

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Detekce glyoxylátové dráhy v klíštěti *Ixodes ricinus*

Bakalářská práce

Veronika Pavlasová

Školitel: RNDr. Ondřej Hajdušek, Ph.D., Biologické centrum AV ČR,
Parazitologický ústav, České Budějovice

Konzultant: doc. Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.

České Budějovice 2020

Pavlasová V., 2020: Detekce glyoxylátové dráhy v klíštěti *Ixodes ricinus*. [Detection of the glyoxylate pathway in the tick *Ixodes ricinus*, Bc. Thesis, in Czech] – 56 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Annotation:

Ticks are important blood-feeding ectoparasites and vectors of human and animal diseases. The development of rational anti-tick vaccines and drugs is strongly dependent on the identification of biochemical differences between ticks and vertebrates. The glyoxylate cycle was so far found only in bacteria, plants, fungi, and nematodes. Surprisingly, one article described an increase of glyoxylate, a product of the glyoxylate cycle, during embryogenesis in ticks. Aim of my work was to confirm the activity of the glyoxylate cycle (isocitrate lyase) in ticks, mainly in the developing eggs of *Ixodes ricinus*, by setting-up the biochemical test coupled with a specific inhibitor.

Key words: *Ixodes ricinus*, tick, isocitrate lyase (ICL), *aceA*, glyoxylate cycle, *Escherichia coli*

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 dne

.....

Veronika Pavlasová

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala Ondrovi Hajduškovi za vřelé přijetí do laboratoře, možnost zde vypracovat bakalářskou práci a užitečné rady během práce. Dále bych ráda poděkovala Gábi, Zuzce, Radkovi a Terce za pomoc při práci v laboratoři, trpělivé zodpovídání všech otázek a skvělou pracovní atmosféru. Velký dík patří Zdeňkovi Frantovi za pomoc s klonováním, Honzovi Pernerovi za pomoc s krmítky a Honzovi Erhartovi za jeho neustálý přísun nejenom klíčícího materiálu ke zkoumání.

Chtěla bych také poděkovat své rodině a drahé polovičce za nekončící podporu v mém nekončícím studiu a samozřejmě kamarádům, bez kterých by to prostě nešlo.

Obsah

1	Úvod a literární přehled.....	1
1.1	Glyoxylátový cyklus.....	1
1.1.1	Enzymy glyoxylátového cyklu.....	2
1.1.2	Glyoxylátový cyklus a organismy.....	3
1.1.3	Regulace glyoxylátového cyklu a inhibitory enzymů.....	4
1.2	Klíšťata.....	5
1.2.1	Systematika a morfologie.....	6
1.2.2	Životní cyklus.....	7
2	Cíle práce.....	12
3	Materiál a metody.....	13
3.1	Klíšťata.....	13
3.2	Identifikace a kvantifikace bakterií obsažených ve vajíčkách klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	13
3.2.1	Izolace DNA z klíštěcích vajíček.....	13
3.2.2	Identifikace bakterií pomocí PCR a sekvenace 16S rRNA.....	13
3.2.3	Elektroforéza v agarózovém gelu.....	14
3.2.4	Sekvenace.....	14
3.2.5	Kvantifikace bakterií pomocí qRT-PCR.....	14
3.3	Příprava pozitivní kontroly pro biochemickou esej.....	15
3.3.1	Amplifikace <i>aceA</i> genu standardní PCR.....	15
3.3.2	Klonování <i>aceA</i> do vektoru pASK IBA 37 plus.....	16
3.3.3	Izolace proteinů z bakteriálního peletu.....	19
3.3.4	SDS-PAGE.....	20
3.3.5	Western blot.....	20
3.3.6	Izolace proteinů průběžně odebíraných vzorků.....	20
3.3.7	SDS-PAGE a western blot průběžně odebíraných vzorků.....	21

3.4	Biochemická esej	21
3.4.1	Zpracování snůšek pro biochemickou esej	21
3.4.2	Biochemická esej	22
3.5	Krmení samic na umělých membránách	23
4	Výsledky	24
4.1	Identifikace a kvantifikace bakterií ve vajíčkách klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	24
4.1.1	Vliv antibiotik na sání a kladení samic	24
4.1.2	Amplifikace bakteriální 16S rRNA pomocí PCR, sekvenace a qRT-PCR pro kvantifikaci bakterií	25
4.2	Příprava pozitivní kontroly pro biochemickou esej	28
4.2.1	Amplifikace genu <i>aceA</i> z genomu <i>Escherichia coli</i>	28
4.2.2	Ligace a transformace do <i>E. coli</i> TOP10 buněk	28
4.2.3	Exprese rekombinantního proteinu pomocí anhydrotetracyklinu	30
4.2.4	Ověření exprese rekombinantu <i>aceA</i>	32
4.3	Ověření aktivity rekombinantního proteinu pomocí biochemické eseje	33
4.4	Detekce isocitrát lyázy biochemickým testem ve vajíčkách klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	35
4.5	Detekce isocitrát lyázy biochemickým testem u jiných druhů klíšťat	37
4.6	Test inhibitoru na krmítku	38
5	Diskuze	42
6	Závěr	47
7	Příloha	48
8	Seznam použité literatury	51

Seznam použitých zkratek

PBS	phosphate buffered saline, fosfátový pufr
<i>aceA</i>	gen kódující isocitrát lyázu <i>Escherichia coli</i>
acetyl-CoA	acetylkoenzym A
ACO	akonitáza
ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
BLAST	Basis Local Alignment Search Tool, online vyhledávač nukleotidových sekvencí
bp	base pair, jednotka délky nukleových kyselin
CoA-SH	koenzym A
CS	citrátsyntáza
dH ₂ O	distilled water, destilovaná voda
ddH ₂ O	double-distilled water, dvakrát destilovaná voda
DNA	deoxyribonucleic acid, kyselina deoxyribonukleová
EC	enzyme comission number, numerické klasifikační schéma pro enzymy
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate, dihydrát disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové
EtOH	ethanol
IA	itaconic acid, kyselina itakonová (itakonát)
ICL	isocitrate lyase, isocitrát lyáza
IDH	isocitrátdehydrogenáza
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, online databáze genů a genomů
LB	Luria-Bertani medium
MDH	malátdehydrogenáza
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid oxidovaná forma
NADH	nikotinamidadenindinukleotid redukovaná forma
O.D.	optical density, optická densita
O/N	over night, přes noc
PBST	1x fosfátový pufr doplněný o 0,05 % Tweenu

PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PEP	phosphoenolpyruvate, fosfoenolpyruvát
P _i	inorganic phosphate, anorganický fosfát
PVDF	polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative polymerase chain reaction, kvantitativní polymerázová řetězová reakce
rpm	revolutions per minute, otáčky za minutu
rRNA	ribosomal ribonucleic acid, ribozomální ribonukleová kyselina
S.O.C.	Super Optimal broth with Catabolite repression, tekuté kultivační medium s represí katabolitů (přidanou glukózou)
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS)
SEM	standard error of the mean, standardní chyba průměru
TAE	tris-acetát-EDTA
Tris	trisaminomethan
W.H.O.	World Health Organisation, světová zdravotnická organizace

1 Úvod a literární přehled

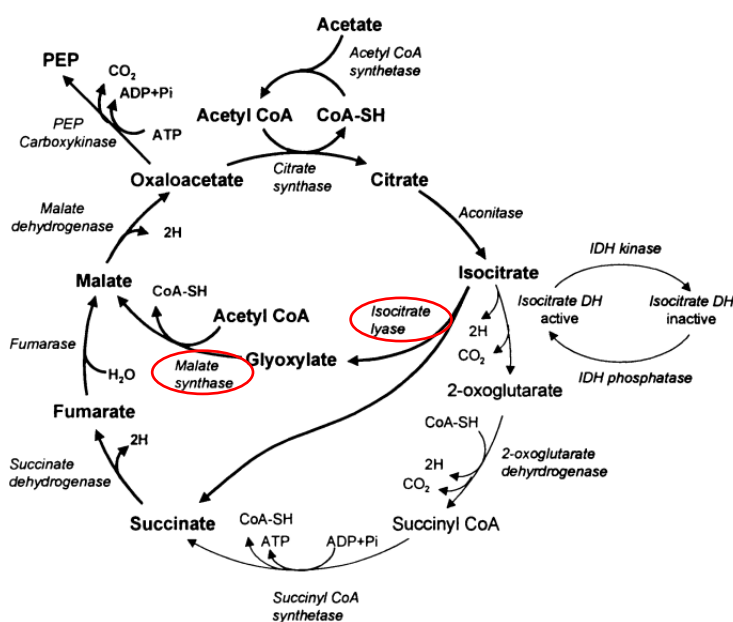
1.1 Glyoxylátový cyklus

Citrátový cyklus (také Krebsův cyklus, cyklus kyseliny citrónové nebo cyklus trikarboxylových kyselin), objasněný v roce 1937 Krebsem a Johnsonem, umožňuje oxidaci dvou atomů uhlíku (například z acetyl-CoA) na dvě molekuly CO₂, a zároveň uvolňuje čtyři páry elektronů k produkci energie (Krebs and Johnson, 1980; Thauer, 1988). Glyoxylátový cyklus byl objeven během studia bakteriálního růstu na acetátu a jiných dvouuhlíkatých (C2) sloučeninách (Kornberg and Krebs, 1957). V případě, že jsou zdrojem uhlíku sloučeniny, které jsou metabolismem degradovány výhradně na acetylové skupiny (acetát, mastné kyseliny, ketogenní aminokyseliny), nedochází u některých organismů k jejich přeměně jen citrátovým cyklem. U těchto organismů, kterými jsou například bakterie rostoucí na živinami chudých médiích, je žádoucí částečně přesměrovat uhlík od oxidačních kroků citrátového cyklu ke glukoneogenezi a tudíž k tvorbě biomasy (Dolan and Welch, 2018). Oba cykly tedy běží současně kvůli vybalancování mezi energetickým metabolismem a tvorbou prekurzorů glukoneogeneze. Glyoxylátový cyklus je tak významnou anaplerotickou drahou u bakterií, protist, rostlin a některých živočichů.

