

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Dynamika aktivit trávicích proteáz ve střevě klíšťat
***Ixodes ricinus* během sání na hostiteli.**

Bakalářská práce

Jitka Konvičková

Školitel: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

České Budějovice 2012

Bakalářská práce

Konvičková J., 2012: Dynamika aktivit trávicích proteáz ve střevě klíšťat *Ixodes ricinus* během sání na hostiteli. [Dynamics of digestive enzymes in the gut of ticks *Ixodes ricinus* during blood feeding on the host. Bc. Thesis, in Czech] - 39 p + 11 p (supplement), Faculty of science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Annotation:

Proteolysis of ingested blood proteins is a crucial physiological process in ticks. This thesis focuses on profiling of dynamics of digestive enzymes in the ticks *Ixodes ricinus* during the course of blood-feeding on the host and during digestive phase after detachment from the host. We have measured the activity of digestive peptidases (using specific fluorescent substrates and inhibitors). The enzyme activities were negligible at the early stage of blood-feeding than increased dramatically towards the end of the feeding period and dropped down immediately after detachment from the host. The activity of most enzymes increased again during the digestive phase before oviposition of females or metamorphosis of nymphs. The protein level of each peptidase was confirmed by immunolocalization using Western blot analyses.

Tato práce byla financována z grantu číslo – IAA 600960910 (GAČR)

Prohlášení:

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

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

V Českých Budějovicích 12. prosince 2012.

Součástí této práce je publikace:

Franta Z, Frantova H, **Konvickova J**, Horn M, Sojka D, Mares M, Kopacek P. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. Parasit Vectors. 2010, 3: 119.

K této publikaci přispěla Jitka Konvičková měřeními aktivit jednotlivých trávicích proteáz (obr. 3) a detekcí hladin cathepsinu B v průběhu sání metodou Western blot (obr. 4A).

Poděkování:

Děkuji svému školiteli RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc. za odborné vedení, neskonalou trpělivost a čas, který mi při této práci věnoval a dále za možnost spolupráce na dalších projektech naší laboratoře. Mé veliké díky patří celému kolektivu naší laboratoře, který mi ochotně poskytoval cenné rady, podporu, výborné pracovní prostředí a skvělé přátele. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, která mě po celou dobu studia podporuje nejen materiálně, ale hlavně psychicky. Děkuji také všem přátelům, kteří mě drží nad vodou.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Klíšťata.....	1
1.2. Morfologie a životní cyklus	1
1.2.1. Argasidae	1
1.2.2. Ixodidae.....	2
1.3. Klíšťaty přenášené patogeny	3
1.4. Střevo klíštěte <i>I. ricinus</i>	4
1.5. Trávicí aparát <i>I. ricinus</i>	5
1.6. Fáze trávení krve	8
2. Metodika	9
2.1. Sběr klíšťat	9
2.2. Strojení morčat, odběr nasátých samic/nymf	9
2.3. Pitvání střevní tkáně dospělých samic klíštěte <i>I. ricinus</i>	10
2.4. Homogenizace tkání, příprava vzorků.....	10
2.5. Detekce relativních aktivit trávicích proteáz v homogenátech	11
2.6. SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) a Western blot	12
3. Výsledky	14
3.1. Dynamika aktivit a detekce proteinových hladin trávicích proteáz u dospělých samic <i>I. ricinus</i>	14
3.1.1. Dynamický profil aktivity Cathepsinu B	14
3.1.2. Detekce IrCB metodou Western blot.....	15
3.1.3. Dynamický profil aktivity Cathepsinu L	17
3.1.4. Detekce IrCL metodou Western blot	17
3.1.5. Dynamický profil aktivity Cathepsinu C	18
3.1.6. Dynamický profil aktivity Cathepsinu D.....	19
3.1.7. Detekce IrCD metodou Western blot.....	20

3.1.8. Dynamický profil aktivity legumainu	21
3.1.9. Detekce IrAE metodou Western blot	22
3.2. Dynamika aktivit a detekce proteinových hladin trávicích proteáz u nymfálního stádia klíštěte <i>I. ricinus</i>	23
3.2.1. Dynamický profil aktivity Cathepsinu B	23
3.2.2. Detekce IrCB metodou Western blot	25
3.2.3. Dynamický profil aktivity Cathepsinu L	26
3.2.4. Detekce IrCL metodou Western blot	27
3.2.5. Dynamický profil aktivity Cathepsinu C	28
3.2.6. Profil relativní aktivity asparaginylové endopeptidázy - legumain	30
4. Diskuze	32
5. Závěr	35
6. Seznam literatury	36
7. Příloha	39

Cíle práce

- Měření aktivit trávicích proteáz (cathepsin B, L, C, D a legumain) ve střevních homogenátech dospělých samic klíštěte *Ixodes ricinus* v definovaných časových intervalech v průběhu sání na hostiteli i v průběhu trávení před vykladením vajíček.
- Měření aktivit trávicích proteáz (cathepsin B, L, C a legumain) v celotělových homogenátech nymf klíštěte *Ixodes ricinus* v definovaných časových intervalech v průběhu sání na hostiteli i v průběhu trávení během metamorfózy.
- Detekce jednotlivých proteáz metodou Western blot.

1. Úvod

1.1. Klíšťata

Klíšťata jsou obligatorní krevsající ektoparazité. Taxonomicky se řadí do kmene členovců Arthropoda, podtřídy Acari, řádu Parasitiformes a podřádu Ixodida. Klíšťata jsou vektory významných patogenů (zahrnující viry, bakterie a protozoa) způsobujících těžká onemocnění lidí a zvířat (de la Fuente et al., 2008).

Podřád Ixodida je systematicky rozdělen do tří čeledí:

- Klíšťákovití (Argasidae) označovaná jako „soft ticks – měkká klíšťata“ (193 druhů) (Guglielmone et al., 2010)
- Klíšťovití (Ixodidae) známí jako „hard ticks – tvrdá klíšťata“ (702 druhů) (Guglielmone et al., 2010)
- Nuttalliellidae (monotypická skupina – 1 druh) (Nava et al., 2009)

1.2. Morfologie a životní cyklus

Tělo roztočů je rozděleno na 2 segmenty (Sonenshine, 1991):

- Gnathosoma (u klíšťat capitulum) – přední segment, kde je uloženo ústní ústrojí včetně chelicer, palp, hypostomu a chemoreceptorů .
- Idiosoma – zadní segment – zde jsou umístěny nohy a většina vnitřních orgánů.

1.2.1. Argasidae

Argasidae (klíšťáci) se vyznačují kožovitým tělním integumentem bez přítomnosti tvrdého štítku (scutum) na hřbetní straně těla. Argasidae se morfologicky liší od Ixodidae morfologií umístěním ústního ústrojí na subterminální části capitula (Sonenshine, 1991). Jejich životní cyklus se oproti Ixodidae vyznačuje větším počtem nymfálních stádií (3–4), dále počtem a délkou sání krve na hostiteli, která u klíšťákovitých dosahuje řádově minut až hodin. Po každém sání dospělých samic dochází k páření (mimo hostitele). Samice následně kladou malé snůšky vajíček (Jongejan et al., 2004).

1.2.2. Ixodidae

Pro čeleď Ixodidae je charakteristické scutum, tvrdý sklerotizovaný štítek, který zakrývá celou dorzální část těla samců a u samic zasahuje přibližně do jedné třetiny těla (Sonenhine, 1991). Samice, stejně tak jako nymfy a larvy, mají velmi elastickou idiosomu (kutikulu), díky níž jsou schopné zvětšit několikanásobně svůj objem v průběhu sání a získat dostatek potravy pro následnou tvorbu vajíček (Roberts et al., 1996). Na terminální části capitula najdeme u klíšťat výrazné ústní ústrojí s hypostomem, který je tvořen koncentrickými řadami zahnutých zoubků pro průnik do pokožky hostitele a udržení se v průběhu sání (Volf et al., 2007). Dorsální část těla je kryta jemnými štětinami, které slouží jako pohybové receptory. Samice mají navíc mezi scutem a capitulem sekreční orgán, nazývaný Geného orgán, produkující hydrofobní obal kolem každého z kladených vajíček (Sonenshine, 1991). Zástupci čeledi Ixodidae prochází v průběhu života třemi aktivními stádii po vylíhnutí z vajíčka: larva, nymfa, dospělec. Jednotlivá stádia sají pouze jedenkrát za život. Samice kladou velké snůšky vajíček (Jongejan et al., 2004). Samci v dospělosti nesají, dochází pouze ke kopulaci se samicemi.

Ixodes ricinus

Klíště obecné *Ixodes ricinus* má typický tříhostitelský cyklus, kdy každé stádium, kromě vajíčka, saje na jiném hostiteli. Tento cyklus trvá 2-3 roky. *I. ricinus* se vyskytuje napříč celou Evropou, ale i ve východní a severní Africe. Klíšťata preferují vlhké biotopy s hustým porostem, převážně smíšené a listnaté lesy. Šestinohá larva saje na drobných hlodavcích a ptácích, nymfy sají na větších obratlovcích, dospělé samice sají zejména na větší lesní zvěři, domácích kopytnících a psech. Člověk může být hostitelem všech těchto stádií (Volf et al., 2007). Klíšťata vyčkávají na svého hostitele na vrcholech rostlin s charakteristicky roztaženým prvním párem končetin pro uchycení se na hostiteli. Při kontaktu s hostitelem rozruší jeho epidermis pomocí chelicer a hypostomu, následně zajistí upevnění v epidermis pomocí tzv. cementu vylučovaného slinnými žlázami (Goddard, 2008). Expresí proteinů, které chrání klíště před dehydratací, se ve slinných žlázách zvyšuje až v průběhu sání (Bowman et al., 2004). Klíšťata jsou schopna sát dlouhou dobu bez zpozorování hostitelem díky vpravení komplexu proteinů a bioaktivních molekul ze slinných žláz do jeho krve. Tyto proteiny mají v hostiteli antikoagulační, protizánětlivé a imunosupresivní účinky (Sauer et al., 2000).

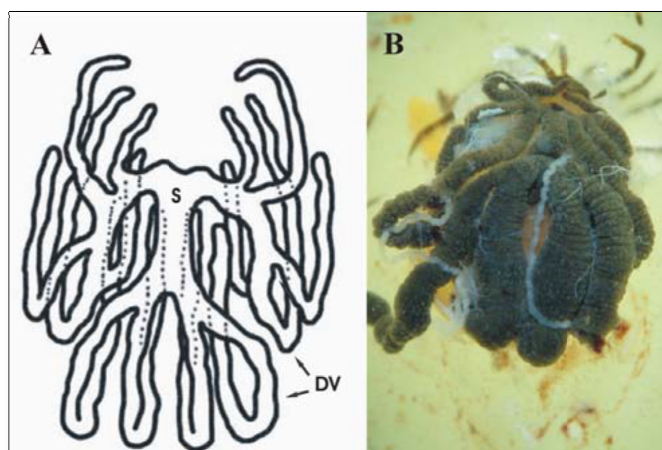
1.3. Klíšťaty přenášené patogeny

K přenosu patogenů dochází během sání na hostiteli. Přibližně 10% doposud známých druhů klíšťat je vektorem široké škály patogenů (virů, bakterií, protozoí) způsobujících onemocnění zvířat i člověka (Jongejan et al., 2004). Místem přenosu patogenů do hostitele jsou slinné žlázy, ze kterých jsou patogeny uvolňovány do krve hostitele (Sauer et al., 2000). Mezi nejnebezpečnější onemocnění způsobená klíšťetem *I. ricinus* patří bakteriální lymeská borelióza způsobená spirochétami *Borrelia burgdorferi sensu lato* a dále meningoencefalitida, jejímž původcem je neurotropní flavivirus TBEV (Tick-Borne Encephalitis Virus) (Nutall, 1999). Klíšťata infikovaná borreliemi zůstávají patogenní i po období metamorfózy ve vyšší instar, tedy ze stádia larva → nymfa, nymfa → dospělec (Radolf et al., 2012). Přenos těchto bakterií není transovariální, tj. nakladená vajíčka nejsou infikována (Hovius et al., 2007). V průběhu sání krve na hostiteli se spirochéty množí v lumen střeva a mění expresi svých povrchových proteinů, což jim umožňuje přesun ze střeva do slinných žláz, z nichž dochází k přenosu patogenu na hostitele (Hovius et al., 2007). Proto se domníváme, že účinné narušení sání a trávení by zároveň mohlo zabránit přenosu patogenů na hostitele (Franta et al., 2010).

I. ricinus je dále přenašečem ehrlichiózy (způsobena bakterií *Anaplasma phagocytophilum*) (de la Fuente et al., 2008), babesiósy (způsobena parazitickým prvokem *Babesia sp.*) a řady dalších onemocnění (Beaty et al., 1996).

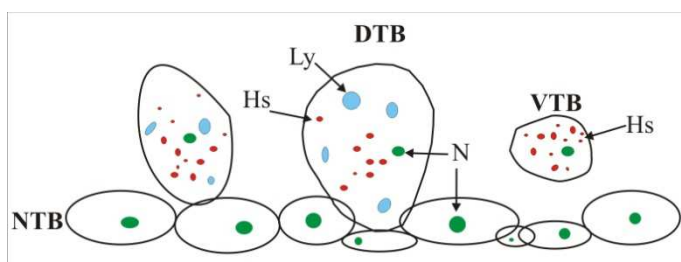
1.4. Střevo klíštěte *I. ricinus*

Střevo je u *I. ricinus* největším tělním orgánem. Je rozděleno na tři úseky: přední, střední a zadní střevo. Dochází zde k trávení nasáté hostitelské krve (největší měrou ve středním střevě). Střední střevo zaujímá v průběhu sání téměř celý prostor tělní dutiny. Jeho centrální část tvoří žaludek (ventriculus), dále obsahuje párové válcovité výběžky (diverticulae) (Obr.1).



