr. 15, 16). Po třech týdnech po dokončení kladení byly váženy snůšky všech samic. Ani v tomto případě nebyly zjištěny žádné výrazné rozdíly (Obr. 17, 18). Následně byla sledována líhnivost larev, ani zde však nebyly zaznamenány rozdílnosti mezi pozorovanými skupinami (Tab. 8, 9).



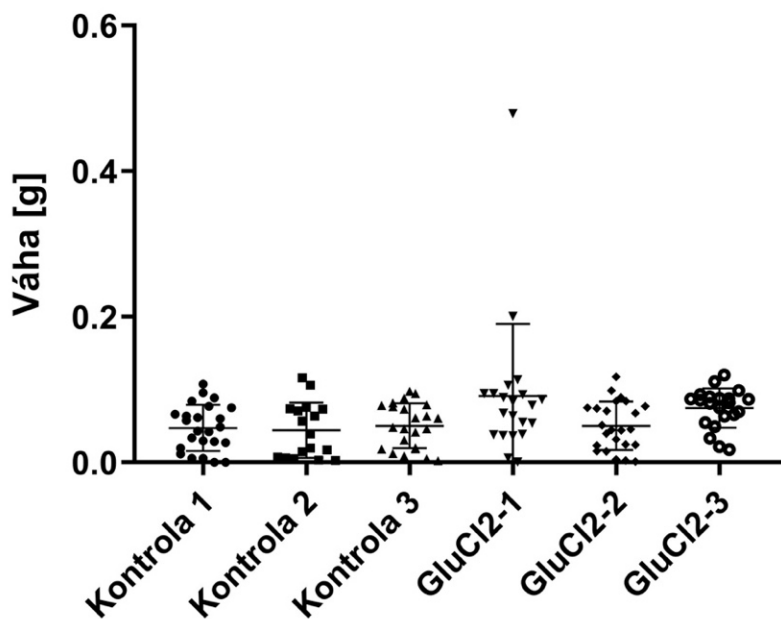
Obrázek 15: Váhy plně nasátých samic na kontrolních a imunizovaných morčatech rekombinantním proteinem IrGluCl1. Kontrola 1, 2, 3 – váhy plně nasátých samic, která sála na morčatech imunizovaných pufrům C po refoldingu. IrGluCl1 – 1, 2, 3 – váhy plně nasátých samic, která sála na morčatech imunizovaných rekombinantním proteinem IrGluCl1.



Obrázek 16: Váhy plně nasátých samic na kontrolních a imunizovaných morčatech rekombinantním proteinem IrGluCl2. Kontrola 1, 2, 3 – váhy plně nasátých samic, která sála na morčatech imunizovaných pufrům C po refoldingu. IrGluCl2 – 1, 2, 3 – váhy plně nasátých samic, která sála na morčatech imunizovaných rekombinantním proteinem IrGluCl2.



Obrázek 17: Váhy snůšek plně nasátých samic na kontrolních a imunizovaných morčatech rekombinantním proteinem IrGluCl1. Kontrola 1, 2, 3 – váhy snůšek plně nasátých samic, která sála na morčatech imunizovaných puřrem C po refoldingu. IrGluCl1 – 1, 2, 3 – váhy snůšek plně nasátých samic, která sála na morčatech imunizovaných rekombinantním proteinem IrGluCl1.



Obrázek 18: Váhy snůšek plně nasátých samic na kontrolních a imunizovaných morčatech rekombinantním proteinem IrGluCl2. Kontrola 1, 2, 3 – váhy snůšek plně nasátých samic, která sála na morčatech imunizovaných puřrem C po refoldingu. IrGluCl2 – 1, 2, 3 – váhy snůšek plně nasátých samic, která sála na morčatech imunizovaných rekombinantním proteinem IrGluCl2.

Tabulka 8: Líhivost larev plně nasátých samic na kontrolních a imunizovaných morčatech rekombinantním proteinem IrGluC11. Počet křížků reprezentuje úspěšnost líhivosti. XXX: ze všech nakladených vajíček se vylíhly larvy.