Glyoxylátový cyklus sestává z pěti reakcí. Nejprve je acetyl-CoA (C2) kondenzován s glyoxylátem (C2) za vzniku malátu (C4). NAD⁺ dependentní malátdehydrogenáza pak katalyzuje oxidaci malátu na oxalacetát (C4) za současné redukce NAD⁺ na NADH. Citrátsyntáza katalyzuje vznik citrátu (C6) z oxalacetátu a jedné molekuly acetyl-CoA. Akonitáza pak přeměňuje citrát na isocitrát (C6) přes *cis*-akonitát a isocitrát lyáza katalyzuje přeměnu isocitrátu na glyoxylát a sukcinát (C4). Jinými slovy, posledním krokem glyoxylátového cyklu je formování sukcinátu a regenerace glyoxylátu skrze reakci isocitrát lyázy (Uchida *et al.*, 1986). Vznikající sukcinát a malát jsou oxidovány a dávají vzniku fumarátu a oxalacetátu, který dále může vstupovat do glukoneogeneze. Oxalacetát může být přeměněný fosfoenolpyruvát karboxykinázou na fosfoenolpyruvát a pomocí fruktóza-1,6-bifosfatázy na glukózu.

1.1.1 Enzymy glyoxylátového cyklu

Většina enzymů glyoxylátového cyklu je společná s cyklem citrátovým, nicméně dva enzymy (isocitrát lyáza (ICL) a malát syntáza (MS)) jsou jedinečné pro tento cyklus. Jak je zřetelné z obrázku 1, v Krebsově cyklu existuje regulace isocitrát dehydrogenázy (IDH) fosforylací a defosforylací skrze enzymy isocitrátdehydrogenáza kinázu (IDH kinázu) a isocitrátdehydrogenáza fosfatázu (IDH fosfatázu). Tímto způsobem je možná inhibice citrátového cyklu a přesměrování isocitrátu na isocitrát lyázu a tudíž do glyoxylátového cyklu. V prokaryotické buňce se enzymy glyoxylátového cyklu nachází v cytoplasmě, u eukaryot se vyskytují ve specializovaných organelách, jako jsou endosomy a peroxisomy (konkrétně glyoxyzomy) (Huang et al., 1983).



Obrázek 1: Schéma citrátového cyklu bakterie *Escherichia coli* s vyznačeným glyoxylátovým cyklem (Cornah and Smith, 2002). Isocitrát vznikající z citrátu je isocitrát lyázou štěpen na glyoxylát a sukcinát. Glyoxylát je za účasti malát syntázy kondenzován s acetyl-CoA na malát. Vzniklý sukcinát a malát mohou být metabolizovány až na oxalacetát, který může vstupovat do glukoneogeneze. Enzymy glyoxylátového cyklu jsou označeny červeným kroužkem.

Tabulka I: Enzymy glyoxylátového cyklu a jimi katalyzované reakce. Převzato z (Cornah and Smith, 2002). EC: Enzyme commission number.

Název enzymu a zkratka	Reakce	EC
Citrátsyntáza [CS]	oxalacetát + acetyl-CoA + H ₂ O → [citroyl CoA] → citrát + CoA	4.1.3.7
Akonitáza (citrát hydrolyzáza, akonitát hydratáza) [ACO]	citrát ↔ [<i>cis</i> -akonitát] + H ₂ O ↔ isocitrát	4.2.1.3
Isocitrát lyáza [ICL]	isocitrát ↔ glyoxylát + sukcinát	4.1.3.1
Malát syntáza [MS]	glyoxylát + acetyl-CoA + H ₂ O → malát + CoA	4.1.3.2
NAD⁺-malát dehydrogenáza [MDH]	malát + NAD ⁺ ↔ oxalacetát + NADH + H ⁺	1.1.1.37

1.1.2 Glyoxylátový cyklus a organismy

Glyoxylátový cyklus je velmi dobře popsán u mikroorganismů (Maharjan et al., 2005; Dunn et al., 2009), klíčících semen (Kornberg and Beevers, 1957) a hlístic (Rothstein and Mayoh, 1965; Reiss and Rothstein, 1974; McKinley et al., 1979; Liu et al., 1995; Siddiqui et al., 2000). Indukce glyoxylátového cyklu se objevuje jako odpověď na různé fyziologické a stresové situace. Cyklus byl prvně objeven u *Pseudomonas fluorescens* (Kornberg and Krebs, 1957). Později se ukázalo, že cyklus se účastní přeměny tuků na sacharidy u semen olejnatých rostlin (Kornberg and Beevers, 1957). Nicméně nejvíce je o enzymologii cyklu známo díky studiu na bakterii *Escherichia coli* (*E. coli*) (Kornberg, 1966; Britton et al., 2001; Maharjan et al., 2005).

Jedinými Metazoa, u kterých je potvrzena aktivita ICL a MS, jsou hlístice v raných stádiích embryogeneze (Liu et al., 1995; Kondrashov et al., 2006). Někteří autoři uvedli aktivitu ICL nebo MS i u jiných Metazoa, včetně ptáků (Davis et al., 1990b), obojživelníků (Goodman et al., 1980; Davis et al., 1986) a savců. Tyto objevy jsou však značně kontroverzní, aktivita enzymů byla pozorována pouze za předpokladu extrémních patologických stavů organismu, například při dlouhodobém hladovění (Eprintsev et al., 2002), hibernaci (Davis et al., 1990a), nebo při problémech spojených s alloxanem indukovaným diabetem (Popov et al., 1998; Volvenkin et al.,

1999). Hlavním problémem je však neschopnost identifikovat geny ICL a MS v genomech metazoí (s výjimkou genů hlístic) (Kondrashov et al., 2006). Výzkum profesora Kondrashova se zakládal na bioinformatické analýze zaměřené na detekci homologních genů obou dvou enzymů specifických pro glyoxylátový cyklus v dostupných kompletních genomech různých zvířat. Byly nalezeny pseudogeny u různých skupin organismů, zahrnující i obratlovce, bohužel žádný z výsledků nebyl ověřen experimentálně (Kondrashov et al., 2006).

1.1.3 Regulace glyoxylátového cyklu a inhibitory enzymů

Obecně je cyklus zajímavý z hlediska medicínského, kde se regulace glyoxylátového cyklu využívá v boji proti škodlivým agens. Alespoň jeden z enzymů glyoxylátového cyklu byl totiž identifikován u rostlinných a živočišných patogenů, jakými jsou např. *Pseudomonas aeruginosa* způsobující záněty močových cest, středního ucha, či hnisání ran (Crousilles et al., 2018), *Cryptococcus neoformans* mající podíl na meningitidě (Xu et al., 2016), *Mycobacterium avium*, intracelulární patogen postihující buňky imunitního systému (Zu Bentrup et al., 1999) a *Mycobacterium tuberculosis* způsobující tuberkulózu (Zu Bentrup et al., 1999), *Fusarium graminearum*, rostlinný patogen postihující kulturní plodiny (Park et al., 2016), *Leptosphaeria maculans* postihující Brassicace, např. brkev řepky (Idnurm and Howlett, 2002) a mnoho dalších. Díky přítomnosti enzymů glyoxylátového cyklu u těchto a dalších patogenů a zároveň jejich nepřítomnosti u obratlovců, je výhodné využít glyoxylátový cyklus jako cíl antimikrobiálních přípravků.

Inhibitory glyoxylátového cyklu mohou být buď cílené na isocitrát lyázu, nebo na malát syntázu. Většina současných inhibitorů byla vyvinuta, nebo testována, na bakterii *Mycobacterium tuberculosis*, původci tuberkulózy, který v současné době vykazuje razantní nárůst rezistence na běžná antibiotika (W.H.O. Fact sheets on tuberculosis - <https://www.who.int/tb/publications/factsheets/en/>, staženo 5.5.2020). Inhibitory isocitrát lyázy můžeme rozdělit na přírodní a syntetické. Jako přírodní inhibitory lze zmínit dva extrakty využívané hojně v čínské medicíně, a to extrakty ze zázvoru lékařského (*Zingiber officinale*) a badyániku pravého (*Illicium verum*) (Lu et al., 2010). Relativně nově byl zjištěn inhibiční efekt chelerythrinu obsaženého ve vlašovičniku větším (*Chelidonium majus*) na isocitrát lyázu (Liang et al., 2011).

Syntetických inhibitorů je velká řada, například 3-nitropropionát (Schloss and Cleland, 1982), 3-bromopyruvát (Ko and McFadden, 1990), nebo kyselina itakonová (McFadden and Purohit, 1977). Jejich problém často spočívá v inhibici nejen glyoxylátového cyklu, nýbrž i jiných metabolických drah. Například itakonát, který prokazatelně inhibuje isocitrát lyázu, je zároveň kompetitivním inhibitorem sukcinát dehydrogenázy (komplexu II) elektronového transportního řetězce (Ackermann and Potter, 1949). Ačkoliv je kyselina itakonová v současné době vyráběna synteticky fermentací sacharidů pomocí hub *Aspergillus itaconicus* a *Aspergillus terreus* především k výrobě pryskyřic, plastů, barev a syntetických vláken (Willke and Vorlop, 2001; Okabe et al., 2009), ukazuje se, že si ji mnohé organismy umí syntetizovat za jinými účely. V makrofázích obratlovců je itakonát *in vitro* silně indukován lipopolysacharidy (LPS) a slouží jako protizánětlivý metabolit, což vedle antimikrobiální aktivity naznačuje nový biologický účinek a mohl by výrazně přispět k zlepšení terapeutického přístupu k léčbě zánětů (Bambouskova et al., 2018; Mills et al., 2018; Yu et al., 2019).