Obr. 1. Střední střevo *I. ricinus* (převzato z Franta, 2012). A – schématický náčrt klíštěcího střeva. S – žaludek, DV – diverticulae – válcovité výběžky. B – náhled do tělní dutiny polonasáté samice.

Stěna střeva je tvořena jednou vrstvou epitelálních buněk (ohraničují lumen na vnitřní straně střeva) a svalovými vlákny (zajišťujícími peristaltiku střev), mezi nimiž je tenká bazální lamina (Balashov et al., 1983). Střevní epitel *I. ricinus* obsahuje 2 typy trávicích buněk (Obr. 2): (i) nediferencované, které aktivně netráví, (ii) diferencované – zajišťují aktivní trávení. V průběhu trávení hostitelské krve se nediferencované buňky mění na diferencované, aktivně trávící buňky. Jakmile dojde k naplnění trávicích buněk odpadními látkami z průběhu trávení, dochází k odpojení těchto buněk a k jejich zpracování v lumen střeva (Coons and Alberti, 1999).



Obr. 2. Schéma střevního epitelu polonasáté samice *I. ricinus*. NTB - nediferencované trávící buňky, DTB - diferencované trávící buňky, VTB - uvolněné trávící buňky, Ly - lysozomy, Hs - hemozomy, N - nucleus (jádro).

Hostitelská krev obsahuje více než 80% hemoglobinu a albuminu, které jsou pro klíšťata hlavním zdrojem živin a aminokyselin. Lara et al. (2005) popsali rozdíl mezi dvěma typy endocytózy, které slouží k přenosu těchto makromolekul z lumen střeva dovnitř trávicích buněk. Hemoglobin, je transportován pomocí endocytózy zprostředkované specifickými receptory pro hemoglobin („Receptor Mediated Endocytosis“), zatímco albumin je přes membránu střevních buněk transportován pomocí pinocytózy malých kapének tzv. „Fluid Phase Endocytosis“ (Lara et al., 2005). Shluky transportovaných vezikul splývají v endozomy, které následně splývají s primárními lysozomy, a tvoří tak sekundární lysozomy, ve kterých dochází k trávení (Sonenshine, 1991).

Při štěpení hemoglobinu dochází k hromadění toxického hemu v buňkách střevního epitelu, který může indukovat tvorbu volných radikálů. Detoxikace hemu je tedy nezbytnou součástí trávicího aparátu klíšťat. Hem je z velké části ukládán ve formě agregátů do specializovaných organel, hemozomů, vzniklých vchlípením membrány střevního epitelu. Hemozomy jsou pak spolu s trávicími buňkami uvolněnými do střevního lumen vylučovány defekací (Lara et al., 2003).

1.5. Trávicí aparát *I. ricinus*

Trávení ve střevě klíšťat probíhá intracelulárně v kyselém prostředí trávicích vakuol střevních buněk. Výjimkou je hemolýza krevních buněk, která probíhá v lumen středního střeva (Hovius et al., 2007, Sonenshine, 1991). Trávení krve u klíšťat je zprostředkováno cysteinovými a aspartátovými proteázami, což se do velké míry podobá trávení krve u parazitických platyhelminťů a nematod (Sojka et al., 2008). Nepřítomnost aktivních trávicích proteáz v lumen střeva u klíšťat umožňuje lumen fungovat jako místo pro dlouhodobé uchování nasáté krve (Sonenshine, 1991).

Klíšťata se liší trávením hostitelské krve od krevsajcího hmyzu, kde trávení krve probíhá bezprostředně po jejím nasátí v přítomnosti serinových proteáz typu trypsinu, které jsou sekretované do lumen střeva a jsou aktivní v zásaditém pH (Gooding, 1972).

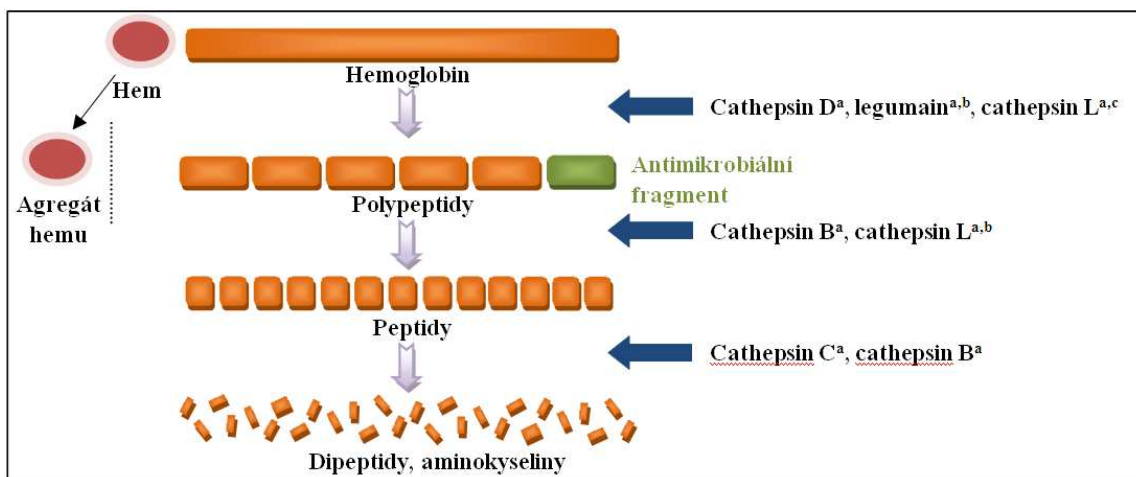
Původní představa, že trávení je řízeno jediným enzymem, „hemoglobinázou“, byla vyvrácena. Trávení hostitelské krve je u *I. ricinus* realizováno multienzymatickou kaskádou cysteinových a aspartátových proteáz, které byly popsány u různých druhů klíšťat (Tab. 1).

Tab. 1. Seznam cysteinových a aspartátových proteáz účastnících se trávení krve u různých druhů klíšťat.

Druh klíštěte	Proteáza	Specifita	Výskyt	Publikace
<i>Haemaphysalis longicornis</i>	Longepsin	Cathepsin D	Střevo, slinné žlázy	Boldbaatar et al., 2006
	Longipain	Cathepsin B	Střevo	Tsuji et al., 2008
	H1CPL-A	Cathepsin L	Střevo	Yamaji et al., 2009
	H1Lgm	Legumain	Střevo	Alim et al., 2008
<i>Rhipicephalus microplus</i>	BmAP	Cathepsin D	Střevo	Cruz et al., 2010
	BmCL1	Cathepsin L	Střevo	Cruz et al., 2010
<i>Ixodes ricinus</i>	IrCB	Cathepsin B	Střevo	Franta et al., 2010
	IrCL1	Cathepsin L	Střevo, slinné žlázy, vaječníky, Malpighiho trubice	Franta et al., 2011
	IrCC	Cathepsin C	Střevo, slinné žlázy, vaječníky, Malpighiho trubice	Franta et al., 2010
	IrAE	Legumain	Gut	Sojka et al., 2007
	IrCD	Cathepsin D	Gut	Sojka et al., 2008

V naší laboratoři jsme se dlouhodobě zaměřili na studium 5 majoritních proteáz u *I. ricinus*: cysteinové proteázy cathepsin B, L, C, asparaginylová endopeptidáza (legumain) a aspartátová proteáza cathepsin D (Sojka et al., 2008). Při hemoglobinolýze (Obr. 3) dochází k postupné degradaci hemoglobinu štěpením hemoglobinových tetramerů na menší fragmenty. Hemoglobin je nejprve štěpen endoproteázami cathepsinem D a L (IrCD, IrCL) a legumainem (IrAE) na velké fragmenty, z nichž některé mají antimikrobiální aktivitu proti Gram pozitivním bakteriím (Fogaca et al., 1999).

Další štěpení polypeptidů na menší peptidy probíhá zejména díky endoproteázové aktivitě cathepsinu B (IrCB). Štěpení na jednotlivé aminokyseliny umožňují exopeptidázy, zejména cathepsin C (IrCC) a cathepsin B.



Obr. 3. Schéma degradace hemoglobinu ve střevě *I. ricinus* (upraveno podle Horn et al., 2009).

^a – Franta et al., 2010, ^b – Franta et al., 2011, ^c – Sojka et al., 2007.

Aspartátová proteáza IrCD

V trávicím aparátu klíštěte *I. ricinus* byla popsána aspartátová proteáza IrCD z klanu AA. IrCD je v buňkách syntetizován ve formě preproproteinu, tj. prekursor neaktivního proenzymu, který obsahuje signální sekvenci pro transport do trávicích organel. Inaktivní prekursor enzymu, Pro-IrCD ~47 kDa je aktivován autokatalyticky v kyselém pH na aktivní IrCD ~40 kDa (Sojka et al., 2012).

IrCD iniciuje společně s cysteinovými proteázami IrCL a IrAE štěpení hemoglobinu na sekundární fragmenty – polypeptidy (Horn et al., 2009).

Cysteinová proteáza typu legumainu (IrAE)

Asparaginylová endopeptidáza IrAE identifikovaná u *I. ricinus* patří do klanu CD, rodiny C13 cysteinových proteáz. IrAE se podílí na primárním štěpení hemoglobinu. Proenzym IrAE odpovídá ~47 kDa a aktivní IrAE ~38-40 kDa (Sojka et al., 2007). Tento enzym je aktivní v kyselém pH (pH optimum 5.5) a byla u něj potvrzena úzká specifita štěpení proteinových substrátů výlučně za asparaginem v P1 poloze (Sojka et al., 2007). Sajid et al. (2003) ve své práci ukázal, že u motolice *Schistosoma mansoni* probíhá tzv. trans-aktivace cathepsinu B v přítomnosti legumainu. Tato aktivace byla potvrzena i pomocí rekombinantního IrAE z klíštěte (Sojka et al., 2007).

Cysteinové proteázy typu papainu (IrCB, IrCL, IrCC)

U klíštěte *I. ricinus* byly popsány 3 hlavní typy cysteinových proteáz typu papainu: IrCL, IrCB, IrCC, které patří do klanu CA, rodiny C1 (Sojka et al., 2008, Franta et al., 2010). Endoproteáza IrCL je aktivní v kyselém pH, její proenzym byl detekován ve velikosti ~40 kDa a aktivní enzym o velikosti 28 kDa (Franta et al., 2011). IrCL se aktivně podílí na počátečním štěpení hemoglobinu na velké fragmenty, a následným štěpením na kratší peptidy (Horn et al., 2009).

IrCB má jak endoproteázovou tak exoproteázovou (karboxydipeptidázovou) aktivitu. Proenzym IrCB má velikost ~36 kDa a aktivní enzym ~30-32 kDa (Sojka et al., 2008). IrCB štěpí polypeptidy na menší peptidy a následně odštěpuje dipeptidy z C-konců vzniklých fragmentů. Z hlediska množství je IrCB nejvíce zastoupenou proteázou v celém trávicím systému (Horn et al., 2009).

IrCC je exopeptidáza, která odštěpuje dipeptidy z N-konce peptidů (dipeptidyldipeptidáza) vzniklých při hemoglobinolýze. Její proenzym má velikost ~50 kDa a enzym ~35 kDa (Sojka et al., 2008)

1.6. Fáze trávení krve

Sání krve klíštětem *I. ricinus* má po přichycení na hostitele několik fází. Během prvních 24–36 hodin probíhá tzv. přípravná fáze, kdy není patrné aktivní trávení. V tomto období klíště vpravuje hypostom do hostitele a upevňuje své přichycením sekrecí cementu okolo rány (Coons et al., 1986). Následuje fáze pomalého sání, kdy dochází k pozvolnému nasávání krve a zvětšování objemu klíštěte. Získaná energie je využita především pro tvorbu kutikuly, která se několikanásobně zvětšuje v průběhu sání. Během této periody již dochází ke kontinuálnímu intracelulárnímu trávení (Sonenshine, 1991). V poslední fázi sání dochází k prudkému zvětšení objemu hostitelské krve tzv. fáze „rapid engorgement“, to je možné pouze u oplodněných samic, které v posledních 1-2 dnech sání zvětší enormně svůj objem (Sonenshine, 1991).

Po ukončení sání a odpadnutí z hostitele dochází u samic k další fázi trávení, při kterém je strávená krev využita zejména pro produkci velkého množství vajíček.

V průběhu sání larev a nymf nedochází k poslední fázi rychlého sání jako u samic. Po pouštění z hostitele nastává fáze trávení a tvorby energie nutné k metamorfóze na vyšší instar (larva → nymfa, nymfa → dospělec).

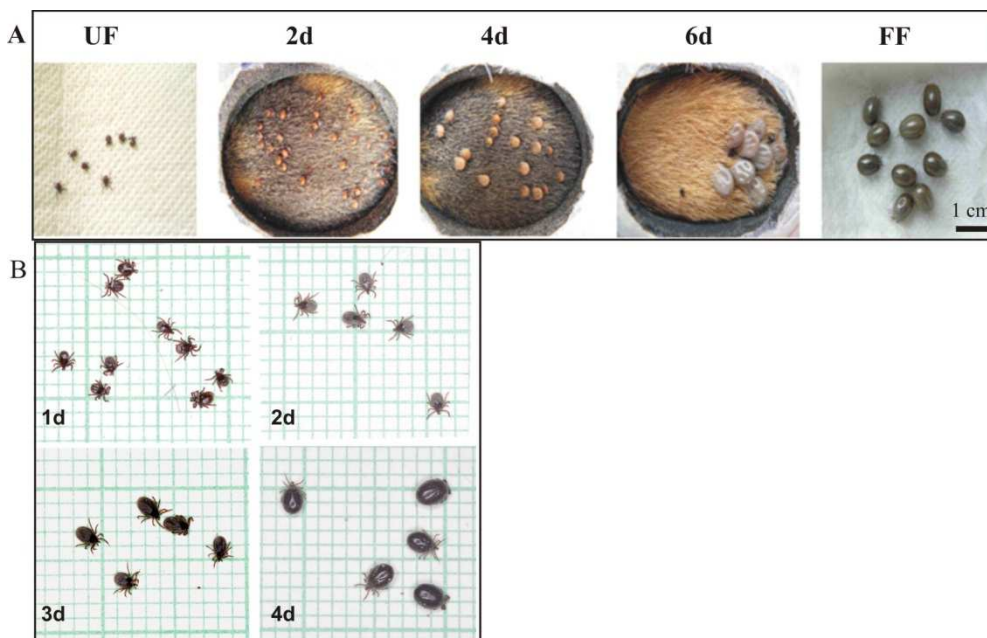
2. Metodika

2.1. Sběr klíšťat

Klíšťata *I. ricinus* dvou vývojových stádií (nymfy, samice) byly nasbírány metodou vlnkování v okolí lesa za sídlištěm Máj v Českých Budějovicích. V případě nymfálního stádia klíštěte *I. ricinus* byly nasbírány 2 sady: jarní sada 2010 a letní sada 2011. Třetí sada nymf pocházela z laboratorního chovu 2010/11 Parazitologického ústavu BC AVČR. Dospělé samice pochází ze sběrů ve třech obdobích: podzim 2011, jaro 2012, léto 2012.