POČET KŘÍŽKŮ	X	XX	XXX
C1	0	3	18
C2	0	4	19
C3	0	3	15
Glu1-1	1	0	20
Glu1-2	0	3	20
Glu1-3	4	3	14

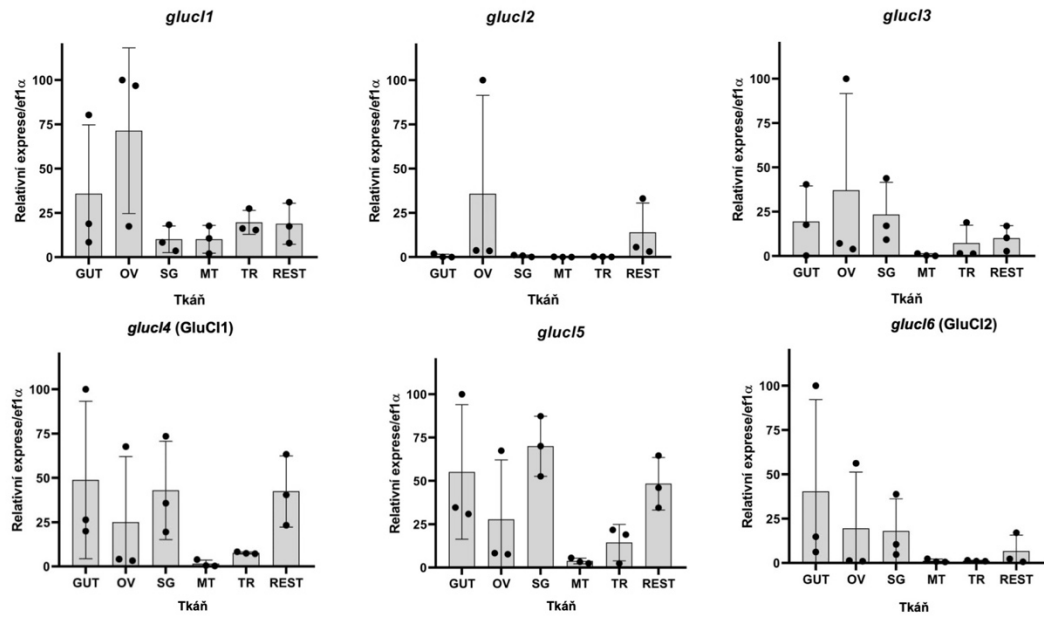
Tabulka 9: Líhivost larev plně nasátých samic na kontrolních a imunizovaných morčatech rekombinantním proteinem IrGluC12. Počet křížků reprezentuje úspěšnost líhivosti. XXX: ze všech nakladených vajíček se vylíhly larvy.

POČET KŘÍŽKŮ	X	XX	XXX
C1	2	10	9
C2	5	3	8
C3	8	3	12
Glu2-1	2	2	16
Glu2-2	2	3	15
Glu2-3	2	4	15

4.6 Expresní profil glutamát-řízených chloridových kanálů v klíštěti obecném

Pomocí metody RT-qPCR byla provedena analýza míry exprese genů *glucl1*, *glucl2*, *glucl3*, *glucl4*, *glucl5* a *glucl6* v jednotlivých tkáních klíštěte *I ricinus*. Cílem pokusu bylo zjistit, v jaké míře a zdali vůbec probíhá exprese pro daný gen v jednotlivých tkáních. Jako templát byla použita již předem v laboratoři připravená cDNA izolovaná ze střev, vaječniců, slinných žláz, malphigických trubic, tracheí a zbytku tkání.