1.2 Klíšťata

V 80. letech byla biochemickou esejí detekována přítomnost glyoxylátu, a tím i glyoxylátového cyklu, ve vyvíjejících se vajíčkách klíšťete *Hyalomma dromedarii*. Nárůst glyoxylátu byl detekován po celou dobu vývoje vajíčka, nárůst v čase prudce stoupal a kulminoval 15. dne po ovipozici, u nově vylíhlých larev byl však nárůst minimální (Kamel and Fahmy, 1982). Nikdy ale nebyly izolovány proteiny tohoto cyklu, ani nedošlo k nalezení sekvence genů kódujícího isocitrát lyázu nebo malát syntázu. V současné době máme k dispozici genom klíšťat *Ixodes ricinus* a *Ixodes scapularis*. Nicméně v těchto genomech nebyla zatím objevena homologie s geny kódujícími tyto enzymy a to z důvodu jejich absence, nebo sekvenční odlišnosti od již známých sekvencí těchto genů z jiných organismů. Jak již bylo zmíněno výše, glyoxylátový cyklus není součástí normálního savčího metabolismu, proto je možné proti němu cílit látky, které ho inhibují. Objevem genu kódujícího isocitrát lyázu nebo malát syntázu by tak mohlo dojít k výraznému vědeckému pokroku při výrobě protiklišťecích přípravků.

Důležitou součástí klíšťat jsou symbiotické bakterie, které patří do rodů *Rickettsia*, *Francisella*, *Coxiella*, *Wolbachia* a *Midichloria* (Ahantarig et al., 2013).

Například mezi důležité symbionty klíštěte *Ixodes ricinus* patří bakterie *Midichloria mitochondrii*, u které byl zjištěn vliv na sání a svlékání klíšťat (Ninio et al., 2015). Pro velké množství rodů je typická *francisella*-like symbiotická bakterie nalezená u rodů *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Ornithodoros*, *Hyalomma* a *Rhipicephalus* (Scoles, 2004; Ivanov et al., 2011), u které se spekuluje, že se vyvinula z původně patogenní bakterie *Francisella tularensis* (Gerhart et al., 2016), způsobující tularémii u zajíců s možným přenosem na člověka, který může probíhat přes klíště (Zellner and Huntley, 2019). Ačkoliv je glyoxylátový cyklus přítomný v bakteriích, u několika důležitých skupin intracelulárních bakterií chybí, a to včetně řádu Rickettsiales, kam můžeme zařadit bakterie *Midichloria mitochondrii* nebo *Nicolleia massiliensis*, dalšího endosymbionta klíštěte *Ixodes ricinus* (KEGG).

1.2.1 Systematika a morfologie

Klíšťata jsou hematofágní roztoči přenášející široké spektrum zvířecích i lidských patogenů (de la Fuente et al., 2008). Systematicky tato arachnida řadíme mezi Parasitiformes, řádu Ixodida a rodiny Ixodoidea (Keirans, 2009). V současné době jsou ustanoveny tři čeledi klíšťat, Argasidae, Ixodidae a Nuttalliellidae (Sonenshine, 1991; Nava, 2009). Do čeledi Ixodidae („tvrdých“ klíšťat) se řadí rody *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* a *Rhipicephalus* (Guglielmone, 2010). Vyskytuje se u nich jednohostitelský (všechna stádia sají na jediném hostiteli), dvouhostitelský, či tříhostitelský (každé stádium saje na jiném hostiteli) životní cyklus. Tříhostitelský cyklus je nejčastější a přítomný i u našeho nejběžnějšího klíštěte *Ixodes ricinus* (obrázek 2). Dospělci skupiny Ixodidae mají výrazný sexuální dimorfismus a vždy jen jedno nymfální stádium. K páření dochází na hostiteli, s výjimkou rodu *Ixodes*, jehož zástupci se běžně páří i mimo hostitele (Sonenshine, 1991). Nejvýraznější rozdíly mezi Argasidae a Ixodidae jsou shrnuty v tabulce II.

Mezi Argasidae, neboli „měkká“ klíšťata řadíme rody *Antricola*, *Argas*, *Nothoaspis*, *Ornithodoros* a *Otobius* (Guglielmone, 2010). Na rozdíl od „tvrdých“ klíšťat nemají na dorsální straně chitinizovaný hřbetní štítek (scutum). Tato klíšťata mají více nymfálních instarů (multi-hostitelský životní cyklus) a k jejich páření nedochází na hostiteli. Samice jsou schopny sát opakovaně po krátkou dobu (minuty) a po každém sání kladou stovky vajíček (Sonenshine, 1991).

Skupina Nuttalliellidae je reprezentována pouze jedním zástupcem žijícím v Jižní Africe, který se zdá být chybějící evoluční spojkou mezi „tvrdými“ (Ixodidae) a „měkkými“ (Argasidae) klíšťaty (Keirans et al., 1976; Houck, 1994).

Tabulka II: Shrnutí základních rozdílů mezi Argasidae a Ixodidae (Sonenshine, 1991).

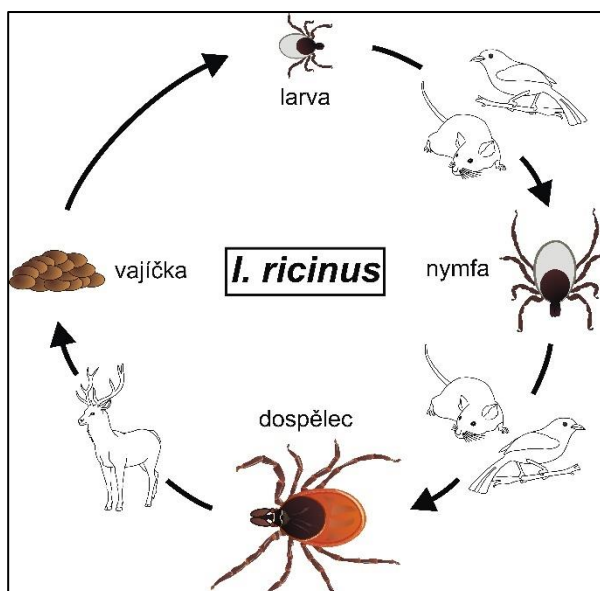
Znak	Argasidae	Ixodidae
Tělní povrch	měkký kožovitý tělní povrch, scutum nepřítomno	scutum přítomno
Ústní část	na ventrální straně, neviditelná shora	vpředu, viditelná shora
Stádium nymfy	několik	pouze jedno
Doba sání dospělce	30-60 minut	několik dní
Počet sání samice	několik	jedno
Kladení vajíček	několikrát	jednou
Počet vajíček	400-500	3000-8000
Sexuální dimorfismus	nenápadný	nápadný
Vyhledávání hostitele	nízkolní, hostitele napadají v hnízdech, jeskyních, doupatech aj.	čekají na hostitele ve vyšších patrech vegetace (např. na stéblech trávy)

1.2.2 Životní cyklus

1.2.2.1 Tříhostitelský životní cyklus (*Ixodes ricinus*)

Životní cyklus klíšťete *Ixodes ricinus* zahrnuje stádium vejce a tři následná aktivní vývojová stádia: larvu, nymfu a dospělce. Každé aktivní stadium saje jen jednou a pokaždé na jiném hostiteli (tříhostitelský životní cyklus), kdy hostitelem může být jakékoliv zvíře z řad plazů, ptáků i savců. Po nasátí krve dochází k svlékání a přeměně na další stádium. Zatímco menší larvy a nymfy sají většinou na menších

savcích (myši, králíci), dospělá samice saje obvykle na velkých savcích (jeleni, srnci a divoká prasata), viz obrázek 2. Při sání je samice schopna nasát až 1 ml krve a zvětšit svou velikost až 100x. Po oplodnění samcem naklade tisíce vajíček a hyne. Dospělí samci krev nesají.



Obrázek 2: Schéma znázorňující tříhostitelský životní cyklus klíštěte *Ixodes ricinus*.

Larvy obvykle sají na menších hostitelích, kterými mohou být myši, ptáci a menší plazi. Po nasátí larva opouští hostitele a na vlhkém stinném místě se svléká do dalšího stádia, nymfy. Nymfa saje na dalším hostiteli, kterým bývají opět menší hlodavci, zajáci, ptáci a plazi, po nasátí se opět hostitele pouští a transformuje se do dospělého stádia. Larvy ani nymfy nejsou pohlavně diferenciovány, stádium dospělce má výrazný sexuální dimorfismus. Samice jsou větší, scutum nepřekrývá celé tělo a živí se krví např. spárkaté zvěře nebo jiných větších savců. Samci jsou menší, scutum chrání celé tělo a potravu nepřijímají. Samci aktivně hledají samice k páření, k oplodnění může dojít na hostiteli i mimo něj. Po spáření a sání samice klade zhruba tisíc vajíček (Sonenshine, 1991). Autor M. Hajdušková (Biographix).