2.2. Strojení morčat, odběr nasátých samic/nymf

Nymfy i dospělé samice sály na laboratorních morčatech v počtu 25 samic/morče a 100 nymf/morče. Morčata byla před aplikací intramuskulárně uspána injekcí přípravku NARKETAN (Vetoquino) dávkou 0,2 ml/morče. Obě vývojová stádia byla umístěna do tzv. kloboučků lokalizovaných na hřbetní části morčat. Klobouček byl následně zakryt ochrannou sítí. Klíšťata byla z morčat odebírána v konkrétních intervalech v průběhu sání a následně v plně nasátém stavu (tj. v den puštění) (Obr. 4). Nymfy i samice byly dále odebírány v průběhu trávení až do fáze metamorfózy (nymfy) či ovipozice (samice). Jednotlivé intervaly a počty jedinců jsou zaznamenány v tabulce 2 a 3.



Obr. 4. Velikost samic a nymf v jednotlivých intervalech odběru. A – samice (UF – nenasáté samice, 2d-6d – dny sání, FF – plně nasáté samice). B – nymfy na milimetrovém papíru (1d-4d – dny sání). Snímky: Jan Erhart, Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR.

Tab. 2. Počet samic odebraných pro jednotlivé intervaly u tří sledovaných skupin.

	UF	S			FF	T		
Dny odebrání	0	2	4	6	8	13	19	25
Podzim 2011	11	9	9	9	8	9	9	9
Jaro 2012	12	12	9	9	10	10	10	6
Léto 2012	8	8	8	8	9	7	7	7

UF – nenasáté samice, S – doba sání, FF – plně nasáté samice, T – doba trávení mimo hostitele před fází ovipozice.

Tab. 3. Počet nymf odebraných pro jednotlivé intervaly u tří sledovaných skupin.

	UF	S			P		T			
Dny odebrání	0	1	2	3	4	5	13	19	25	32
Jarní sada 2010	25	25	25	25	20	20	15	15	15	15
Laboratorní sada 2010	25	25	25	25	25	25	20	15	15	20
Letní sada 2011	25	25	25	25	20	20	20	20	15	15

UF – nenasáté nymfy, S – doba sání, P – plně nasáté nymfy v období pouštění se z hostitele, T – trávení a metamorfóza.

2.3. Pitvání střevní tkáně dospělých samic klíštěte *I. ricinus*

Střevní tkáň samic byla vypitvána pod binokulárním stereomikroskopem (Stemi DV4, Zeiss) v jednotlivých časových intervalech. Při práci byl kladen důraz na neporušení střevního epitelu, aby nedošlo ke ztrátě proteinů obsažených ve střevních buňkách. Tkáň byla promyta v 500 µl 1x PBS a zbavena tak nadbytečné hostitelské krve. Vypitvané tkáně byly uloženy v -80 °C do doby jejich homogenizace.

2.4. Homogenizace tkání, příprava vzorků

Střevní tkáně samic z jednotlivých intervalů byly smíchány s 300 µl ledově studeného extrakčního pufru (0,1 M octan sodný, pH 5.0) v 1,5 ml mikrozkuhavce. Následně byly všechny vzorky homogenizovány plastovým homogenizátorem a zmrazeny ponořením do kapalného dusíku. Tento proces byl třikrát opakován. Poté byly všechny vzorky doplněny

extrakčním pufrům na výsledný objem 1000 μl , v případě celotělových homogenátů nymf 700 μl . V této části bylo u všech vzorků odebráno 100 μl vzorku pro elektroforetickou analýzu a Western blot (viz níže). Do zbylého středního extraktu byl přidán vodný roztok detergentu CHAPS – (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate) na výslednou koncentraci 1% (w/v). Vzorky byly následně inkubovány v termomixéru Eppendorf (1400 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 30 min) a stočeny v předchlazené centrifuzě Multifuge 3 (Hereaus) (16000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 min). Supernatant byl rozpipetován do 50 μl alikvotů a vzorky byly uchovány v -80 $^{\circ}\text{C}$, dokud nebyly použity pro měření aktivit.

2.5. Detekce relativních aktivit trávicích proteáz v homogenátech

Relativní aktivita jednotlivých cysteinových proteáz u všech vzorků byla stanovena pomocí specifických fluorescenčních substrátů na bázi aminomethylcoumarinu (AMC). Aktivita aspartátové proteázy (IrCD) byla stanovena pomocí FRET (fluorescence resonance energy transfer) substrátu. Nežádoucí vedlejší aktivity cathepsinu B popř. všech cysteinových proteáz byly potlačeny pomocí specifických inhibitorů (Tab. 4). Pro každou proteázu byl připraven reakční pufr, jehož pH je optimální pro každý detekovaný enzym (Tab. 4) (Horn et al., 2009, Franta et al., 2010).

Tab. 4. Reakční pufr, substráty a inhibitory pro jednotlivé enzymy

Enzym	Reakční pufr	pH	Substrát (výsledná koncentrace)	Inhibitor (výsledná koncentrace)
IrCB	0,2 M NaH_2PO_4 + 2,5 mM DTT* + 1 M EDTA	5.5	Z-Arg-Arg-AMC (5 μM) ^a	-
IrCL	0,05 M kys. citronová + 0,1 M NaH_2PO_4 + 0,1 M NaCl	4.0	Z-Phe-Arg-AMC (5 μM) ^a	CA-074 (2,5 μM) ^c
IrCC	0,1 M NaH_2PO_4 + 0,025 M NaCl + 2,5 mM DTT	5.5	Gly-Arg-AMC (40 μM) ^a	-
IrAE	0,05 M kys. citronová + 0,1 M NaH_2PO_4 + 0,1 M NaCl	4.0	Z-Ala-Ala-Asn-AMC (10 μM) ^a	CA-074 (2,5 μM) ^c
IrCD	0,05 M kys. citronová + 0,1 M NaH_2PO_4 + 0,1 M NaCl	5.5	Abz-Lys-Pro-Ala-Glu-Phe- Nph-Ala-Leu (32 μM) ^b	E-64 (5 μM) ^d

^a – AMC substráty (Bachem), ^b – substrát syntetizovaný a poskytnutý laboratoří Dr. Mareše (ÚOCHAB, Praha),

^c – specifický inhibitor IrCB (Sigma-Aldrich), ^d – inhibitor cysteinových proteáz papainového typu (IrCB, IrCC, IrCL) od firmy Sigma, * - dithiothreitol (Thermo Scientific).

V průběhu přípravy reakce byly vzorky udržovány na ledu, aby se předešlo samovolnému rozkladu enzymu v extraktech. Měření bylo provedeno v mikrodestičkovém fluorimetru Infinite 200M (TECAN) s dvojitým monochromátorem v černých 96-jamkových mikrodestičkách (Nunc). Podmínky detekce fluorescence u substrátů na bázi AMC a u substrátu pro IrCD jsou uvedeny v tabulce 5.

Tab. 5. Pipetovací schéma a podmínky pro měření aktivit trávicích proteáz

Enzym	Pipetovací schéma	Excitace/Emise
IrCB, IrCL, IrAE	20 µl vzorku + 80 µl AB + 100 µl S	360/465
IrCC	20 µl vzorku + 60 µl AB + 20 µl S	360/465
IrCD	20 µl vzorku + 60 µl AB + 20 µl S	330/425

AB – reakční pufr, S – substrátový roztok (2x resp. 5x koncentrovaný substrát v reakčním pufru).

Pro jednotlivé extrakty z celotělových homogenátů nymf a střevních homogenátů samic bylo provedeno orientační měření relativních aktivit všech sledovaných enzymů. Ředění, ve kterém bylo naměřeno ~1500 relativních fluorescenčních jednotek za minutu (RFU/1 min) bylo použito jako výchozí ředění pro měření triplicátů (pro příklad viz Tab. 6), jejichž průměrné hodnoty RFU/1 min byly přepočteny na RFU/1 min/střevo u samic a u nymf byl přepočet stanoven pro počet RFU/1 min/nymfu.

Tab. 6. Typická výchozí ředění homogenátů střevních tkání samic z podzimu 2011 pro 6. den sání a plně nasáté samice.

Dny	Enzym				
	IrCB	IrCL	IrCC	IrCD	IrAE
6d (8,1střev)^a	80x	40x	600x	20x	4x
FF (7,2 střev)^a	80x	20x	400x	40x	10x

^a – Počet střev po korekci na část použitou pro měření aktivit (po odebrání vzorku pro elektroforézu).

2.6. SDS elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) a Western blot

Roztoky pro SDS elektroforézu a Western blot jsou popsány v tab. 7. Vzorky homogenizovaných tkání samic a celotělových extraktů nymf byly pro SDS-PAGE ředěny ve vzorkovém redukcijním pufru. Pro elektroforézu byla použita jednotka Mighty Small 250 (Hoefler). Elektroforéza probíhala v polyakrylamidovém gradientovém gelu (5-17,5 %)

v přítomnosti elektroforetického pufru ve stejnosměrném elektrickém poli nejprve 100 V/10 min, následně 200 V. Poté byly gely použity pro přenos proteinů na PVDF (polyvinylidenfluorid) membránu (Immobilon) nebo byly obarveny barvicím roztokem a následně promyty odbarvovacím roztokem pro zjištění správného ředění vzorků jednotlivých homogenátů použitých pro Western blot.

Pro přenos na PVDF membránu, která byla před blotováním ponořena do metanolu, byl vytvořen sendvič pro Western blot. Proteiny byly následně blotovány 1,5 h v konstantním elektrickém poli 150 mA v blotovací jednotce Series Transphor (Hoefler). Poté byla část membrány s LMW markerem obarvena v barvicím roztoku a následně odbarvena odbarvovacím roztokem. Membrány pro imunodetekci byly 1 h ponořeny v blokovacím pufru. Následně byla membrána inkubována 2 h v primární protilátce naředěné 1:50 v blokovacím pufru. Primární protilátky proti rekombinantním proteinům (IrCB, L, D a IrAE) byly dříve připraveny v naší laboratoři. Pro odstranění nenavázaných primárních protilátek byla membrána 5 x promyta v PBS Tween po 5 min. Posléze byla membrána inkubována 1 h v sekundární protilátce konjugované s křenuvou peroxidázou (SwAR/Px, Sevac, Praha) ředěné 1:2000 v PBS Tween. Pro odmytí nenavázaných sekundárních protilátek byla membrána opět 5 x promyta v PBS Tween po 5 min. Proteiny detekované specifickými protilátkami byly v přítomnosti substrátového roztoku obarveny přidáním 30 % H₂O₂, který reakcí s peroxidázou barví DAB (3-3'diaminobenzidine) do hněda. Tato reakce byla zastavena promytím membrány v destilované vodě.