U *glucl1* byla nejvyšší relativní exprese prokázána ve vaječnicích, menší exprese byla prokázána ve střevech. Další tkáně nejevily signifikantní známky exprese. Podobně tomu bylo i u *glucl2*, kde byla taktéž nejvyšší exprese prokázána ve vaječnicích. U ostatních tkání byla exprese téměř zanedbatelná. Taktéž u *glucl3* nebyla exprese zaznamenána příliš signifikantní, ve vaječnicích byla ale i tak opět nejvyšší, dále potom méně ve slinných žlázách a ve střevech. Na rozdíl tomu v případě *glucl4* byla exprese nejvyšší ve střevech a dále potom ve slinných žlázách a zbytku tkání. Také ve vaječnicích byla zaznamenána menší exprese. Celkově nejvyšší exprese proběhla u *glucl5*, kde byla nejvyšší ve slinných žlázách a dále méně ve střevech, zbytku tkání a vaječnicích. Naproti tomu zcela bezvýznamná byla v případě malphigických trubic. U *glucl6* byla nejvyšší exprese prokázána ve střevech a dále menší exprese ve vaječnicích a slinných žlázách srovnatelně. V případě malphigických trubic a tracheí byla exprese téměř zanedbatelná. Vše výše popsané je zaznamenáno v jednotlivých grafech pro každý gen *glucl1* – *6* na Obrázku 19.



Obrázek 19: Expresní profil glutamát-řízených chloridových kanálů v klíštěti *I. ricinus*. GUT – střevo, OV – vaječníky, SG – slinné žlázy, MT – malphigická trubice, TR – trachea, REST – zbytek tkání. Označení *gluc1-6* je zkratkou pro jednotlivé geny glutamát-řízených chloridových kanálů nalezených v genomu klíštěte *I. ricinus*.

5 Diskuse

Cílem mé práce bylo ověřit, zdali mají rekombinantní proteiny IrGluC11 a IrGluC12 vakcinační potenciál a jsou tak vhodnými kandidáty pro vytvoření vakcíny. Klíšťata jsou vektory původců velmi závažných onemocnění, jako je lymfská borelióza či klíšťová encefalitida (Sonenshine, 1991). Je proto nasnadě cílit další výzkum na tyto parazity, jelikož jsou celosvětově velmi rozšířené a ohrožují mimo jiné i člověka. Ještě nikdy nebyl proveden experiment na klíšťatech za použití specifických protilátek, které cílí na extracelulární doménu glutamát-řízeného chloridového kanálu v těle parazitů, v tomto případě pro klíště obecné *I. ricinus*.

Nejdříve byla provedena exprese a následná kultivace rekombinantních proteinů IrGluC11 a IrGluC12. Proteiny byly dále purifikovány metodou afinitní chromatografie a renaturovány pomocí metody refoldingu. Díky tomu byla snížena molarita močoviny z 8 M na 0 M. Poté byly rekombinantní proteiny kontrolovány metodou Western blot. Zde se ukázalo, že proteiny odpovídají predikované velikosti (28 kDa), často však nejsou stabilní a rozpadávají se či tvoří dimery. Hmotnostní spektrometrií však byla ověřena identita IrGluC11 rekombinantního proteinu (Obr. 10, 11). I přesto bylo přistoupeno k imunizaci morčat rekombinantním proteinem IrGluC11 a IrGluC12. Imunizace byla úspěšná, morčata si vytvořila protilátky proti těmto rekombinantním proteinům. Pouze třetí morče, imunizované rekombinantním proteinem IrGluC12, si vytvořilo velmi málo či žádné protilátky, jelikož při ověření metodou Western blot byl titer protilátek pravděpodobně pod úrovní detekce.

Cílem experimentální imunizace a následné infestace bylo zjistit, zda rekombinantní protein ovlivní váhy nasátých samic a jejich následnou reprodukci. Samice klíšťat sála na imunizovaných morčatech do plného nasátí a odpadnutí. Dále byly plně nasáté samice zváženy, jednotlivě uloženy a ponechány až do naklazení. Snůšky byly opět váženy a ponechány k vylíhnutí. Zde byla poté sledována a zaznamenána líhivost. Všechna data byla zpracována a vyhodnocena, výsledky však nepotvrdily původní hypotézu, že specifické protilátky vytvořené v morčatech ovlivní fenotyp klíšťat. Jelikož výsledky nejsou signifikantní, nelze se domnívat, že imunizace rekombinantními proteiny IrGluC11 a IrGluC12 má vliv na fenotyp klíšťat.