1.2.2.2 Reprodukce klíštěte *Ixodes ricinus*

Jako reprodukce jsou souhrnně označovány tři fáze vývoje klíštěte, a to zrání gonád (pre-oviposition period, tj. období mezi opuštěním hostitele a ovipozicí), ovipozice a vývoj vajíčka. Zrání gonád se mění v závislosti na sezóně a rozdílech mezi jednotlivými samicemi. Nejkratší zaznamenaná doba byly pouhé čtyři dny (Olenev, 1927), nejdelší 52 dní (Macleod, 1932), obvykle však trvá 15-22 dní (Macleod, 1935). Nasáté samice, oplodněné samcem, byly vystaveny různým kombinacím relativních

vlhkostí a teplot. Samice umístěné v podmínkách o relativní vlhkosti vyšší než 95 % a teplotě vyšší 30 °C nekladly vajíčka a umíraly, zatímco samice umístěné tři měsíce v teplotách mezi 2 °C a 3 °C nezávisle na vlhkosti nekladly, avšak ani neumíraly. Ukázalo se, že tento stav nemusel být nutně dán nezralostí gonád. Podle dalších experimentů s různými teplotami se ukázalo, že k částečnému vývoji vaječníků došlo už při nižší teplotě (2-3 °C). Nicméně k ovipozici docházelo vždy pouze po dosažení minimálně pokojové teploty (15-18 °C). Čím více teplota roste, tím je perioda kratší a tento fenomén končí dosažením kritické teploty 30 °C. Zdá se tedy, že zatímco vývoj vaječníků není teplotou inhibován, samotný proces ovipozice nízkou teplotou inhibován je. Podle (Macleod, 1935) je bez ohledu na vlhkost nejideálnější teplota pro zrání vaječníků 25 °C.

K ovipozici dochází při teplotách mezi 14 a 30 °C. Horní mezní teplota pro kladení je mezi 27,5-30 °C, dolní mez při 14-25 °C (a 75-80% relativní vlhkosti). Jak bylo zmíněno výše, je nástup ovipozice inhibován nízkou teplotou. Nicméně není zaznamenán žádný vliv teploty nebo vlhkosti na samotné kladení. Na velikost snůšky má vliv hlavně původ a množství krve, které samice nasála.

Čerstvě vykladená vajíčka *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) jsou hnědá v důsledku přítomnosti hemu (Perner et al., 2016), obsah je tvořen globulární strukturou o pH 5,5-6,5. Vajíčko je typicky oválného tvaru a váží v průměru 0,06 mg (Arthur, 1948). Podle (Macleod, 1935) vývoj trvá v přírodě 8 týdnů, ale tato doba je proměnlivá v závislosti na sezóně a individuálních rozdílech. Čerstvě vykladené vajíčko je obaleno dvěma obaly, chorionem a vitellinní membránou. Chorion je tvořen dvěma vrstvami. Exochorionem, povrchovou a tenčí vrstvou, která dává vajíčku barvu, a endochorionem, což je vrstva hlubší, silnější a elastická, která dává vajíčku tvar. Pod chorionem leží vitellinní membrána, která je adherována ke kortikální vrstvě protoplasmu. Každé vajíčko je obaleno vrstvou slizu tvořenou Geného orgánem, která má mimo jiné funkci pojiva mezi jednotlivými vajíčky a drží snůšku pohromadě.

Embryonální vývoj klíšat je v podstatě stejný jako u jiných Acari (Woolley, 1988) a Arachnida (Sonenshine, 1991). V přirozených podmínkách sice trvá vývoj 8 týdnů, ale při umělých podmínkách v laboratořích je tato doba kratší, zhruba 21 až 30 dní. Podle pokusů (Olenev, 1927) byl zjištěn vliv teploty na vývoj a líhnutí. Při velmi nízkých teplotách (0-17 °C), dosažených umístěním vajíček na led, může celková doba

od vykladení vajíček po vylíhnutí larev trvat 300-400 dní, při 25-30 °C už jen 25 dní. Relativní vlhkost nutná pro vývoj musí být vždy větší než 80 %, pokud je vlhkost nižší, vajíčka mají tendenci se svrašťovat a buněčná stěna kolabuje. Horní mezní teplota se zdá být o něco větší než při zrání vaječnicků a ovipozici, mezi 30-35 °C. V případě nastavení vnějších podmínek na 28 °C a 90-100% relativní vlhkosti vzduchu, trvá vývoj cca 30 dní a je následovný (přehledně shrnuto v tabulce III).

Během prvních dnů vývoje dochází k rýhování a formování primárního blastodermu. Celularizace, tvorba finálního blastodermu a formace zárodečných listů, probíhá mezi druhým a čtvrtým dnem vývoje. Pátý den vývoje následuje gastrulace a první náznaky formace integumentu, na které navazuje postupná diferenciací buněk. Zároveň je pozorována proliferace a segregace buněk (primární organogeneze). Současně začíná být integument obkloповán vrstvou prokutikuly. V 10. dni od začátku embryogeneze jsou vidět první náznaky nohou, vakovitá primordia, která jsou po dalších 7 dnech zformována ve čtyři páry kráčivých končetin, palpy a chelicery. Během třetího trimestru vývoje však jeden pár končetin mizí. Přední střevo je formováno na začátku třetího trimestru. Původně se jedná o slepou výchlípku ektodermu na bázi formujících se ústních částí. Anus je formován až v závěru embryogeneze a midgut není během embryogeneze kompletně vyvinut, vývoj se ukončuje až v postembryonální době. Mezi 14. a 18. dnem dochází k formování malpighických trubic, mezi 23. a 26. dnem počíná vývoj slinných žláz. Během třetího trimestru embryogeneze dochází také k formování centrálního nervového systému, které má podobu kompaktního synganglia, ve kterém nervové buňky diferencují morfologicky a funkčně. Vývoj synganglia je doprovázen apoptózou a nekrózou (hlavně mezi 17.-21. dnem), ale tyto dva procesy jsou nejvíce asociované s tvorbou oběhového systému a rozpadem hematocytů, které jsou pozorovány během posledního týdne vývoje (Jasik, 2007). Tento obecný vývojový vzorec u *I. ricinus* vykazuje mnoho podobností s tím, který byl publikován u *Hyalomma dromedarii* (Kammah et al., 1982) a měkkého klíštěte *Ornithodoros moubata* (Aeschlimann, 1961). Porovnání vývoje *Hyalomma dromedarii* a *Ixodes ricinus* je v příloze 1.

Tabulka III: Shrnutí vývojových procesů v čase během embryonálního období vývoje klíštěte *I. ricinus* při teplotě 28 °C a relativní vlhkosti vzduchu 90-100 %. Převzato z (Jasik, 2007).

Den vývoje	
1	cleavage a formace primordiálního blastodemu
2	}
3	
4	
5	formace kutikulární vrstvy a invaginace
6	}
7	
8	
9	
10	
11	
12	}
13	
14	
15	
16	části trávicího, vylučovacího a nervového systému jsou viditelné
17	pozorovatelné čtyři páry kráčivých končetin, palpy a chelicery
18	}
19	
20	apoptóza
21	}
22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	tvorba haemocytů a oběhové soustavy
29	}
30	
31	líhnutí larev

2 Cíle práce

1. Zavedení biochemického testu pro detekci glyoxylátu (produktu isocitrát lyázy)
2. Exprese isocitrát lyázy z *E. coli* (pozitivní kontroly pro účel zavedení testu) v prokaryotickém expresním systému
3. Detekce glyoxylátové dráhy v klišťatech a dalších organismech

3 Materiál a metody

3.1 Klíšťata

Klíšťata *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) pocházela z přírody, byla sbírána metodou vlnkování a skladována ve zvěřinci Akademie věd při stálé teplotě 24 °C, vlhkosti vzduchu 95 % a fotoperiodě odpovídající 49 ° severní šířky (15 h den/9 h noc). Samice jiných druhů klíšťat (*Amblyomma americanum* a *Dermacentor reticulatus*) byly získány z chovu Akademie věd. Dospělé samice byly nasáty na morčatech do plného nasátí. Poté byly zváženy na analytických vahách (Sartorius CPA225D-0CE), krátce promyty v 3% H₂O₂ (Lach:ner), 70% ethanolu (Penta) a sterilní H₂O. Během kladení byla průběžně kontrolována fáze vývoje vajíček pod mikroskopem (Olympus BX53). Snůšky s vývojem odpovídajícím druhému týdnu byly odebrány a před dalším zpracováním promyty v 3% H₂O₂ (Lach:ner), 70% ethanolu (Penta) a sterilní H₂O. Přibližně 20 mg vajec pak bylo odebráno pro izolaci DNA a zamrazeno při -20 °C.

3.2 Identifikace a kvantifikace bakterií obsažených ve vajíčkách klíšťete *Ixodes ricinus*

3.2.1 Izolace DNA z klíšťecích vajíček

Bezprostředně před sáním na morčeti byla jedna skupina samic injikována směsí tetracyklinu (Sigma-Aldrich) a chloramfenikolu (Sigma-Aldrich). Roztoky antibiotik byly připraveny ředěním 15 mg tetracyklinu a 25 mg chloramfenikolu v 1 ml 99% ethanolu (Penta). Před injikací byl roztok antibiotik 10x naředěn v 1xPBS, takto připravený roztok byl pak v množství 300 nl injikován do hemolymfy klíšťat. Druhá, kontrolní skupina klíšťat, byla injikována směsí 1xPBS a 99% ethanolu (Penta) v poměru 9:1. K izolaci DNA byl použit kit Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel). Postup reflektoval přiložený návod. Odebraný vzorek vajíček (20 mg) byl rozbit sterilním plastovým tloučkem a za přítomnosti proteinázy K lyzován přes noc při 56 °C. Druhý den byla vyizolována DNA, čistota (260/280 nm) a koncentrace (280 nm) DNA byla zkontrolována na Nanodropu (ND-1000 Spectrophotometer).