Tab. 7. Roztoky pro SDS-PAGE a Western blot

	Složení
Vzorkový redukující pufr	0,75 M Tris/HCl, pH 6,8, 5 % SDS, 50% (v/v) glycerol, 32 mM DTT, 0,25 % (w/v) bromfenolová modř
Elektroforetický pufr	25 mM Tris, 192 mM glycin, 0,1 % SDS
Barvicí roztok	0,05 % Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) kys. octová
Odbarvovací roztok	25 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) kys. octová
Blotovací pufr	0,125 M Tris, 0,96 M glycin, 20 % metanol, 0,1 % (w/v) SDS
Proteinový marker (LMW)	LMW Electrophoresis Calibration Kit (Amersham)
PBS Tween	1× PBS, 0,05 % (v/v) Tween 20
Blokovací roztok	5 % (w/v) sušené mléko, 1x PBS, 0,05 % (v/v) Tween
Substrátový roztok	100 mM Tris-HCl pH 7.5 s přidaným H ₂ O ₂ (100 µl/100 ml) a DAB (50 µg/100 ml)

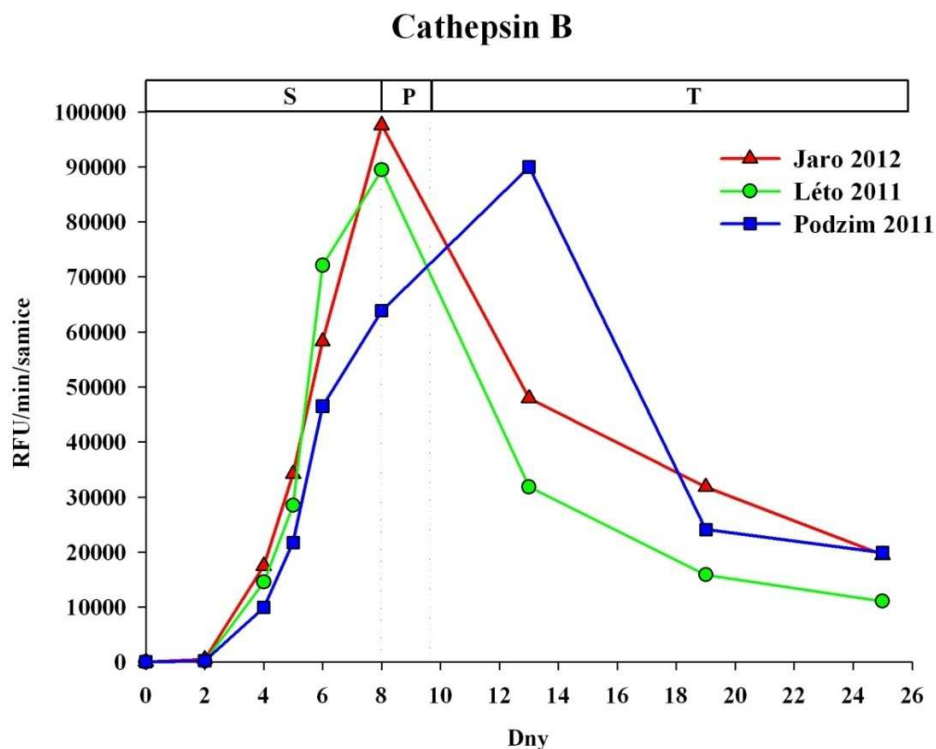
3. Výsledky

3.1. Dynamika aktivit a detekce proteinových hladin trávicích proteáz u dospělých samic *I. ricinus*

Stanovení hodnot aktivit 5 majoritních trávicích proteáz (cathepsin B, L, C, D a legumain) bylo provedeno u dospělých samic *I. ricinus*. Byly měřeny tři skupiny samic sebraných ve třech ročních obdobích (podzim 2011, jaro 2012, léto 2012). Měření probíhalo v tkáňových extraktech střev. Profily jednotlivých proteáz byly stanoveny pomocí specifických fluorescenčních substrátů a za přítomnosti inhibitorů (vyjma IrCB, IrCC). Tyto výsledky byly potvrzeny imunodetekcí metodou Western blot s výjimkou IrCC pro který nejsou v současné době dostupné kvalitní protilátky.

3.1.1. Dynamický profil aktivity Cathepsinu B

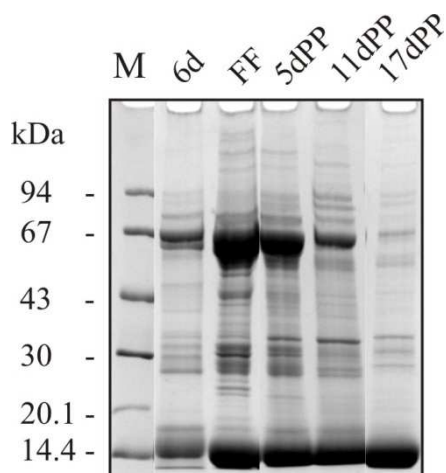
Aktivita cathepsinu B u nenasátých samic a samic sajících 2 dny na hostiteli je nulová (Obr. 5). V následujících fázích sání exponenciálně vzrůstá až na hodnotu svého maxima u plně nasátých samic. Podzimní sada 2011 zachovává růst aktivit i v období po odpadnutí z hostitele a svého maxima dosahuje až v 5 dni trávení mimo hostitele. Všechny tři pozorované sady mají podobný průběh snižování aktivity během trávení mimo hostitele, tyto hodnoty se snižují na 10 % z maxima v období těsně před kladením vajíček.



Obr. 5. Profil aktivit IrCB ve střevních extraktech samic *I. ricinus* v průběhu sání a metamorfózy u tří skupin samic z různých ročních období. S – sání, P – plně nasáté samice po odpadnutí z hostitele, T – období trávení mimo hostitele a před ovipozicí.

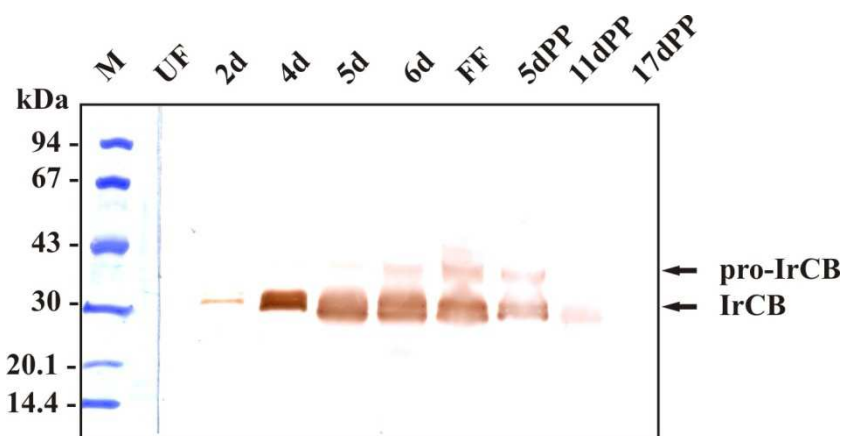
3.1.2. Detekce IrCB metodou Western blot

Detekci trávicích proteáz metodou Western blot (s výjimkou IrCC) byla provedena po ověření správného ředění střevních homogenátů pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Na SDS-PAGE a následné imunodetekce proteinových hladin byly použity homogenáty z podzimní sady samic 2011 (Obr. 6). Bylo použito ředění homogenátů, které odpovídá množství 0,13 střeva na jamku.



Obr. 6. SDS-PAGE kontrola ředění vybraných střevních homogenátů samic *I. ricinus*. M – LMW marker, 6d – 6. den sání, FF – plně nasáté samice, 5dPP, 11dPP, 17dPP – dny po puštění se z hostitele. Ředění extraktů odpovídá 0,13střeva/jamka.

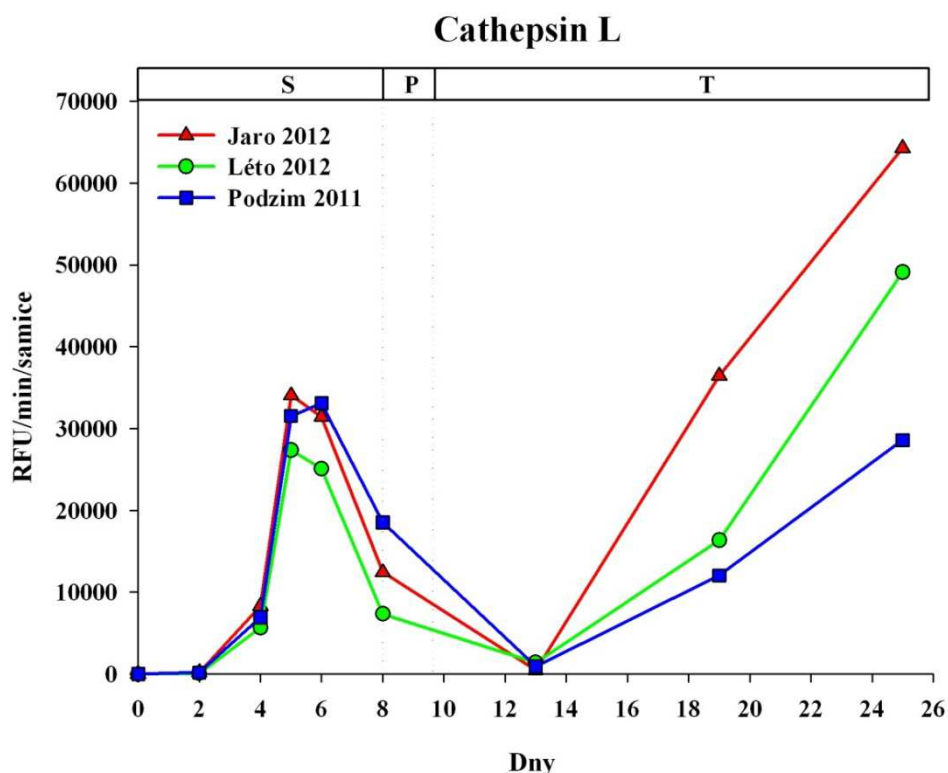
Proteinová hladina IrCB (Obr. 7) je u nenasátých samic nulová. Ve 2. dni sání je slabě detekován protein, který odpovídá velikosti aktivního IrCB. V průběhu sání (4. den sání – plně nasáté samice) je viditelná vysoká koncentrace IrCB v podobě dvojitého bandu s velikostí ~31 a 33 kDa, které zřejmě odpovídají dvěma aktivním formám IrCB1 a IrCB2. V období trávení krve mimo hostitele se tyto hladiny snižují. Poslední den před ovipozicí nebyl protein pomocí specifických protilátek detekován. V době od 6. dne sání až do 5. dne po puštění z hostitele byl pozorován protein o velikosti ~ 38 kDa, který byl popsán jako neaktivní proenzym IrCB (Sojka et al., 2008).



Obr. 7. Western Blot IrCB v průběhu sání a trávení samic podzimní sady 2011. Ředění vzorků odpovídá 0,13 střeva/jamka. M – LMW marker, UF – nenasáté samice, 2d, 4d, 5d, 6d, - dny sání, FF – plně nasáté samice, 5dPP, 11dPP, 17dPP – počet dní po puštění z hostitele, pro-IrCB – proenzym IrCB.

3.1.3. Dynamický profil aktivity Cathepsinu L

Profil aktivity IrCL v čase (Obr. 8) u tří pozorovaných skupin samic stoupá z nulových hodnot od 2. dne sání až do 6. dne sání. V další fázi sání dochází k postupnému poklesu aktivity IrCL, která se v 5. dni po puštění z hostitele blíží k téměř nulovým hodnotám (v grafu 13. den). Od tohoto okamžiku až do ovipozice dochází k nárůstu relativních aktivit až do hodnot maxima, které dvojnásobně převyšuje nejvyšší hodnoty dosažené během sání (6. den).

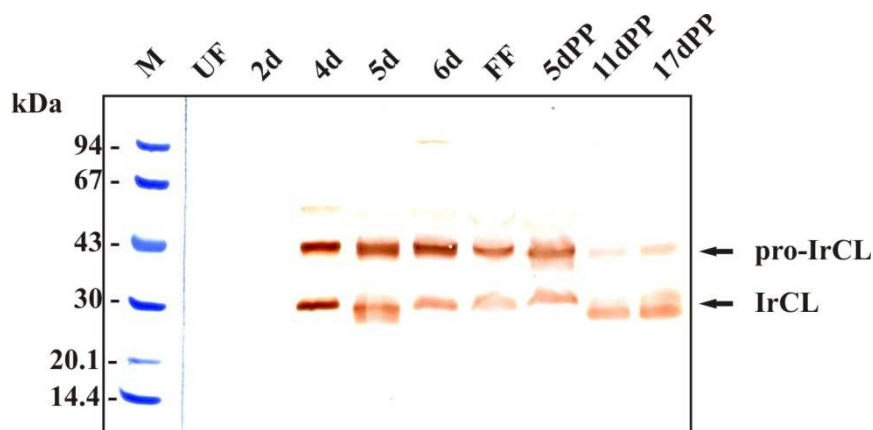


Obr. 8. Profil aktivit IrCL ve střevních extraktech samic *I. ricinus* v průběhu sání a metamorfózy u tří skupin samic z různých ročních období. S – sání, P – plně nasáté samice po odpadnutí z hostitele, T – období trávení mimo hostitele a před ovipozicí.

3.1.4. Detekce IrCL metodou Western blot

Detekcí IrCL pomocí specifických protilátek proti rekombinantnímu IrCL metodou Western blot (Obr. 9) byly rozeznány dvě velikosti proteinů. Protein o velikosti ~38 kDa je neaktivní proenzym IrCL. Detekovaný protein o velikosti přibližně 28-32 kDa odpovídá aktivní formě IrCL (Franta et al., 2011). Přítomnost aktivního proteinu je pozorovatelná od 4. dne sání až do vykladení vajíček. Ačkoli se zdá být aktivní IrCL detekován u plně nasátých samic i samic 5. den po puštění z hostitele, jeho aktivita nebyla v těchto časech prokázána.

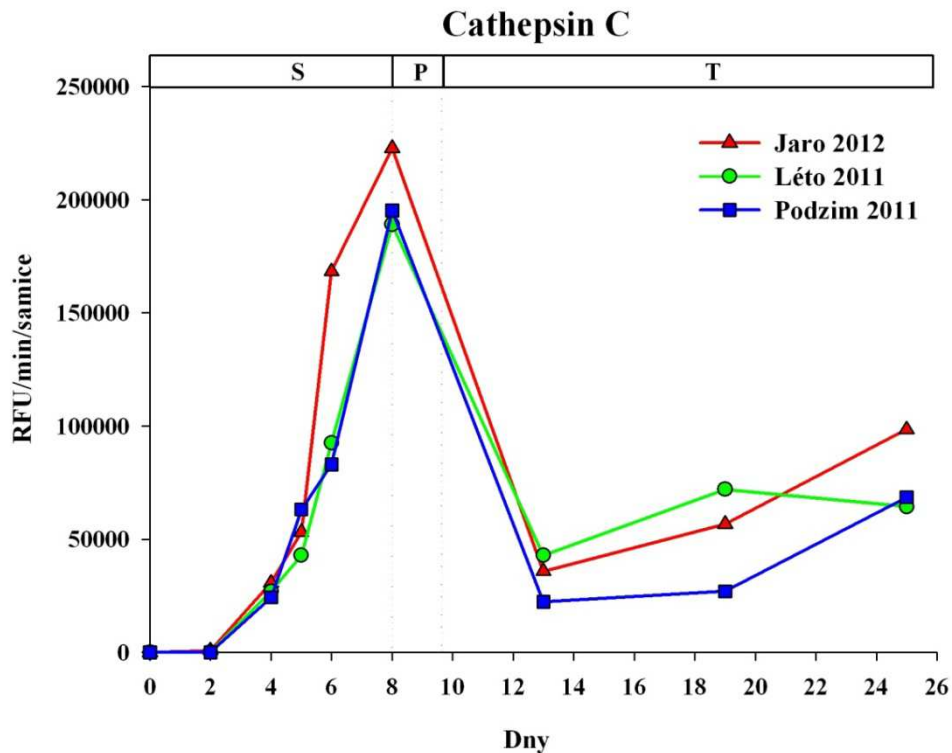
Neaktivní forma IrCL je pozorována také až od 4. dne sání, v průběhu trávení mimo hostitele ale tohoto proteinu ubývá.