Dále byl prozkoumán tkáňový profil glutamát-řízených chloridových kanálů v klíštěti *I. ricinus* pomocí metody RT-qPCR. Jelikož bylo v genomu klíštěte objeveno šest genů kódující glutamát-řízené chloridové kanály (Cerqueira de Araujo et al., 2024). Cílem tohoto pokusu bylo objasnit, zdali a popřípadě kde se glutamát-řízené chloridové kanály transkribované jednotlivými geny *glucl1* – *glucl6* exprimují. Výsledky ukázaly, že se glutamát-řízené chloridové kanály vyskytují téměř vždy ve všech tkáních, ne vždy však v signifikantním množství.

V roce 2015 byl publikován článek (Meyers et al., 2015), kde bylo popsáno provedení podobného experimentu na komárech *A. gambiae*, *A. aegypti* a *C. tarsalis* s cílem nalezení vhodné alternativy pro boj s těmito parazity. Experiment byl založen na reakci antigenu a specifických protilátek. Komáři byli krmeni krví s anti – AgGluCl IgG protilátkami a dále byla sledována míra jejich přežití. Na základě tohoto experimentu bylo vyvozeno, že tato metoda funguje efektivně pro komára *A. gambiae*. V jeho těle jsou IgG protilátky schopné proniknout po požití krve až do hemocoelu, kde jsou exprimovány glutamát-řízené chloridové kanály. Potenciální vakcína by tedy byla efektivní pro komára *A. gambiae*, jelikož zde byly protilátky obsažené v krvi, kterou sál, schopny translokací proniknout ze střev do hemocoelu (Meyers et al., 2015).

Jelikož měl tento výzkum (Meyers et al., 2015) pozitivní výsledky, byl na základě hypotézy cílení specifických protilátek na glutamát-řízené chloridové kanály realizován experiment popsáný v této bakalářské práci. V tomto případě byla použita klíšťata *I. ricinus*, přenašeči původců závažných chorob, jako je například klíšťová encefalitida (Sonenshine, 1991). Bylo prokázáno, že v klíšťatech se vyskytují glutamát-řízené chloridové kanály, a to i ve střevech klíštěte (Cerqueira de Araujo et al., 2024). Výzkum byl proto proveden právě s dvěma vybranými kanály, exprimovanými ve střevních transkriptomech, a rekombinantní proteiny byly navrženy tak, aby pokrývaly extracelulární část GluCl kanálů (Obr. 5). Předpokládalo se, že právě ve střevech bude reakce nejsilnější, protože nasátá krev hostitele prochází právě skrz střeva a protilátky se tak dostanou ke glutamát-řízeným kanálům velmi snadno.

I přesto, že si imunizovaná morčata vytvořila potřebné protilátky, výsledná infestace neprokázala zvýšenou mortalitu, úbytek vah či snížení fertility samic klíšťat. IgG protilátky zřejmě nevyvolaly dostatečnou reakci pro vyvolání imunitní odpovědi a nezpůsobily tak žádné změny v organismu klíštěte. IgG frakce tedy nejsou tak účinné, jako například ivermektin, který v boji proti klíšťatům zůstává i nadále velmi efektivní antiparazitikum. Ivermektin cílí na glutamát-řízené chloridové kanály, po navázání mění jejich konformaci a způsobí tak hyperpolarizaci neuronů, což vede k paralýze a smrti parazita (Wolstenholme, 2005).