3.2.2 Identifikace bakterií pomocí PCR a sekvenace 16S rRNA

Každá PCR reakce detekující bakteriální 16S rRNA obsahovala 12,5 µl FastStart PCR Masteru (Roche), 2 µl DNA, 1 µl forward primeru q16S-F (10 µM) a

1 μl reverse primeru q16S-R (10 μM) (tabulka IV). Zbývající objem byl doplněn sterilní vodou do 25 μl . Amplifikační program probíhal v cykleru (T100 Thermal cycler, BioRad) podle následujícího schématu: 10min primární denaturace při 95 °C a 35 cyklů střídajících 30s denaturaci při 95 °C, 30s annealing při 55 °C a 60s elongaci při 72 °C.

3.2.3 Elektroforéza v agarózovém gelu

PCR produkt byl pak nanesen na 1% agarózový gel. Gel byl připraven smícháním agarózy (Sigma-Aldrich) s 1xTAE pufrem, doplněným o ethidium bromid (1,5 μl /30 ml gelu, Sigma-Aldrich). 10 μl každého vzorku bylo smícháno s DNA nanášecí barvičkou (Top-Bio) a nanášeno na gel. Pro kontrolu velikosti výsledného produktu byl použit 100bp DNA standard (Thermo Scientific). Elektroforéza probíhala 25 minut při 100 V (Mupid-One, Nippon genetics).

3.2.4 Sekvence

Výsledné PCR produkty očekávané velikosti byly vyříznuty z gelu pod UV lampou (Biometra TI 3) a pomocí kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel) došlo k vyčištění amplifikovaných PCR produktů z gelu. U vyextrahovaných amplikonů byla změřena koncentrace (BioPhotometer plus, Eppendorf), 50 ng přečištěné DNA bylo smícháno s 25 pmol primeru q16S-F (tabulka IV) a doplněno do 10 μl sterilní vodou. Směs pak byla odeslána do firmy SEQMe na sekvenaci. Výsledné sekvence byly analyzovány v programu Chromas 2.6.6. (Technelysium) a porovnávány s online databází sekvencí (BLAST).

3.2.5 Kvantifikace bakterií pomocí qRT-PCR

Pro absolutní kvantifikaci bakterií ve vajíčkách byla využita metoda qRT-PCR (kvantitativní PCR) pomocí QuantStudio 6 Flex (ThermoFisher). Jednotlivá reakce, detekující bakteriální 16S rRNA, obsahovala 12,5 μl FastStart Universal Probe Masteru (Rox) (Roche), 5 μl DNA, 1 μl forward primeru q16S-F (10 μM), 1 μl reverse primeru q16S-R (10 μM), 1 μl příslušné sondy TaqMan probe (q16S-P-FAM Probe, 5 μM) (tabulka IV). Standardizace na klíčecí DNA byla provedena obdobnou reakcí za pomoci primerů Isact-F a Isact-R a probe Iract-P. qRT-PCR program pro absolutní kvantifikaci sledoval následující amplifikační schéma: 10min denaturace při 95 °C

následovaná 50 cykly střídajícími 15s denaturaci při 95 °C a annealing společně s elongací při 60 °C po dobu jedné minuty.

Tabulka IV: Primery a sondy pro identifikaci a kvantifikaci bakterií ve vzorcích DNA vyizolované z vajíček *I. ricinus*. Teplota nasedání primerů byla u obou párů primerů 60 °C.

Cíl	Název	Sekvence (5'→3')	Velikost produktu	Zdroj
<i>Bakteriální 16S rRNA</i>	q16S-F	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	466 bp	(Nadkarni et al., 2002)
	q16S-R	GGACTACCAGGGTATCTAA TCCTGTT		
	q16S-P-FAM	CGTATTACCGCGGCTGCTG GCAC		
<i>I. ricinus</i> <i>β-aktin</i> (AJ889837)	Isact-F	GATCATGTTTCGAGACCTTC A	92 bp	(Dai et al., 2009)
	Isact-R	CGATACCCGTGGTACGA		
	Iract-P	CCATCCAGGCTGTGCTCTC		

3.3 Příprava pozitivní kontroly pro biochemickou esej

3.3.1 Amplifikace *aceA* genu standardní PCR

Amplifikace bakteriálního genu *aceA* byla provedena pomocí navržených gen-specifických primerů pro gen *aceA* (b4015) z *Escherichia coli* (*E. coli*), viz tabulka V. Jako templát byla použita DNA z *E. coli* K-12 (MG1655). Malé množství bakterií bylo rozpipetováno ve sterilním 1xPBS a přímo použito k PCR reakci.

20 µl PCR reakce obsahovalo 10 µl KOD polymerázy (Novagen), 0,6 µl AceA-F, 0,6 µl AceA-R, 2 µl DNA a 6,8 µl sterilní vody. Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce V. Amplifikační program probíhal podle následujícího schématu: 2min úvodní denaturace při 95 °C a 35 cyklů střídajících 20s denaturaci při 95 °C, 20s annealing při 55 °C a 100s elongaci při 70 °C.

Produkt PCR reakce byl následně nanesen na 1% agarózový gel doplněný o ethidium bromid (1,5 µl/30 ml gelu, Sigma-Aldrich) v množství 10 µl na jamku a poté vyextrahován kitem PCR clean-up Gel extraction (Macherey-Nagel).

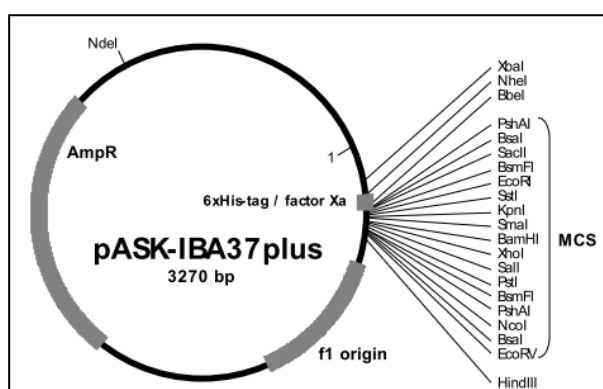
Tabulka V: Gen specifické PCR primery pro gen *aceA* bakterie *Escherichia coli* (kmen K-12). Teplota nasedání je 55 °C.

Cíl	Název	Sekvence (5'→3')	Velikost produktu	Zdroj
<i>Escherichia coli</i> <i>aceA</i> (b4015)	AceA-F	ATGGTAGGTCTCAGCGC AAAACCCGTACACAACAAATT GA	1336 bp	vlastní
	AceA-R	ATGGTAGGTCTCATATCTTA GAACTGCGATTCTTCAGTGG		

3.3.2 Klonování *aceA* do vektoru pASK IBA 37 plus

3.3.2.1 Enzymatická restrikce amplikonu a ligace do expresního vektoru pASK IBA 37 plus

Restrikce probíhala za pomoci BsaI restriktázy (BioLabs), kdy došlo k restrikci vektoru i templátové DNA a vytvoření lepivých konců na koncích řetězců. Mapa vektoru pASK IBA 37 plus (IBA Lifesciences) je znázorněna na obrázku 3. Vstupní materiál je uvedený v tabulce VI. Samotné štěpení trvalo 15 minut při 37 °C a bylo následováno 20min deaktivací při 65 °C. Štěpený vektor byl před ligací defosforylován 30 minut při 37 °C 2,5 μl alkalické fosfatázy (Shrimp Alkaline Phosphatase, BioLabs), která byla následně deaktivována 5 minut při 65 °C. Restrikce byla ověřena na 1% agarózovém gelu s ethidium bromidem (1,5 μl/30 ml gelu, Sigma-Aldrich).



Obrázek 3: Vlastnosti vektoru pASK IBA 37 plus (IBA Lifesciences, manuál pro pASK IBA 37 plus vektor). Velikost vektoru činí 3270 bp, obsahuje resistenci na ampicilin a 6xHis-tag pro přečištění proteinu.

Tabulka VI: Reakční směsi pro restrikci pomocí BsaI restriktázy.

Složení reakční směsi obsahující vektor		Složení reakční směsi obsahující templátovou DNA	
vektor	5 µl	DNA	1 µg
10x CutSmart buffer	5 µl	10x CutSmart buffer	5 µl
BsaI	1 µl	BsaI	1 µl
ddH ₂ O	doplnit do 39 µl	ddH ₂ O	doplnit do 50 µl

Štěpený vektor i DNA byly přečištěny pomocí kitu PCR cleaning kit (Macherey-Nagel), koncentrace přečištěných produktů byla změřena na NanoPhotometru Pearl (Implen). DNA byla s vektorem smíchána v poměru koncentrací 3:1. Oba, štěpený vektor i amplikon, byly ligovány dohromady pomocí T4 ligázy (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Při ligaci byl následován protokol od Invitrogenu (tabulka VII). Reakce byla inkubována přes noc (O/N) při 16 °C a byla přerušena 10min deaktivací v 65 °C.

Tabulka VII: Protokol od Invitrogenu pro ligaci s použitím T4 ligázy.

Komponenty	20 µl reakce
T4 DNA Ligase Buffer (10X)	2 µl
Vektor	50 ng (0,020 pmol)
Inzert	37,5 ng (0,060 pmol)
T4 DNA Ligase (5U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	doplnit do 20 µl

3.3.2.2 Transformace vektoru do One Shot TOP10 buněk

Transformace do chemokompetentních TOP10 buněk *E. coli* (Invitrogen) probíhala 20 min na ledu, kdy 25 µl TOP10 buněk bylo opatrně promícháno s 12 µl ligačního produktu. Poté byly buňky na 50 s vloženy do tepelného bloku (Labnet) a pak na 2 min na led. Nakonec bylo přidáno 300 µl S.O.C. media (Invitrogen) o pokojové teplotě a médium s buňkami vloženo na 30 min do třepačky (Sayno IOI400.XX2.C) nastavené na 27 °C a 324 rpm . Zatransformované buňky byly sterilně

rozetřeny na ampicilinem (Amresco) ošetřenou LB misku (15 g agarózy na 1 litr LB media doplněno o 1 % 50 μ M ampicilinu) a dány do kultivačním boxu při 37 °C.