Obr. 9. Western Blot IrCL v průběhu sání a trávení samic podzimní sady 2011. Ředění vzorků odpovídá 0,13střeva/jamka. M – LMW marker, UF – nenasáté samice, 2d, 4d, 5d, 6d, - dny sání, FF – plně nasáté samice, 5dPP, 11dPP, 17dPP – počet dní po puštění z hostitele, pro-IrCL – proenzym IrCL.

3.1.5. Dynamický profil aktivity Cathepsinu C

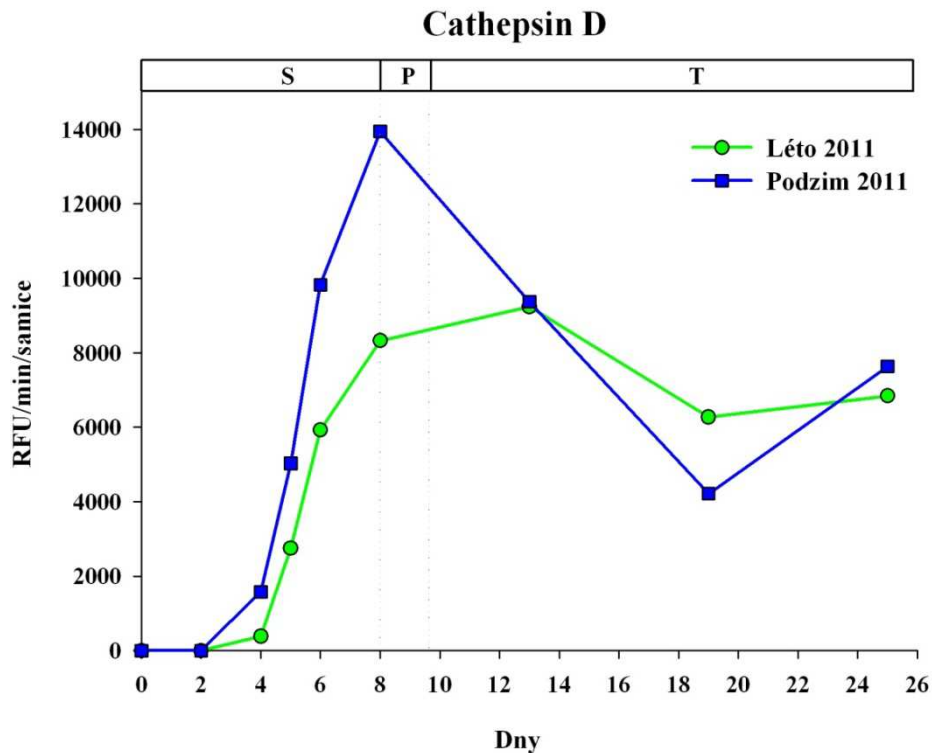
Relativní aktivita IrCC je nulová až do 2. dne sání (Obr. 10) Následuje její exponenciální růst až do stádia plně nasátých samic. V 5. dni po puštění z hostitele dochází k prudkému poklesu relativních aktivit IrCC o téměř tři čtvrtiny oproti plně nasátým samicím. V dalších dnech trávení před ovipozicí dochází k mírnému nárůstu IrCC do polovičních hodnot oproti naměřenému maximu.



Obr. 10. Profil aktivit IrCC ve střevních extraktech samic *I. ricinus* v průběhu sání a metamorfózy u tří skupin samic z různých ročních období. S – sání, P – plně nasáté samice po odpadnutí z hostitele, T – období trávení mimo hostitele a před ovipozicí.

3.1.6. Dynamický profil aktivity Cathepsinu D

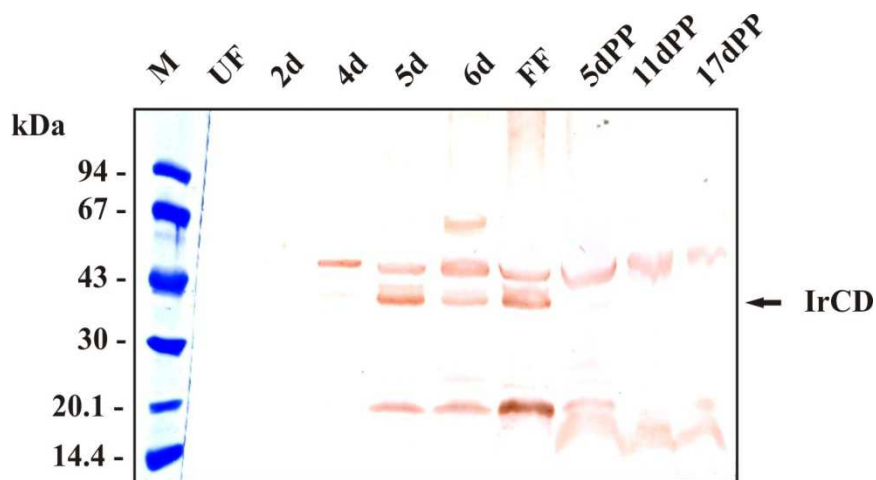
Dynamika aktivity IrCD byla měřena pouze na dvou sadách samic (léto 2011, podzim 2011), neboť bylo k dispozici malé množství specifického fluorescenčního substrátu. Ke zvyšování relativní aktivity IrCD dochází u obou pozorovaných skupin od 2. dne sání do plně nasátých samic (Obr. 11). Podzimní sada dosahuje téměř dvojnásobného maxima oproti letní sadě. V průběhu trávení mimo hostitele dochází k mírnému poklesu aktivit IrCD, které setrvávají až do období ovipozice na polovičních hodnotách z naměřeného maxima u plně nasátých samic.



Obr. 11. Profil aktivit IrCD ve střečních extraktech samic *I. ricinus* v průběhu sání a metamorfózy u tří skupin samic z různých ročních období. S – sání, P – plně nasáté samice po odpadnutí z hostitele, T – období trávení mimo hostitele a před ovipozicí.

3.1.7. Detekce IrCD metodou Western blot

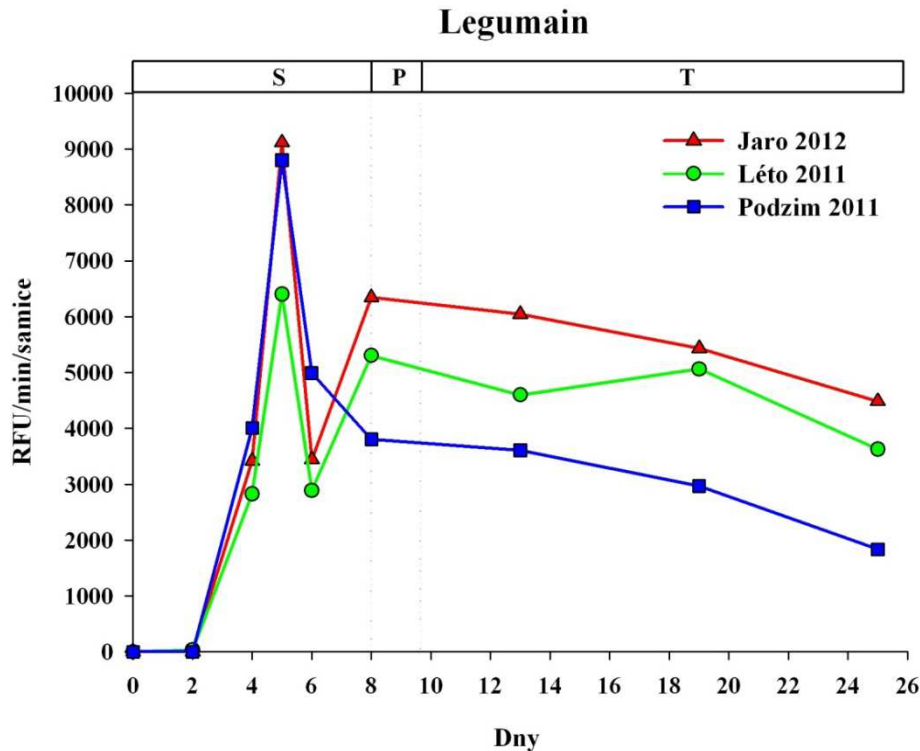
Protilátky proti IrCD rozeznaly několik proteinů (Obr. 12). Metodou RNAi bylo potvrzeno, že band specifický pro aktivní IrCD odpovídá velikosti 40 kDa (Sojka et al., 2012). IrCD byl detekován pomocí imunoblotingu pouze u samic z 5. dne sání až do plně nasátých samic.



Obr. 12. Western Blot cathepsinu D v průběhu sání a trávení samic podzimmí sady 2011. Ředění vzorků odpovídá 0,13 střeva/jamka. M – LMW marker, UF – nenasáté samice, 2d, 4d, 5d, 6d, - dny sání, FF – plně nasáté samice, 5dPP, 11dPP, 17dPP – počet dní po puštění z hostitele. Šipka ukazuje na velikost bandu aktivního IrCD.

3.1.8. Dynamický profil aktivity legumainu

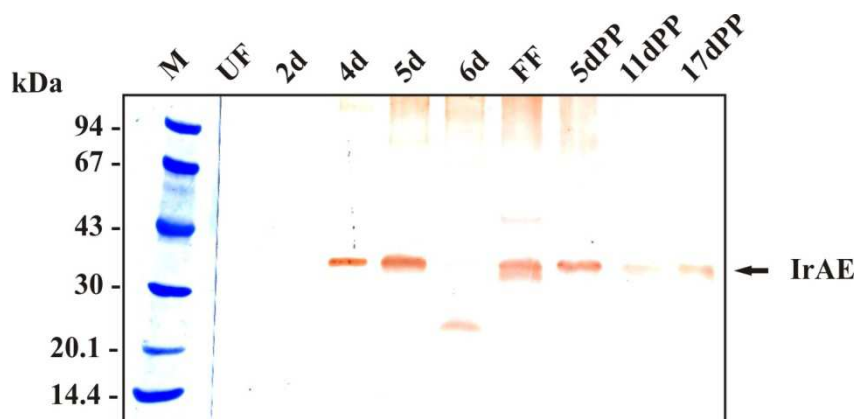
Asparaginyl-endopeptidázová aktivita (Obr. 13) vzrůstá od 2. dne sání do 5. dne sání u všech sledovaných skupin. V období mezi 5. dnem sání a plně nasátými samicemi dochází k prudkému poklesu aktivity, která v počátku trávení mimo hostitele opět narůstá a až do období ovipozice udržuje IrAE svou aktivitu na podobné hladině odpovídající přibližně jedné třetině maximální naměřené aktivity.



Obr. 13. Profil aktivit IrAE ve střevních extraktech samic *I. ricinus* v průběhu sání a metamorfózy u tří skupin samic z různých ročních období. S – sání, P – plně nasáté samice po odpadnutí z hostitele, T – období trávení mimo hostitele a před ovipozicí.

3.1.9. Detekce IrAE metodou Western blot

Protilátky proti IrAE detekovaly jeden protein v oblasti ~38-40 kDa odpovídající aktivní formě IrAE. Druhý protein o velikosti ~25 kDa, který se objevil pouze u 6. dne sání, nedokážeme vysvětlit (Obr. 14). Proteinová hladina IrAE je detekovatelná u samic ve 2. a 4. dni sání a dále pak u plně nasátých samic. Slabá detekce aktivní formy IrAE byla zaznamenána i v období trávení mimo hostitele a to hlavně u 5. dne po puštění.



Obr. 14. Western Blot legumainu v průběhu sání a trávení samic podzimní sady 2011. Ředění vzorků odpovídá 0,13 střeva/jamka. M – LMW marker, UF – nenasáté samice, 2d, 4d, 5d, 6d, - dny sání, FF – plně nasáté samice, 5dPP, 11dPP, 17dPP – počet dní po puštění z hostitele. Šipka ukazuje na velikost aktivní formy IrAE.

3.2. Dynamika aktivit a detekce proteinových hladin trávicích proteáz u nymfálního stádia klíštěte *I. ricinus*

Byla stanovena hodnota aktivit trávicích enzymů (cathepsin B,L,C a asparaginylová endopeptidáza - legumain) v průběhu sání a metamorfózy nymfálního stádia klíštěte *I. ricinus*. Měření probíhalo u tří různých skupin různého původu (jarní sada 2010, laboratorní sada 2010, letní sada 2011). Měření probíhalo v celotělových homogenátech a profily jednotlivých proteáz byly stanoveny pomocí specifických fluorescenčních substrátů, popř. za přítomnosti inhibitorů (IrCL, IrAE, IrCD). V případě IrCB a IrCL byly proteinové hladiny potvrzeny imunodetekcí metodou Western blot.