Navzdory negativním výsledkům v případě použití rekombinantních proteinů IrGluCl1 a IrGluCl2 pro imunizaci klíšťat, přinesl tento experiment další možnosti do budoucnosti. Například je možné v dalších pokusech provést imunizaci oběma zmiňovanými rekombinantními proteiny IrGluCl1 i IrGluCl2 najednou a zajistit tak větší reakci. Dalším možným postupem by bylo použít všechny nalezené geny kódující GluCl v genomu klíštěte *I. ricinus* (celkem šest) a imunizovat morčata všemi šesti identifikovanými glutamát-řízenými chloridovými kanály najednou. Hypoteticky by se opět zvýšila míra reakce, která se při použití pouze jednoho rekombinantního proteinu nedostavila.

V souvislosti s hledáním alternativních způsobů pro ochranu proti parazitům byla také vyvinuta rekombinantní vakcína Bm86 za účelem ochrany zemědělských zvířat proti klíšťatům v tropických a subtropických regionech. Tato vakcína je založena na principu fungování antigenu Bm86, identifikovaném v klíštěti *Boophilus microplus*. Antigen Bm86, nalezený ve střešní stěně klíštěte *B. microplus*, cílí na sekvence proteinu Bm86 v parazitovi (Cough and Kemp, 1993). Vakcína, komerčně prodávaná pod názvem GAVAC či TickGARD, svým účinkem nezvyšuje mortalitu klíšťat, ovlivňuje však jejich průměrnou fertilitu a snižuje tak reprodukční kapacitu až o 74 % (de Vos, 2001). Snižuje tak přenos původců nemocí, především babeziózy (de la Fuente et al., 1999).

Tyto výše zmiňované metody redukuje počty klíšťat a jiných parazitů a zabraňují tak přenosu původců život ohrožujících onemocnění, mezi které patří například klíšťová encefalitida či lymfská borelióza (Sonenshine, 1991). Pomáhají tak chránit zvířata i člověka, na kterých tyto parazité sají krev. V této bakalářské práci bylo

experimentálně zjištěno, že IgG frakce proti klíštěcím GluCl pravděpodobně nevykazují žádnou změnu ve fenotypu klíšťat jako například Bm86 (Penichet et al.,1994) a nemají tak pravděpodobně do budoucna žádný vakcinační potenciál.

6 Závěr

V této práci byla provedena experimentální imunizace morčat rekombinantními proteiny IrGluC11 a IrGluC12 a následná infestace klíšťat, jelikož se předpokládalo, že specifické protilátky vytvořené imunizací morčat budou mít pozitivní účinky cílením na glutamát-řízené chloridové kanály exprimované ve střevech klíštěte *I. ricinus*.

Nejdříve byla provedena exprese, následná kultivace a poté purifikace rekombinantních proteinů GluC11 a GluC12. Dále byla těmito rekombinantními proteiny úspěšně imunizována morčata, na kterých dále sála klíšťata. Po infestaci byla sledována váha nasátých samic, váha snůšek a líhnivost. Bylo vyvráceno, že cílení specifických protilátek anti – IrGluC1 na glutamát-řízené chloridové kanály má pozitivní účinky na mortalitu klíšťat.

Dále byl proveden tkáňový profil všech genů exprimující glutamát-řízené chloridové kanály *glucl1 – glucl6* v těle klíštěte *I. ricinus*. Experiment potvrdil, že glutamát-řízené chloridové kanály se vyskytují téměř ve všech tkáních, ne vždy však ve stejném množství.

Tato práce ukázala, že IrGluC11 a IrGluC12 nejsou vhodnými kandidáty pro potenciální vakcinaci, protože experiment neprokázal dostatečnou reakci v tělech klíšťat.