Selekce transformovaných kolonií byla ověřena pomocí standardní PCR reakce. Jako substrát bylo použito malé množství bakterií setřených špičkou pipety z LB misky a rozpipetovaných v 3,5 μ l destilované vody. Reakční mix obsahoval 1 μ l Taq pufru (Invitrogen), 0,33 μ l dNTP (Invitrogen), 1 μ l forward primeru, 1 μ l reverse primeru, 1 μ l Taq polymerázy (Invitrogen) a 5,5 μ l sterilní vody. Po připravení obou dvou složek bylo smícháno 3,5 μ l rozpipetovaných bakterií s 9 μ l reakčního mixu.

K amplifikaci byly použity gen specifické primery AceA-F a AceA-R a sekvenační primery pro pASK vektor pASK-F a pASK-R (tabulka VIII). Amplifikační program zahrnoval 10min denuraci při 94 °C a 40 cyklů střídajících 30s denuraci při 95 °C, 30s annealing při 55 °C a 90s elongaci při 72 °C. Finální extenze trvala 10 minut při 72 °C. Velikost PCR produktů byla ověřena gelovou elektroforézou při 100 V na 1% agarózovém gelu. 100bp ladder (Thermo Scientific) a vzorky byly nanášeny v množství 10 μ l/jamka.

Tabulka VIII: Sekvenační primery pro vektor pASK IBA 37. Teplota nasedání primerů je 55 °C.

Target	Název	Sekvence (5'→3')	Velikost produktu	Zdroj
<i>pASK IBA 37 plus vektor</i>	pASK-F	GAGTTATTTTACCACTCCCT	1626 bp	pASK IBA 37 plus Data sheet (IBA)
	pASK-R	CGCAGTAGCGGTAAACG		

3.3.2.3 *Expresse isocitrát lyázy z pASK vektoru*

Bakteriální kolonie pozitivně testované na *aceA* gen byly přes noc namnoženy v 10 ml tekutého LB media s 0,1% obsahem 50 μ M ampicilinu (Amresco) v třepačce při 37 °C a 324 rpm (Sayno IOI400.XX2.C). Následující den bylo 5 ml narostlých buněk přesunuto do 100 ml nového LB media s 0,1 % 50 μ M ampicilinu a optická densita (O.D.) při 600 nm měřena každých 30 minut. Změřené vzorky byly zmrazeny při -20 °C a použity k další analýze. Při hodnotě O.D. 0,7 byl přidán anhydrotetracyklin

(IBA Lifesciences) v koncentraci 200 µg/1 litr kultury. Buňky byly ponechány v třepačce do stacionární fáze (O.D. = 2). Následně byly stočeny při 8300 g/10 min/4 °C (Multifuge X3R Centrifuge, Thermo scientific) a použity k izolaci proteinů.

3.3.3 Izolace proteinů z bakteriálního peletu

Cytoplasmatická frakce bakterií byla získána jako supernatant získaný stočením rozsonikovaného bakteriálního peletu v lyzačním pufru. Zbylý pelet byl dále sonikován v izolačním pufru, stočen, a supernatant byl klasifikován jako membránová frakce. Každá sonikace v jehlovém sonikátoru UP200S Ultrasonic Processor (Hielscher) probíhala 3x po 25 s při amplitudě 40 % a stáčení bylo prováděno při 8300 g/15 min/4 °C (Multifuge X3R Centrifuge, Thermo scientific). Nakonec byla izolována inkluzní tělíska solubilizačním pufrem O/N. Pro účely SDS-PAGE byl supernatant získaný stočením solubilizovaných inkluzních tělísek (8300 g/15 min/4 °C, Multifuge X3R Centrifuge, Thermo scientific) přefiltrován přes 0,22µm filtr Millex®GP (Millipore) a dialyzován proti destilované vodě ve 12-14kDa střívku VISKING® (Serva). Dialyzát byl opět filtrován přes 0,22µm filtr. Složení všech použitých pufků pro izolaci proteinů frakcí jsou uvedeny v tabulce IX.

Tabulka IX: Složení pufků užitých k získání buněčných frakcí a izolaci inkluzních tělísek.

Pufr	Složení
Lyzační pufr	20 mM Tris-HCl, pH = 8,0 (Sigma-Aldrich)
Izolační pufr	20 mM Tris-HCl, pH = 8,0 (Sigma-Aldrich) 0,5 M NaCl (Lach:ner) 2 M urea (Lach:ner) 10 mM imidazol (Sigma-Aldrich) 1 mM β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) 2 % Triton-X (Rohm and Haas)
Solubilizační pufr	6 M guanidin hydrochlorid (Sigma-Aldrich) 20 mM Tris-HCl, pH = 8,0 (Sigma-Aldrich) 0,5 M NaCl (Lach:ner) 4 mM imidazol (Sigma-Aldrich) 1 mM β-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich)

3.3.4 SDS-PAGE

Pelet inkluzních tělísek byl rozpipetován ve 13 μ l sterilní vody. 13 μ l frakcí získaných izolací proteinů bakteriálního peletu a 13 μ l rozpipetovaného peletu bylo smícháno s 5 μ l LDS Sample Buffer (4x) (Novex) a 2 μ l 10x Sample Reducing Agent (Novex). Směs byla inkubována 10 min při 70 °C a pak zchlazena na ledu. K SDS-PAGE byl užit komerčně dostupný připravený gel Bolt mini gel (Novex). Na jamku bylo nanášeno vždy 20 μ l vzorku. V elektroforéze Bolt mini gel tank (Novex) s 1xSDS reakčním pufrem (připravený ředěním komerčně dodaného 20xSDS pufru, Novex) byly separovány frakce při 200 V. Jako proteinový standard velikosti byl použit 180kDa proteinový žebříček (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific).

3.3.5 Western blot

K detekci proteinu byl využit Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit (Bio Rad). Přenos proteinů z gelu na PVDF membránu (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio Rad) byl nastaven na 7 minut při 100 V. Pro blokaci nespecifických míst byla membrána ponechána 60 minut v 3% odtučněném mléce (Bohemilk) rozpuštěném v 1xPBST (1xPBS s 0,05 % Tweenu). Po blokování se membrána přes noc inkubovala v primární myší anti-His protilátce (ředění 1:2000, Monoclonal Anti-polyHistidine, Sigma-Aldrich, katalogové číslo H1029). Následně byla membrána 10 minut promývána v 1xPBST a po promytí byly přidány proti-myší sekundární protilátky značené peroxidázou (ředění 1:20000, Sigma-Aldrich, katalogové číslo A5278). Nakonec byla membrána 5 min inkubována se substrátem Luminata Classico (Western HRP Substrate, Milipore) a signál detekován pomocí přístroje ChemiDoc (Bio-Rad).

3.3.6 Izolace proteinů průběžně odebíraných vzorků

Vzorky odebírané při měření O.D. v kapitole 3.3.2.3 byly rozmrazeny a stočeny při 8300 g/10 min/4 °C (Multifuge X3R Centrifuge, Thermo scientific). Získaný pelet byl rozsonikován (UP200S Ultrasonic Processor, Hielscher) 3x po 25 s při amplitudě 40 % v lyzačním pufru uvedeném v tabulce IX. Získaný lyzát byl stočen a použit k SDS-PAGE.

3.3.7 SDS-PAGE a western blot průběžně odebíraných vzorků

13 μ l lyzátu vybraných vzorků pro SDS-PAGE bylo smícháno s 5 μ l LDS Sample Buffer (4x) (Novex) a 2 μ l 10x Sample Reducing Agent (Novex). Směs byla inkubována 10 min při 70 °C a zchlazena na ledu. Vzorky byly v množství 20 μ l naneseny na komerčně připravený Bolt mini gel (Novex). V elektroforéze Bolt mini gel tank (Novex) s 1xSDS reakčním pufrem (připraveným ředěním komerčně dodaného 20xSDS pufru, Novex) byly separovány frakce při 200 V. Jako proteinový standard velikosti byl použit 180kDa proteinový žebříček (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific).

K detekci rekombinantního proteinu byl využit Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit (Bio Rad). Přenos proteinů z gelu na PVDF membránu (Trans-Blot Turbo Transfer System, Bio Rad) byl nastaven na 7 minut při 100 V. Blokace nespecifických míst probíhala 60 minut v 3% odtučněném mléce (Bohemilk) rozpuštěném v 1xPBST (1xPBS s 0,05 % Tweenu). Dále se membrána přes noc inkubovala v primární myší anti-His protilátce (ředění 1:2000, Monoclonal Anti-polyHistidine, Sigma-Aldrich, katalogové číslo H1029) a druhý den byla membrána 10 minut promývána v 1xPBST. Po promytí byly přidány proti-myší sekundární protilátky značené peroxidázou (ředění 1:20000, Sigma-Aldrich, katalogové číslo A5278). Nakonec byla membrána 5 min inkubována se substrátem Luminata Classico (Western HRP Substrate, Milipore) a signál detekován pomocí přístroje ChemiDoc (Bio-Rad).