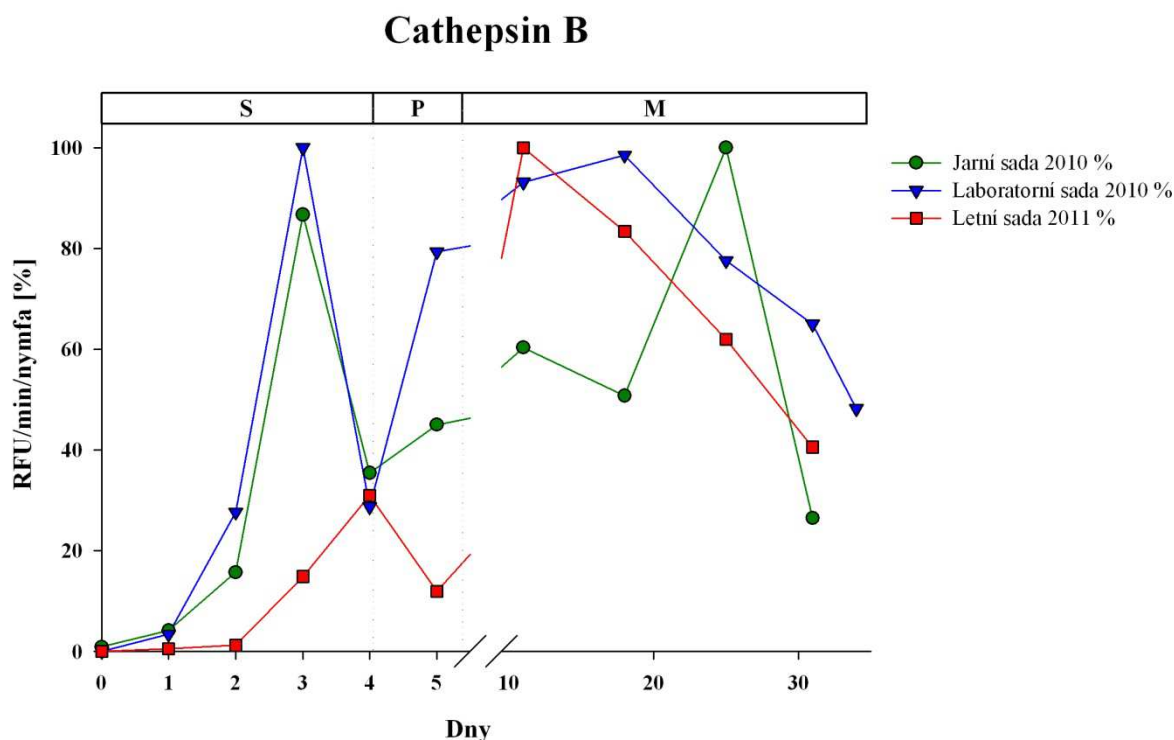
3.2.1. Dynamický profil aktivity Cathepsinu B

Relativní aktivity IrCB v jednotlivých vzorcích z celotělových homogenátů nymf byly stanoveny měřením hydrolytické aktivity IrCB za přítomnosti specifického fluorescenčního substrátu Z-Arg-Arg-AMC (5 μ M) (Tab. 8). Absolutní číselné hodnoty mezi sledovanými skupinami nymf byly značně nehomogenní. Pro zřetelnější grafické vyjádření dynamického trendu byly aktivity IrCB vyjádřeny relativně v procentech vztahených k nejvyšší číselné hodnotě (100 %) naměřené u jednotlivých sad nymf (Obr. 15).

Tab. 8. Číselné hodnoty aktivit IrCB v relativních fluorescenčních jednotkách za 1 minutu vztažené na 1 nymfu (RFU/min/nymfa).

Dny	Sání					P	Trávení a metamorfóza			
	0	1	2	3	4	5	12	19	25	32
Jarní sada 2010	27	122	464	2559	1045	nd	1781	1499	2952	781
Lab. sada 2010	1	41	332	1199	345	951	1117	1181	930	827
Letní sada 2011	0	nd	31	374	779	300	2510	2093	nd	1081

P – nymfy po odpadnutí z hostitele, nd – vzorky, které nebyly stanoveny.



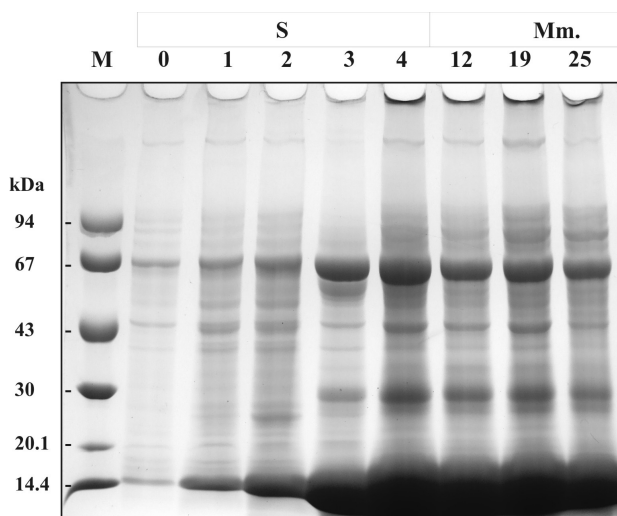
Obr. 15. Profil aktivit IrCB v celotělových homogenátech nymf *I. ricinus* v průběhu sání a metamorfózy. S – sání, P – nymfy po odpadnutí z hostitele, M – trávení a metamorfóza. Relativní aktivity IrCB jsou pro přehledné porovnání udány v procentech, tj. nejvyšší hodnota aktivity u jednotlivých sad je rovna 100%.

Nenasáté nymfy všech skupin vykazují téměř nulové hodnoty aktivity IrCB (Obr. 15). Mezi 1. a 3. dnem dochází k exponenciálnímu nárůstu aktivit IrCB. Třetí den dosahují aktivity maximálních zaznamenaných hodnot. U letní sady vzrůstá proteolytická aktivita v průběhu sání podstatně méně než u jarní a laboratorní sady. U plně nasátých nymf, které se v rozmezí 4. a 5. dne pouští hostitele, dochází k velkému úbytku aktivit IrCB. Během následujících 3 týdnů, tj. v období trávení a metamorfózy, dochází k opětovnému nárůstu

aktivit dosahujících podobných hodnot jako ve 3. dni sání. Posledních 5 dní před metamorfózou dochází k útlumu aktivity IrCB až o 80%.

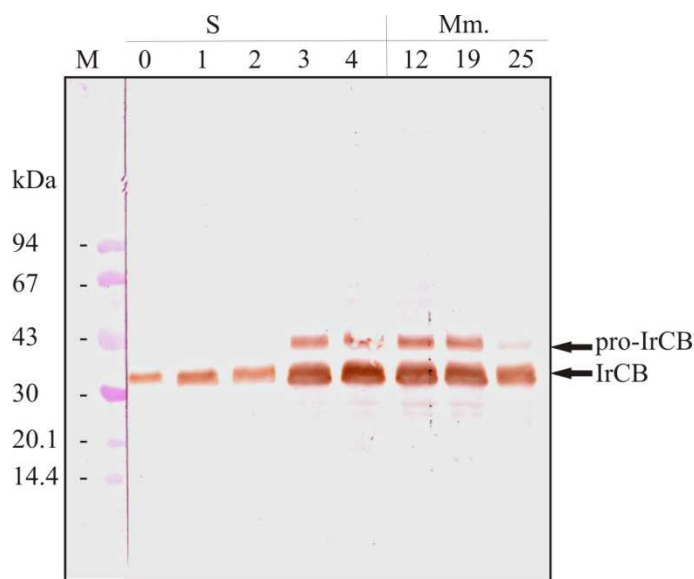
3.2.2. Detekce IrCB metodou Western blot

Pro správné ředění celotělových extraktů byly jednotlivé vzorky z jarní sady nymf ověřeny pomocí SDS-PAGE (Obr. 16). Toto ředění (0,1 nymfy/jamka) bylo následně použito pro imunodetekci IrCB (Obr. 17) a IrCL pomocí Western blotu, u kterého byly použity stejné homogenáty jako u SDS-PAGE.



Obr. 16. SDS-PAGE kontrola ředění celotělových homogenátů nymf *I. ricinus* z jarní sady 2010. M – LMW marker, S – sání (0-4 dny), Mm. – doba trávení mimo hostitele a metamorfóza (12, 19, 25 – dny). Ředění extraktů odpovídá 0,1 nymf/jamka.

Pomocí specifických protilátek proti cathepsinu B byla detekována proteinová hladina IrCB v celotělových homogenátech jarní sady nymf 2010 (Obr. 17). Protilátky proti rekombinantnímu IrCB detekovaly protein o velikosti přibližně 38 kDa, který odpovídá neaktivní pro-formě IrCB. Dvojité band o velikostech 31 a 33 kDa odpovídá 2 izoformám aktivního cathepsinu B (IrCB 1,2). Výsledek Western blotu koreluje s hodnotami naměřené fluorescence. Jedinou výjimkou je nulová aktivita IrCB naměřená u nenasátých nymf, u kterých byl pomocí Western blotu detekován protein o velikosti ~33 kDa odpovídající aktivní formě IrCB (Sojka et al., 2008).



Obr. 17. Western Blot cathepsinu B v průběhu sání a metamorfózy nymf. Ředění vzorků odpovídá 0,1 nymf/jamka. M – LMW marker, S (0-4) – sání (dny), Mm. (12,19,25) – doba trávení mimo hostitele a metamorfóza (dny), pro-IrCB – neaktivní pro-forma IrCB.

3.2.3. Dynamický profil aktivity Cathepsinu L

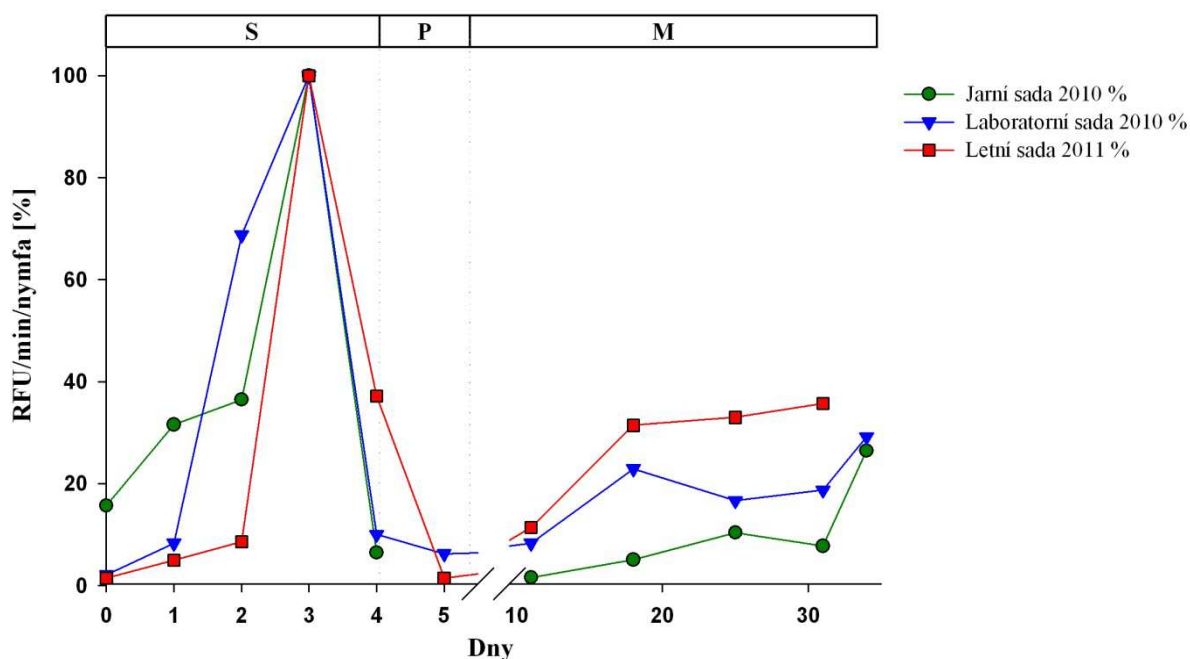
Proteázová aktivita cathepsinu L byla stanovena v přítomnosti fluorescenčního substrátu Z-Phe-Arg-AMC (5 μ M) a inhibitoru CA-074 (2,5 μ M) potlačujícího aktivitu IrCB. Číselné hodnoty (Tab. 9) byly stejně jako u IrCB přepočteny na procentuální (Obr. 18).

Tab. 9. Číselné hodnoty aktivit IrCL v relativních fluorescenčních jednotkách za 1 minutu vztažené na 1 nymfu (RFU/min/nymfa).

Dny	Sání					P	Trávení a metamorfóza			
	0	1	2	3	4		12	19	25	32
Jarní sada 2010	167	337	389	1067	69	nd	17	54	111	83
Lab. sada 2010	1	44	335	487	13	3	41	110	88	93
Letní sada 2011	1	nd	6	70	36	1	8	22	nd	25

P – nymfy po odpadnutí z hostitele, nd – vzorky, které nebyly stanoveny.

Cathepsin L



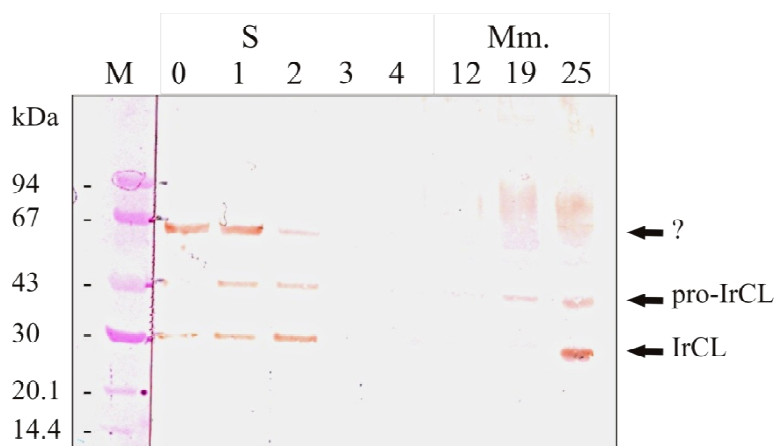
Obr. 18. Profil aktivit IrCL v celotělových homogenátech nymf *I. ricinus* v průběhu sání a metamorfózy. S – sání, P – nymfy po odpadnutí z hostitele., M – doba trávení mimo hostitele a metamorfóza. Relativní aktivity IrCL jsou pro přehledné porovnání udány v procentech, tj. nejvyšší hodnota aktivity u jednotlivých sad je rovna 100%.