7 Seznam referencí

- Ashour, D. S.** (2019). Ivermectin: From theory to clinical application. *International journal of antimicrobial agents*, 54(2): 134–142.
- Balashov, Yu. S.**, A Translation of Bloodsucking Ticks (Ixodoidea) – Vectors of Diseases of Man and Animals. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America, 1972.
- Cerqueira de Araujo, A.**, Noël, B., Bretaudeau, A., Labadie, K., Boudet, M., Tadrent, N., Istace, B., Kritli, S., Cruaud, C., Olasso, R., Deleuze, J-F, Voordouw, M., Hervet, C., Plantard, O., Zamoto-Niikura, A., Chertemps, T., Maïbèche, M., Hilliou, F., Goff, G.L., Chmelar, J., Mazák, V., Jmel, M.A., Kotsyfakis, M., Medina, J.M., Hackenberg, M., Šimo, L., Koutroumpa, F.A., Wincker, P., Kopacek, P., Perner, J., Aury, J.M., Rispe, C. (2024). Genome sequences of four Ixodes species expands understanding of tick evolution. bioRxiv, 2024.2002.2029.581698.
- Connolly, C.N.**, Wafford, K.A. The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc Trans.* 2004 Jun;32(Pt3): 529–34.
- Cooper, G.M.** The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
- Cully, D.F.**, Wilkinson, H., Vassilatis, D.K., Etter, A., Arena, J.P. Molecular biology and electrophysiology of glutamate gated chloride channels of invertebrates. *Parasitology*. 1996;113(S1): S191-S200.
- De Jesús-Pérez, J.J.**, Castro-Chong, A., Shieh, R.C., Hernández-Carballo, C.Y., De Santiago-Castillo, J.A., Arreola, J. Gating the glutamate gate of CLC-2 chloride channel by pore occupancy. *J Gen Physiol*. 2016 Jan;147(1): 25–37.
- de la Fuente, J.**, Estrada-Pena, A., Venzal, J.M., Kocan, K.M., Sonenshine, D.E. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci*. 2008 May 1; 13: 6938–46.
- De La Fuente, J.**, Rodriguez, M., Montero, C., Redondo, M., Garcia-Garcia, J. C., Méndez, L., ... & Leonart, R. (1999). Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine GavacTM. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 15(3-5): 143–148.

- de Vos, S.,** Zeinstra, L., Taoufik, O., Willadsen, P., Jongejan, F. Evidence for the utility of the Bm86 antigen from *Boophilus microplus* in vaccination against other tick species. *Exp Appl Acarol.* 2001;25(3): 245–61.
- Estrada-Peña, A.** Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Rev Sci Tech.* 2015 Apr;34(1): 53–65.
- Gough, J.M.,** Kemp, D.H. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. *J Parasitol.* 1993 Dec; 79(6): 900-7. PMID: 8277383.
- Horn, M.,** Nussbaumerová, M., Sanda, M., Kovárová, Z., Srba, J., Franta, Z., Sojka, D., Bogyo, M., Caffrey, C.R., Kopáček, P., Mares, M. Hemoglobin digestion in blood-feeding ticks: mapping a multi-peptidase pathway by functional proteomics. *Chem Biol.* 2009 Oct 30;16(10): 1053–63.
- Chen, I.S.,** Kubo, Y. Ivermectin and its target molecules: shared and unique modulation mechanisms of ion channels and receptors by ivermectin. *J Physiol.* 2018 May 15;596(10): 1833–1845.
- Jongejan, F,** Uilenberg, G. Ticks and control methods. *Rev Sci Tech.* 1994 Dec;13(4): 1201–26.
- Jongejan, F.,** Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl S3-14.
- Keramidas, A.,** Moorhouse A.J., Schofield, P.R., Barry, P.H., Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Volume 86, Issue 2, 2004.
- Koolman, J.,** Röhm, K.H. Barevný atlas biochemie – 220 barevných tabulí od Jürgena Wirtha, Překlad 4. vydání, 2012. ISBN-13: 978-80-247-2977-0.
- Lynagh T.,** Lynch J.W. Ivermectin binding sites in human and invertebrate Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2012 Aug;33(8): 432–41.
- Lynch, J.W.,** Barry, P.H. (2007). 9 Ligand-Gated Ion Channels: Permeation and Activation. *Biological Membrane Ion Channels: Dynamics, Structure, and Applications*, 335.
- Lynch, J.W.** (2004). Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiological reviews*, 84(4), 1051–1095.