3.4 Biochemická esej

3.4.1 Zpracování snůšek pro biochemickou esej

Vajíčka byla rozbita sterilním plastovým tloučkem v 0,05M PBS o pH = 7,4 (Gomori, 1955) a sonikována (UP200S Ultrasonic Processor, Hielscher) v přítomnosti 1 % TRITON-X (Rohm and Haas). Lyzát byl stočen při 8300 g/15 min/4 °C (Multifuge X3R Centrifuge, Thermo scientific). Supernatant byl následně odebrán a část jej byla použita přímo k enzymatické esej, část jej byla před využitím v esej dialyzována dvě hodiny proti 0,05M PBS (Gomori, 1955) v 3,5kDa dialyzačním strívku VISKING® (Serva).

3.4.2 Biochemická esej

K detekci glyoxylátu ve vzorku byla použita biochemická esej dle (Kornberg, 1965). 2 ml substrátu k detekci isocitrát lyázy obsahovaly 50 μ l 1M imidazolu (Sigma-Aldrich), 10 μ l 1M $MgCl_2$ (Lach:ner), 20 μ l 0,1M EDTA (Amresco), 800 μ l 10mM phenylhydrazinu-HCl (Sigma-Aldrich), 100 μ l 1mM isocitrátu (DL-isocitric acid trisodium salt hydrate, Sigma-Aldrich) a 1020 μ l 0,05M PBS (Gomori, 1955), příprava roztoků je uvedena v tabulce X. Vlastní detekce probíhala v 96-jamkové destičce Costar (Corning), vzorky byly pipetovány v triplikátech. Destička byla pipetována na ledě a ke 150 μ l substrátu bylo přidáno 50 μ l naředěného lyzátu. Lyzát byl ředěn 0,05M PBS tak, aby se koncentrace proteinu rovnala hodnotě 5 ng/ μ l (A280). Aktivita isocitrát lyázy byla blokována pomocí 0,5M itakonátu (itaconic acid, Sigma-Aldrich) v množství 1,88 μ l/jamka. Jako pozitivní kontrola byla využita aktivita rekombinantního proteinu isocitrát lyázy *E. coli* (koncentrace proteinu byla 2,5 ng/ μ l při A280), jako negativní kontrola byl užit 0,05M PBS a substrát bez přidaného isocitrátu (namísto isocitrátu byl přidán 0,05M PBS). Absorbance při 324 nm byla měřena pomocí multifunkčního modulárního readeru Tecan (Tecan infinite 200 Pro) při teplotě 25 °C. Výsledky byly vyneseny do grafu v programu GraphPad Prism 6.

Tabulka X: Příprava roztoků užitých v biochemické eseji k detekci isocitrát lyázy.

Roztok	Ředění
10mM phenylhydrazine-HCl (Sigma-Aldrich)	1,446 g + 10 ml dH ₂ O
1M MgCl ₂ (Lach:ner)	952 mg + 10 ml dH ₂ O
1mM isocitrát (DL-isocitric acid trisodium salt hydrate, Sigma-Aldrich)	2,581 mg + 10 ml dH ₂ O
0,1M EDTA (pH = 8) (Amresco)	372 mg + 10 ml dH ₂ O
1M imidazol (pH = 6,8) (Sigma-Aldrich)	688 mg + 10 ml dH ₂ O
0,5M itakonát (itaconic acid, Sigma-Aldrich)	10,4 mg + 160 μ l dH ₂ O
0,05M PBS (pH = 7,4, vše Lach:ner) příprava dle (Gomori, 1955)	A = 27,8 g NaH ₂ PO ₄ v 1 l dH ₂ O B = 71,7 g Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O v 1 l dH ₂ O výsledný pufr (400 ml) = 19 ml A + 81 ml B + 300 ml dH ₂ O

3.5 Krmení samic na umělých membránách

Ke kontrole účinku itakonátu (Sigma-Aldrich), využívaného v předchozí biochemické esaji jako inhibitoru isocitrát lyázy, na sání klíšťat, jejich přežívání a kladení, bylo využito krmení klíšťat v krmítku na umělých membránách a hovězí krvi. Kravská krev pocházela z místních jatek (Jihočeská masna s.r.o.), ručně byl vymíchán fibrin a nadále byla skladována při 4 °C. 3,1 ml krve s přídavkem 31 µl ATP (10mM, FLUKA), 3,1 µl gentamicinu (5 µg/ml, Sigma-Aldrich), 6,2 µl nystatinu (1mM, Sigma-Aldrich) a 31 µl itakonátu o různých koncentracích (Sigma-Aldrich). 0,5M roztok itakonátu byl připraven smícháním 10,3 mg itakonátu (Sigma-Aldrich) se 160 µl 0,05M PBS. Roztok byl pak naředěn desítkovou ředící řadou až po koncentraci 50 µM. Krmení probíhalo v šesti-jamkové makrotitrační destičce, do každého krmítka bylo umístěno 15 samic.

Samotné krmítko sestávalo z válcovité plastové části a silikonové membrány (Perner et al., 2016; Fourie et al., 2019). Krmítka byla umístěna do vodní lázně o teplotě 37 °C a krev měněna každých 12 hodin. Čtvrtý den od začátku sání byli přidáni samci za účelem oplodnění samic potřebného k jejich plnému dosátí. Dospělé samice *I. ricinus* byly krmeny do plného nasání, zváženy a umístěny do podmínek vhodných pro kladení. Bylo sledováno přežívání, kladení a líhnutí larev. Veškerá statistika a grafy byly zpracovány programem GraphPad Prism 6.

4 Výsledky

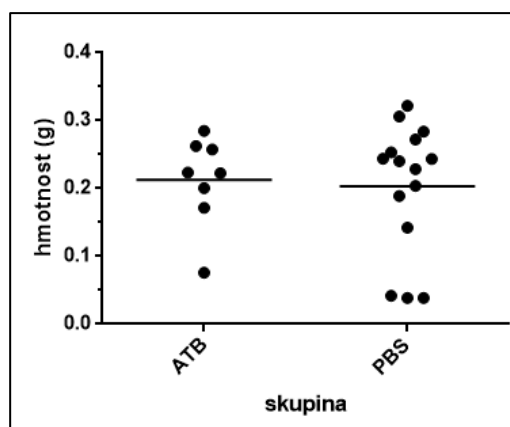
4.1 Identifikace a kvantifikace bakterií ve vajíčkách klíštěte *Ixodes ricinus*

4.1.1 Vliv antibiotik na sání a kladení samic

V mé bakalářské práci jsem se snažila detekovat glyoxylátový cyklus ve vyvíjejících se klíštěcích embryích. Protože tento cyklus je aktivní také v bakteriích, pokusila jsem se připravit klíšťata a jejich snůšky bez symbiotických nebo kontaminativních bakterií. Jedna skupina o 15 samicích byla injikována směsí antibiotik rozpuštěných v ethanolu a druhá, kontrolní skupina (taktéž o 15 samicích), byla injikována 1xPBS smíchaným s ethanolem. Bylo sledováno sání a přežívání samic. Ve skupině ošetřené antibiotiky se nasálo 8 z 15 samic a kladlo 6 samic, v kontrolní skupině se nasálo všech 15 z 15, kladlo 10 samic. Rozdíl v hmotnostech nasátých samic obou skupin je naznačen na obrázku 4.

Data byla otestována v programu GraphPad Prism 6 na normalitu dat pomocí D'Agostino & Pearson omnibus normality test, pomocí F testu byla otestována homogenita variancí, která vyšla nesignifikantní na hladině významnosti $p < 0,05$ ($F = 2,099$, $p\text{-value} = 0,3278$). Data pak byla analyzována pomocí nepárového t-testu (hodnota testové statistiky $t = 0,02437$, $p = 0,8098$, $df = 21$). Hodnota p vyšla větší než 0,05, váhy se tudíž statisticky neliší. Průměry hmotností u skupin s hodnotou SEM (střední chyba průměru, uvedeno v závorce) byly rovny u skupiny ošetřené antibiotiky 0,2124 g ($\pm 0,02333$), u kontrolní skupiny 0,2031 g ($\pm 0,02468$).

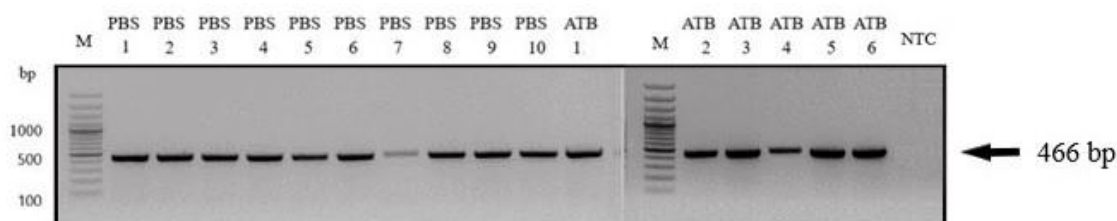
Je patrné, že ošetření klíšťat mělo vliv na sání klíšťat, avšak nikoliv na jejich hmotnost po sání, což korelovalo s dříve publikovaným článkem (Ninio et al., 2015). Obě dvě skupiny samic byly schopny klást vejce, které jsme mohli použít ke kvantifikaci a identifikaci bakterií.



Obrázek 4: Grafické porovnání hmotností plně nasátých samic. Jeden bod znázorňuje jednu samici. Váhy nasátých samic se statisticky neliší dle skupiny. Na obrázku je naznačen průměr, u skupiny ošetřené antibiotiky $0,2124 \text{ g} \pm 0,02333$ (SEM, střední chyba průměru), u kontrolní skupiny $0,2031 \text{ g} \pm 0,02468$ (SEM). ATB značí skupinu samic ošetřených antibiotiky, PBS kontrolní skupinu. Data byla analyzována pomocí nepárového t-testu v programu GraphPad Prism 6.