Nulové hodnoty fluorescence IrCL naměřené u nenasátých nymf se výrazně zvyšují v průběhu 1.-3. dne sání. Na rozdíl od IrCB, aktivita IrCL u plně nasátých nymf klesá na úroveň nenasátých nymf. Během trávení mimo hostitele se hodnoty naměřených aktivit mírně zvyšují. V posledním stádiu před metamorfózou v dospělce odpovídají hodnoty relativní aktivity IrCL 30-40% maximálních hodnot. Změna trendu aktivity IrCL v čase u letní sady je shodná s jarní a laboratorní sadou, číselné hodnoty (Tab. 9) jsou ale řádově 10-krát nižší než u zbývajících dvou sad.

3.2.4. Detekce IrCL metodou Western blot

Proteinová hladina IrCL byla detekována pomocí specifických protilátek proti rekombinantnímu IrCL (Obr. 19) metodou Western blot. Protilátky rozeznaly 3 různé proteiny. Protein o velikosti zhruba ~60 kDa zatím neumíme identifikovat. Může jít o krosreaktivitu s tzv. „dlouhým cathepsinem“ z *I. ricinus*, jehož molekulová hmotnost zhruba odpovídá pozorované velikosti. (Franta, osobní sdělení). Protein o velikosti ~38 kDa je

neaktivní proenzym IrCL. Protein o velikosti přibližně 28-32 kDa odpovídá aktivní formě IrCL (Franta et al., 2011).



Obr. 19. Western blot cathepsinu L v průběhu sání a metamorfózy nymf. Ředění vzorků odpovídá 0,1 nymf/jamka. M – LMW marker, S (0-4) – sání (dny), Mm. (12,19,25) – dobra trávení mimo hostitele a metamorfóza (dny). Proužek označený otazníkem – neznámý protein, pro-IrCL – neaktivní proenzym IrCL.

3.2.5. Dynamický profil aktivity Cathepsinu C

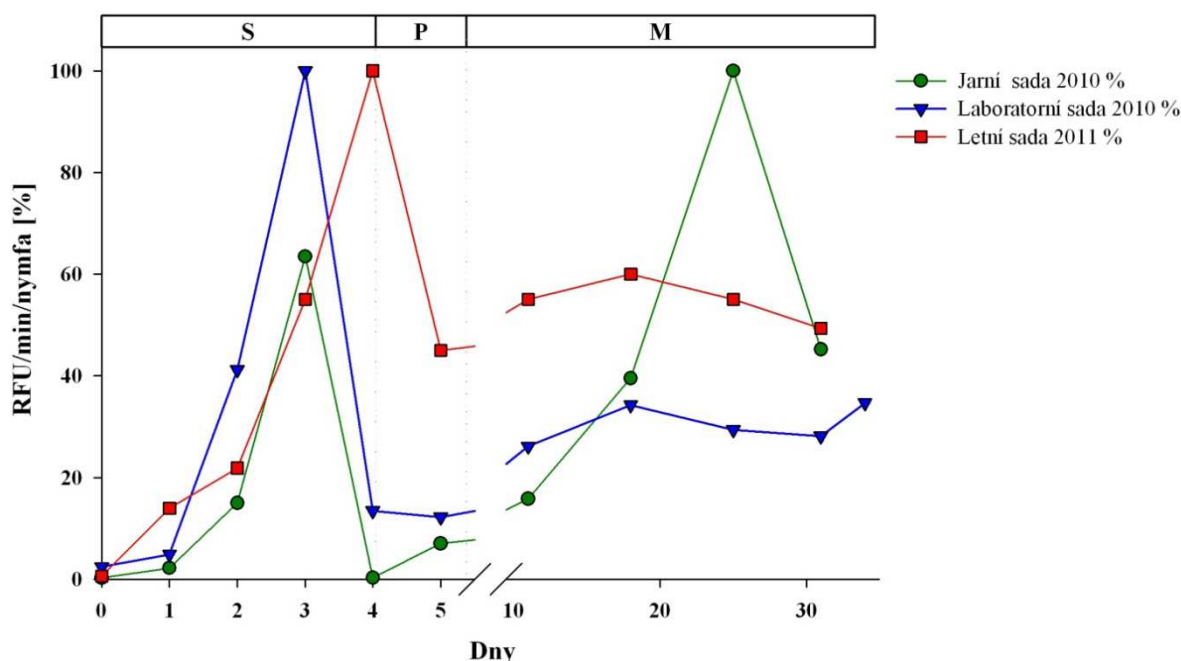
Exoproteázová aktivita cathepsinu C (Tab. 10) byla měřena v přítomnosti specifického fluorescenčního substrátu Gly-Arg-AMC (40 μ M). Absolutní číselné hodnoty byly jako v případě IrCB a IrCL relativně vztaženy na nejvyšší hodnoty v jednotlivých sadách v procentech (Obr. 20).

Tab. 10. Číselné hodnoty aktivit IrCC v relativních fluorescenčních jednotkách za 1 minutu vztažené na 1 nymfu (RFU/min/nymfa).

Dny	Sání					P	Trávení a metamorfóza			
	0	1	2	3	4		5	12	19	25
Jarní sada 2010	1	8	55	233	1	nd	58	145	367	166
Lab. sada 2010	6	12	101	245	33	30	64	84	72	69
Letní sada 2011	1	nd	35	88	160	72	88	96	nd	79

P – nymfy po odpadnutí z hostitele, nd – vzorky, které nebyly stanoveny.

Cathepsin C



Obr. 20. Profil aktivit IrCC v celotělových homogenátech nymf *I. ricinus* v průběhu sání a metamorfózy. S – sání, P – nymfy po odpadnutí z hostitele, M – doba trávení mimo hostitele a metamorfóza. Relativní aktivity IrCC jsou pro přehledné porovnání udány v procentech, tj. nejvyšší hodnota aktivity u jednotlivých sad je rovna 100%.

Měřené hodnoty aktivit IrCC v homogenátech nymf byly velice nízké (na hranici limitu detekce) a pro jejich získání bylo nutné použít minimální ředění výchozích vzorků. Přesto bylo možné pozorovat významné zvýšení v průběhu 1.-3. dne sání kdy dosahují svého maxima. U plně nasátých nymf je viditelný pokles, jarní a laboratorní sada klesá o > 90%, letní sada o 50%. V průběhu trávení mimo hostitele a následné metamorfózy dochází k udržování hladiny enzymatické aktivity na 50% z maximálních hodnot, u jarní sady nymf vzrůstá aktivita v 2. týdnu po odpadnutí z hostitele na maximální hodnoty, následně klesá až o 60%.

Pro IrCC nebyl proveden Western blot, neboť doposud nebyly připraveny kvalitní primární protilátky proti rekombinantnímu proteinu IrCC.

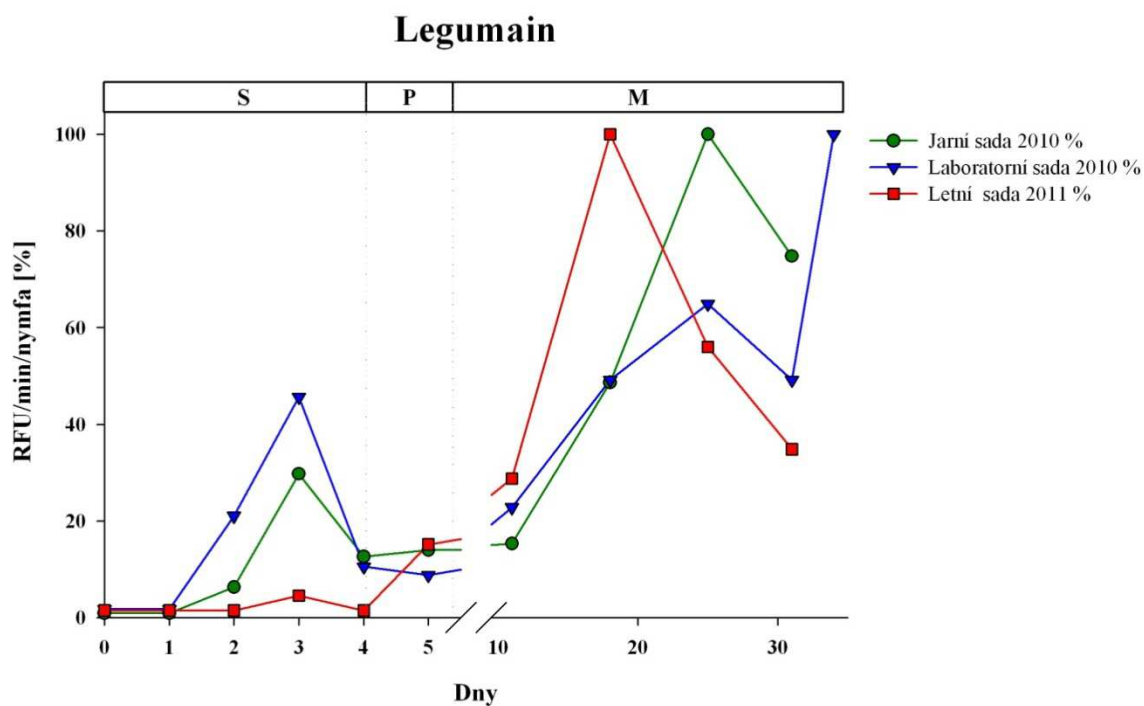
3.2.6. Profil relativní aktivity asparaginylové endopeptidázy - legumain

Asparaginyl-endopeptidázová aktivita (Tab. 11) byla obtížně měřitelná, na hranici detekčního limitu fluorimetru (v přítomnosti specifického fluorescenčního substrátu Z-Ala-Ala-Asn-AMC (10 μ M) a inhibitoru CA-074 (2,5 μ M). Přestože mohla být data zatížena chybou, byl u všech třech sledovaných sad pozorovatelný velmi podobný trend (Obr. 21).

Tab. 11. Číselné hodnoty fluorescence IrAE naměřené fluorimetrem TECAN vztažené na relativní fluorescenční jednotky za 1 minutu pro 1 nymfu

Dny	Sání					P	Trávení a metamorfóza			
	0	1	2	3	4	5	12	19	25	32
Jarní sada 2010	1	1	7	33	14	nd	17	54	111	83
Lab. sada 2010	1	1	12	26	6	5	13	28	37	57
Letní sada 2011	1	nd	1	3	1	10	19	66	nd	23

P – nymfy po odpadnutí z hostitele, nd – vzorky, které nebyly stanoveny.



Obr. 21. Profil aktivit legumainu (IrAE) v celotělových homogenátech nymf *I. ricinus* v průběhu sání a metamorfózy. S – sání, P – nymfy po odpadnutí z hostitele, M – doba trávení mimo hostitele a metamorfóza. Relativní aktivity IrAE jsou pro přehledné porovnání udány v procentech, tj. nejvyšší hodnota aktivity u jednotlivých sad je rovna 100%.

Procentuální vyhodnocení (Obr. 21) ukazuje na odlišný trend oproti třem předchozím cathepsinům. Nenasáté nymfy nemají žádnou proteolytickou aktivitu IrAE, ta roste mezi 1. a 3. dnem sání, nedosahuje však svého maxima. U plně nasátých jedinců je znatelný pokles a výrazného růstu dosahují aktivity až v průběhu trávení mimo hostitele. Odlišné počty dní v průběhu trávení, kdy IrAE dosahuje maxima, se u tří zkoumaných sad liší o čtyři dny, což je pravděpodobně způsobeno již zmíněnou chybou v detekovatelnosti či časovým posunem při odběhu nymf z hostitele.

4. Diskuze

Dosavadní studium mechanismu trávení hemoglobinu z hostitelské krve u klíštěte *Ixodes ricinus* a studium enzymů, které se tohoto procesu účastní, bylo v naší laboratoři zaměřeno na dobře definovanou fázi sání samic - tedy 6. den. V této fázi, těsně před začátkem tzv. „rapid engorgement“ fáze, jsou ze samic nejnázne získatelné střevní tkáň s množstvím dobře vyvinutých trávicích buněk. S tímto materiálem byla získána většina dat publikovaných o trávicí kaskádě i jednotlivých enzymech (Sojka et al., 2007; Sojka et al., 2008; Horn et al., 2009). V těchto pracích však nebyla objasněna dynamika aktivit jednotlivých trávicích enzymů v průběhu sání.

V naší laboratoři jsme nedávno popsali dynamiku celkové hemoglobinolýzy i jednotlivých trávicích enzymů (IrCB, L, C, D a IrAE) v průběhu sání samic až do doby odpadnutí z hostitele. V této práci byl prokázán exponenciální nárůst aktivit jednotlivých proteáz v průběhu sání, který korespondoval s nárůstem exprese genů kódujících jednotlivé proteázy (Franta et al., 2010). Ve své práci jsem potvrdila dynamické profily jednotlivých proteáz v průběhu sání samic *I. ricinus* a dále jsem popsala dynamický průběh všech sledovaných enzymů u samic v období trávení mimo hostitele před následnou ovipozicí. Studie byla dále rozšířena o sledování dynamických profilů aktivit (IrCB, L, C a IrAE) u nymfálního stádia klíštěte a to jak během sání na hostiteli, tak v období trávení již mimo hostitele až do doby metamorfózy v dospělce.