- Madden, D.** The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* **3**, 91–101 (2002).
- Martin, R.J.**, Robertson, A.P., & Choudhary, S. (2021). Ivermectin: an anthelmintic, an insecticide, and much more. *Trends in parasitology*, *37*(1), 48-64.
- Meyers J.I.**, Gray, M., Foy, B.D. Mosquitocidal properties of IgG targeting the glutamate-gated chloride channel in three mosquito disease vectors (Diptera: Culicidae). *J Exp Biol*. 2015 May 15; *218*(Pt 10): 1487–95.
- Mysliveček, J.**, *Základy neurovědy*, 3. vydání, 2022. ISBN-13: 978-80-7684-007-2.
- Nemecz, A.**, Prevost, M.S., Menny, A., Corringer, P.J. (2016). Emerging molecular mechanisms of signal transduction in pentameric ligand-gated ion channels. *Neuron*, *90*(3), 452–470.
- Nijhof, A.M.**, Balk, J.A., Postigo, M., Jongejan, F. (2009). Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus appendiculatus* ticks and determination of the expression profile of Bm86. *BMC Molecular Biology* *10*,112.
- O’Halloran, D.M.** Database of glutamate-gated chloride (GluCl) subunits across 125 nematode species: patterns of gene accretion and sequence diversification. *G3* *12.2* (2022): jkab438.
- Penichet, M.**, Rodriguez, M., Castellano, O., Mandado, S., Rojas, Y., Rubiera, R., Sanchez, P., Lleonart, R., De La Fuente, J. Detection of Bm86 antigen in different strains of *Boophilus microplus* and effectiveness of immunization with recombinant Bm86. *Parasite Immunol*. 1994 Sep; *16*(9): 493–500.
- Perner, J.**, Provazník, J., Schrenková, J. *et al.* RNA-seq analyses of the midgut from blood- and serum-fed *Ixodes ricinus* ticks. *Sci Rep* **6**, 36695 (2016).
- Pfaffl, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* *29*,45e–45.
- Qian, K.**, Jiang, C., Guan, D., Zhuang, A., Meng, X., Wang, J. Characterization of Glutamate-Gated Chloride Channel in *Tribolium castaneum*. *Insects*. 2023; *14*(7): 580.
- Rispe, C.**, Hervet, C., de la Cotte, N., Daveu, R., Labadie, K., Noel, B., Aury, J.M., Thany, S., Taillebois, E., Cartereau, A., Le Mauff, A., Charvet, C.L., Auger, C., Courtot, E., Neveu, C., Plantard, O. Transcriptome of the synganglion in the tick

Ixodes ricinus and evolution of the cys-loop ligand-gated ion channel family in ticks. *BMC Genomics*. 2022 Jun 23;23(1): 463.

Roma, G.C., Nunes, P.H., de Oliveira, P.R., Remédio, R.N., Bechara, G.H., Camargo-Mathias, M.I. Central nervous system of *Rhipicephalus sanguineus* ticks (Acari: Ixodidae): an ultrastructural study. *Parasitol Res*. 2012 Sep;111(3): 1277-85.

Sonenshine D.E. (1991). *Biology of Ticks*, Volume 1, Oxford University Press, New York, Oxford

Traynelis S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*. 2010 Sep; 62(3): 405-96.

Volf, P., Horák, P., *Paraziti a jejich biologie*, 1. vydání, 2007. ISBN-13: 978-80-7387-008-9.

Watkins, J.C., Jane, D.E. (2006), The glutamate story. *British Journal of Pharmacology*, 147: S100-S108.

Wolstenholme, A.J. (2012). Glutamate-gated chloride channels. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40232-40238.

Wolstenholme, A.J., M Kaplan, R. (2012). Resistance to macrocyclic lactones. *Current pharmaceutical biotechnology*, 13(6), 873-887.

Wolstenholme, A.J., Rogers, A. T. (2005). Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, 131(S1), S85-S95.