Nenasáté samice a samice v průběhu prvních dvou dnů sání nevykazovaly téměř žádnou enzymatickou aktivitu. Ve fázi pomalého sání došlo u všech enzymů k exponenciálnímu růstu aktivit, který pokračoval až do fáze plně nasátých samic. V průběhu trávení po odpadu z hostitele byl u proteáz pozorován pozvolný pokles aktivit, u některých až na minimum dosahující úroveň nenasátých samic. Poněkud odlišný trend byl pozorován u IrCL, jehož aktivity dosahovaly maximálních hodnot již v 5.-6. dni sání a v průběhu poslední fáze sání tzv. „rapid engorgement“ byl zaznamenán výrazný pokles aktivity IrCL. V průběhu trávení mimo hostitele nabývala postoupně aktivita IrCL vysokých hodnot, které více než dvojnásobně převyšovaly maxima aktivit v průběhu sání. Domníváme se, a předběžné výsledky tuto hypotézu potvrzují, že za nárůstem aktivity IrCL v průběhu trávení mimo hostitele je druhá izoforma cathepsinu L, konkrétně IrCL3. Tento předpoklad však bude nutné ověřit metodou RNA interference.

Nymfy vykazovaly podobný trend aktivit jednotlivých enzymů jako dospělé samice pouze v průběhu sání na hostiteli. Naměřené absolutní hodnoty proteázových aktivit

u nymfálního stádia *I. ricinus* jsou však řádově nižší než je tomu u samic. Dynamika trávicích proteáz po odpadnutí z hostitele se u nymfálního stádia liší oproti trendu aktivit pozorovaným u samic. IrCB vykazuje ve fázi trávení mimo hostitele druhého maxima, stejně jako v průběhu sání. Aktivita IrCL naopak klesá ještě před puštěním z hostitele a v průběhu trávení mimo hostitele je stále zanedbatelná. IrCC, jehož aktivita byla u samic výrazná, není u nymfálního stádia téměř měřitelná a jeho zastoupení zde není průkazné. Tyto výsledky bude nutné potvrdit stanovením molárních koncentrací jednotlivých enzymů v homogenátech nymf metodou titrace aktivního místa, podobně jako to bylo provedeno ve střevních extraktech dospělých samic (Franta et al., 2010).

Imunolokalizace pomocí Western blotu potvrzují měření aktivit jednotlivých proteáz, kromě IrCL, kde se aktivovaná forma IrCL zdála přítomna i v extraktech s nulovou nebo velmi nízkou aktivitou tohoto enzymu (Obr. 9). Nicméně velikost proteinu odpovídajícího IrCL v těchto neaktivních extraktech se zdála být větší než ve vzorcích s prokazatelnou aktivitou. Je možné, že protilátky detekovaly jen částečně zprocesovaný neaktivní zymogen, podobně jako bylo ukázáno např. u cathepsinu B ze *Schistosoma mansoni* (Sajid et al., 2003).

Výsledky této práce zároveň navozují řadu zajímavých biologických otázek, na které bychom se chtěli v budoucnu zaměřit. (i) Jaký je průběh aktivit jednotlivých proteáz samic i samců měřený bezprostředně po metamorfóze nymf v dospělce? Z fyziologického hlediska je totiž zajímavé, že v okamžiku přeměny nymf na dospělce jsou aktivity trávicích proteáz na určité hladině, zatímco u nenasátých, dlouho hladovějících dospělců jsou již nulové. (ii) Dalším důležitým a dosud neprozkoumaným problémem je, zda u klíšťat existují dvě různé dráhy pro trávení hemoglobinu (který je potenciálně nebezpečný kvůli toxickému hemu) a ostatních sérových proteinů (albumin). Tuto možnost naznačuje ve své práci Lara et al. (2005), který ukázal, že hemoglobin i albumin je tráven v odlišných vezikulách trávicí buňky klíštěte *R. microplus*. Tuto otázku se pokusíme vyřešit pomocí in-vitro krmení klíšťat na umělých membránách, kde bude srovnán trávicí aparát klíšťat nasátých na úplné krvi s klíšťaty nasátých jen na séru bez hemoglobinu. Předběžné výsledky totiž ukazují, že klíšťata jsou schopna plného nasátí a vykladení vajíček i při sání na samotném krevním séru. Tento experimentální přístup by nám měl rovněž pomoci objasnit, zda na povrchu trávicích buněk existuje specifický receptor pro hemoglobin, jak se domnívají Lara et al. (2005). (iii) Naše práce dále ukázala, že všechny trávicí enzymy jsou výrazně up-regulovány v průběhu sání. Další výzkum by se měl tedy zaměřit i na výzkum regulace exprese trávicích

proteáz. Vzhledem k tomu, že plného dosátí jsou schopny jen oplozené samice, domníváme se, že zde hraje úlohu hormonální regulace, která pravděpodobně výrazně ovlivňuje růst a pokles aktivity enzymů v průběhu sání a trávení. To by bylo možné ověřit porovnáním trávicích aparátů oplozených a neoplozených samic. (iv) Z dosud publikovaných prací se zdá, že některé enzymy trávicího systému (např. IrCL a IrCD) jsou schopny autoaktivace (Franta et al. 2011; Sojka et al., 2012), zatímco jiné (např. IrCB) mohou být aktivovány jiným enzymem této kaskády (IrAE) (Sojka et al., 2007). Tyto vzájemné vztahy bude možné odhalit postupným vypínáním jednotlivých genů metodou RNA interference a sledováním změn aktivit ostatních proteáz.

Hlavním cílem tohoto výzkumu je odhalení nejzranitelnější složky celého trávicího systému, která by byla slibným antigenem pro vývoj účinné a specifické „proti-klíštěcí“ vakcíny, umožňující kontrolu klíštěcích populací a omezení nebezpečných nálezů přenášených klíšťaty (Willadsen, 2006).

5. Závěr

Byl stanoven dynamický profil proteázových aktivit (IrCB, L, C, D a IrAE) v průběhu sání na hostiteli a v průběhu trávení po odpadnutí z hostitele a to ve střevních homogenátech samic *I. ricinus* a dále v celotělových homogenátech nymf. Aktivity proteáz jsou zanedbatelné v počátku sání a následně exponenciálně rostou až do úplného nasátí klíšťat. Po odpadnutí z hostitele většina proteázových aktivit klesá, nebo se drží na minimálních hladinách. Tato data byla doplněna imunolokalizací jednotlivých proteinů metodou Western blot, která trendy aktivit proteáz vesměs potvrzuje.

6. Seznam literatury

- Alim MA, Tsuji N, Miyoshi T, Islam MK, Hatta T, Yamaji K, Fujisaki K. Developmental stage- and organ- specific expression profiles of asparaginyl endopeptidases/legumains in the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. J Vet Med Sci. 2008, 70: 1363-1366.
- Balashov, I.U.S., Raikhel, A.S., Hoogstraal, H. An Atlas of ixodid tick ultrastructure, Special publication / Entomological Society of America, College Park, 1983, Md., pp. ix, 289 p., 281 folded p. of plates.
- Beatty Barry J., Marquardt William C. The Biology of Disease Vectors. University Press of Colorado, 1996, 1: 170.
- Boldbaatar, D., Sikalizyo Sikasunge, C., Battsetseg, B., Xuan, X., Fujisaki, K. Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. Insect Biochem Mol Biol, 2006, 36: 25-36.
- Bonnet S, Jouglin M, L'Hostis M, Chauvin A. Babesia sp. EU1 from roe deer and transmission within *Ixodes ricinus*, Emerg Infect Dis., 2007, 13: 1208-1210
- Bowman, A. S. and Sauer, J. R. Tick salivary glands: function, physiology and future. Parasitology. 2004, 129: 67-81.
- Caffrey, C.R., McKerrow, J.H., Salter, J.P., Sajid, M.. Blood 'n' guts: an update on schistosome digestive peptidases. Trends Parasitol. 2004, 20: 241-248.
- Coons LB, Rosell-Davis R, Tarnowski BI: Blood meal digestion in ticks. In Morphology, Physiology, and Behavioural Biology of Ticks. Edited by Sauer JR, Hair JA. New York: Ellis Horwood Ltd., John Wiley & Sons; 1986: 248-279.
- Cruz CE, Fogaça AC, Nakayasu ES, Angeli CB, Belmonte R, Almeida IC, Miranda A, Miranda MT, Tanaka AS, Braz GR, Craik CS, Schneider E, Caffrey CR, Daffre S. Characterization of proteinases from the midgut of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* involved in the generation of antimicrobial peptides. Parasit Vectors. 2010, 3: 63.
- de la Fuente, J., et al. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. Front Biosci. 2008, 13: 6938-6946.
- Fogaça AC, da Silva PI Jr, Miranda MT, Bianchi AG, Miranda A, Ribolla PE, Daffre S. Antimicrobial activity of a bovine hemoglobin fragment in the tick *Boophilus microplus*. J Biol Chem. 1999; 274: 25330-25334.
- Franta Z, Frantova H, Konvickova J, Horn M, Sojka D, Mares M, Kopacek P. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. Parasit Vectors. 2010, 3: 119.

- Franta Z, Sojka D, Frantova H, Dvorak J, Horn M, Srba J, Talacko P, Mares M, Schneider E, Craik CS, McKerrow JH, Caffrey CR, Kopacek P. IrCL1 - the haemoglobinolytic cathepsin L of the hard tick, *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol*. 2011, 41: 1253-1262.
- Franta Z. Blood meal digestion in the hard tick *Ixodes ricinus*. PhD. thesis, České Budějovice, Jihočeská univerzita, 2012: 20.
- Goddard, J. *Infectious Diseases and Arthropods*. 2. s.l. Humana Press, 2008: 81-82.
- Gooding RH. Digestive processes of haematophagous insects--II. Trypsin from the sheep ked *Melophagus ovinus* (L.) (hippoboscidae, diptera) and its inhibition by mammalian sera. *Comp Biochem Physiol B*. 1972, 43: 815-824.
- Guglielmone, A.A., Robbins, R.G., Apanaskevich, D.A., Petney, T.N., Estrada-Pena, A., Horak, I.G., Shao, R.F., Barker, S.C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*. 2010, 1-28.
- Horn M, Nussbaumerová M, Šanda M, Kovářová Z, Srba J, Franta Z, Sojka D, Bogyo M, Caffrey CR, Kopáček P, Mareš M. Hemoglobin digestion in Blood-Feeding Ticks: Mapping a Multi-Peptidase Pathway by Functional Proteomics. *Chem Biol*. 2009, 16: 1053-1063.
- Hovius JW, van Dam AP, Fikrig E. Tick-host-pathogen interactions in Lyme borreliosis. *Trends Parasitol*. 2007, 23: 434-438.
- Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology*. 2004, 129: 3-14.
- Kopáček P, Hajdusek O, Buresová V, Daffre S. Tick innate immunity. *Adv Exp Med Biol*. 2010, 708: 137-162.
- Lara FA, Lins U, Bechara GH, Oliveira PL. Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J Exp Biol*. 2005, 208: 3093-3101.
- Lara FA, Lins U, Paiva-Silva G, Almeida IC, Braga CM, Miguens FC, Oliveira PL, Dansa-Petretski M. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. *J Exp Biol*. 2003, 206: 1707-1715.
- Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci*. 2009, 14: 2857-2877.
- Nuttall PA. Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zentralbl Bakteriol*. 1999, 289: 492-505.

- Radolf Justin D., Caimano Melissa J., Stevenson Brian, and Linden T. Hu. Of ticks, mice and men: understanding the dual-host lifestyle of Lyme disease spirochaetes. *Nat Rev Microbiol.* 2012, 10: 87-99.
- Roberts, L. S.; Janovy, J. Gerald D. Schmodt & Lary S Roberts'n Foundations of Parasitology. WCB, 1996, 5, Dubuque (USA). 603-611.
- Sajid, M., McKerrow, J.H., Hansell, E., Mathieu, M.A., Lucas, K.D., Hsieh, I., Greenbaum, D., Bogyo, M., Salter, J.P., Lim, K.C., Franklin, C., Kim, J.H., Caffrey, C.R. Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its trans-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase. *Mol Biochem Parasitol*, 2003, 131: 65-75.
- Sauer, J. R., Essenberg, R. C. and Bowman, A. S. Salivary glands in ixodid ticks: control and mechanism of secretion. *Journal of Insect Physiology.* 2000, 46: 1069-1078.
- Sojka D, Hajdusek O, Dvorák J, Sajid M, Franta Z, Schneider EL, Craik CS, Vancová M, Buresová V, Bogyo M, Sexton KB, McKerrow JH, Caffrey CR, Kopáček P. IrAE: an asparaginyl endopeptidase (legumain) in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol.* 2007;37:713-724.
- Sojka D, Franta Z, Horn M, Hajdusek O, Caffrey CR, Mares M, Kopáček P. Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasit Vectors.* 2008, 1: 7.
- Sojka D, Franta Z, Frantová H, Bartosová P, Horn M, Váchová J, O'Donoghue J, Eroy-Reveles AA, Craik CS, Knudsen GM, Caffrey CR, McKerrow JH, Mares M, Kopáček P. Characterization of gut-associated cathepsin D hemoglobinase from tick *Ixodes ricinus* (IrCD1). *J Biol Chem.* 2012, 287: 21152-21163.
- Sonenshine, D.E. *Biology of ticks.* Oxford University Press, 1991, New York, .
- Tsuji N, Miyoshi T, Battsetseg B, Matsuo T, Xuan X, Fujisaki K. A cysteine protease is critical for *Babesia spp.* transmission in *Haemaphysalis* ticks. *PLoS Pathog.* 2008, 4: e1000062.
- Volf P, Horák P. et al. *Paraziti a jejich biologie.* Triton, 2007, Praha/Kroměříž: 260-264.
- Willadsen P. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Vet. Parasit.* 2006, 161-168.
- Yamaji, K., Tsuji, N., Miyoshi, T., Islam, M.K., Hatta, T., Alim, M.A., Anisuzzaman, Takenaka, A., Fujisaki, K. Hemoglobinase activity of a cysteine protease from the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*. *Parasitol Int*, 2009, 58: 232-237.

7. Příloha

Franta Z, Frantova H, Konvickova J, Horn M, Sojka D, Mares M, Kopacek P. Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. Parasit Vectors. 2010, 3: 119.