4.1.2 Amplifikace bakteriální 16S rRNA pomocí PCR, sekvenace a qRT-PCR pro kvantifikaci bakterií

Pro ověření úspěšnosti zbavení se bakteriálních symbiontů a kontaminantů byla ze vzorků vajíček izolována DNA, pomocí PCR reakce amplifikována 16S rRNA ve vzorcích a pro zviditelnění vzorky nanoseny na 1% agarózový gel. Byla detekována přítomnost bakterií ve všech vzorcích klíštěcích snůšek (obrázek 5).



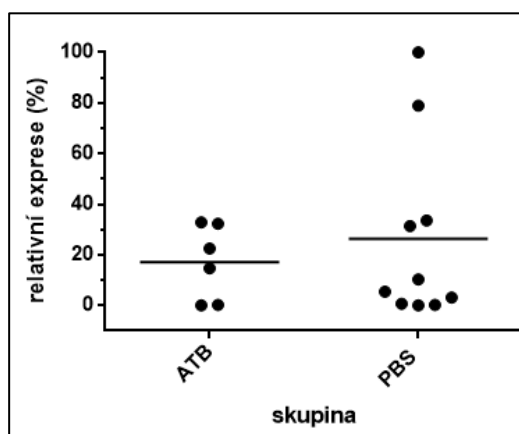
Obrázek 5: Amplifikace 16S rRNA bakterií ve vzorcích DNA. Jako templát sloužila DNA vyizolovaná ze vzorků snůšek antibiotiky ošetřených a neošetřených samic. Výsledný produkt má 466 bp. Ve všech vzorcích byla identifikována přítomnost bakterií. Jako negativní kontrola (NTC) byla použita sterilní destilovaná voda. M = velikostní marker 100bp (Thermo Scientific).

Pro druhovou identifikaci bakterií potvrzených ve vzorcích pomocí PCR metody byly amplikony o požadované velikosti 466 bp vyříznuty z gelu, vyčištěny a poslány na sekvenaci do firmy SEQme. Získaná data byla analyzována v online databázi BLAST (NCBI). Ukázalo se, že snůšky obsahují dva druhy endosymbiotických bakterií řadících se do kmene Proteobacteria, třídy Alphaproteobacteria, řádu Rickettsiales do skupiny Midichloriaceae. A to bakterii *Midichloria mitochondrii* (Sassera et al., 2006) a bakterii *Nicolleia massiliensis* (Tveten and Sjøstad, 2011). V případě *Midichloria mitochondrii* se jedná o gram-negativní (G-) bakterie, tvaru tyčky (bacillus-shaped, (Lewis, 1979; Beninati et al., 2004)). O endosymbiotické bakterii *Nicolleia massiliensis* toho kromě jejího zařazení zatím není více známo. V tabulce XI jsou uvedeny vzorky a výpis jejich bakteriálních symbiontů.

PBS	Druh	ATB	Druh
1	<i>Midichloria mitochondrii</i>	1	<i>Midichloria mitochondrii</i>
2	<i>Midichloria mitochondrii</i> <i>Nicolleia massiliensis</i>	2	<i>Midichloria mitochondrii</i>
3	<i>Midichloria mitochondrii</i> <i>Nicolleia massiliensis</i>	3	<i>Midichloria mitochondrii</i>
4	<i>Midichloria mitochondrii</i> <i>Nicolleia massiliensis</i>	4	<i>Midichloria mitochondrii</i>
5	<i>Midichloria mitochondrii</i> <i>Nicolleia massiliensis</i>	5	<i>Midichloria mitochondrii</i>
6	<i>Midichloria mitochondrii</i> <i>Nicolleia massiliensis</i>	6	<i>Midichloria mitochondrii</i>
7	<i>Midichloria mitochondrii</i> <i>Nicolleia massiliensis</i>		
8	<i>Midichloria mitochondrii</i> <i>Nicolleia massiliensis</i>		
9	<i>Midichloria mitochondrii</i>		
10	<i>Midichloria mitochondrii</i> <i>Nicolleia massiliensis</i>		

Tabulka XI: Druhy bakterií přítomné ve snůškách. Skupina ošetřená antibiotiky obsahovala výhradně endosymbiotickou bakterii *Midichloria mitochondrii*, v kontrolní skupině byl navíc nalezen genom *Nicolleia massiliensis*. Data o druzích bakterií byla získána sekvenací vyizolované DNA ze vzorků snůšek samic treatovaných a netreatovaných antibiotiky, zpracování dat proběhlo v programu Chromas a získané sekvence byly analyzovány v online databázi BLAST. PBS značí kontrolní skupinu, ATB je skupina ošetřená antibiotiky.

Metodou qRT-PCR pak bylo zjištěno relativní množství bakterií ve vzorcích za účelem porovnání množství bakterií v jednotlivých snůškách standardizovaných na klíštěcí aktin. Ukázalo se, že samice ošetřené směsí antibiotik obsahovaly podobné množství bakterií jako kontrolní skupina (obrázek 6). Ve dvou vzorcích se našla stopová množství bakterií, v porovnání se vzorkem s největší expresí, měly tyto vzorky méně než 1 % 16S genomů. Relativní exprese byly vyhodnoceny pomocí neparametrického Mann-Whitney testu a nevykazovaly žádný signifikantní rozdíl při $p < 0,05$, hodnota p-value byla rovna 0,911. Průměrná hodnota exprese u skupiny ošetřené antibiotiky činila 17,10 % (hodnota SEM byla rovna 6,031), u kontrolní skupiny byl průměr 26,38 % (hodnota SEM byla 11,33).



Obrázek 6: Relativní kvantifikace 16S rRNA bakterií ve vzorcích. Každý bod znamená jeden vzorek. Vzorek obsahující největší počet bakterií byl označen jako 100 %, ostatní vzorky jsou vztaženy k této hodnotě. V grafu je vyznačen úsečkami průměr, který byl u skupiny ošetřené antibiotiky 17,10 % (SEM = 6,031) a u kontrolní skupiny 26,38 % (SEM = 11,33). Vyhodnocení proběhlo pomocí neparametrického Mann-Whitney testu, rozdíly v expresi byly vyhodnoceny jako nesignifikantní při $p < 0,05$, hodnota p-value byla rovna 0,911. PBS značí kontrolní skupinu, ATB je skupina ošetřená antibiotiky.

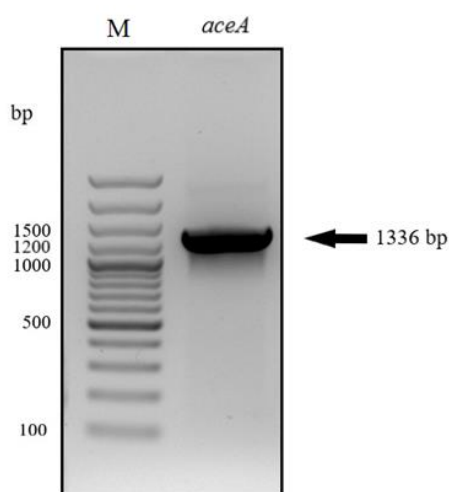
Po zjištění, že se skupina ošetřená antibiotiky a kontrolní skupina nelišily v počtu obsažených bakteriích a obě dvě skupiny obsahovaly symbionty, u kterých nebyla prokázána exprese isocitrát lyázy, mohly být snůšky využity k biochemickému testu. Nejprve však bylo nutné esej nastandardizovat a vytvořit pozitivní kontrolu, pomocí níž by bylo možné ověřit její funkčnost.

4.2 Příprava pozitivní kontroly pro biochemickou esej

4.2.1 Amplifikace genu *aceA* z genomu *Escherichia coli*

K ověření správnosti biochemického testu na ověření přítomnosti glyoxylátového cyklu bylo potřeba vytvořit pozitivní kontrolu, která by podala informaci o tom, jestli je mnou navržená biochemická esej funkční či nikoliv. Rozhodla jsem se pro izolaci genu *aceA* pro tvorbu isocitrát lyázy z bakterie *Escherichia coli* K-12.

Pomocí PCR reakce a gen specifických primerů se povedlo namnožit genovou sekvenci kódující gen *aceA* v bakterii *E. coli*. Gen *aceA* má 1305 bp, primery navíc obsahovaly nukleotidy potřebné pro ligaci do pASK vektoru, celková velikost je tedy 1336 bp. Amplifikace byla ověřena na 1% agarózovém gelu (obrázek 7). V dalším kroku byla amplifikovaná sekvence vyříznuta a vyčištěna z gelu a použita k ligaci do pASK vektoru.



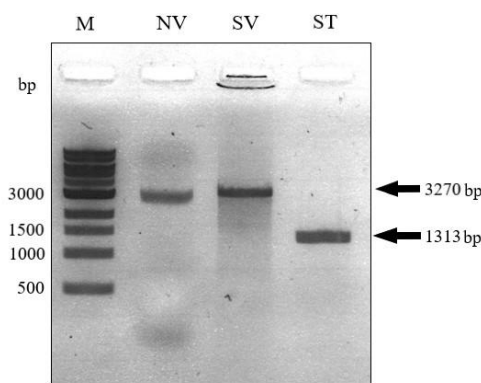
Obrázek 7: Amplifikovaný gen *aceA* o velikosti 1336 bp. *AceA* je namnožený úsek DNA obsahující sekvenci pro expresi isocitrát lyázy pocházející z genomu *Escherichia coli*. Gen má velikost 1305 bp, s naamplifikovanými konci řetězce obsahujícími sekvence pro klonování do pASK vektoru 1336 bp. M = 100bp marker (Thermo scientific).

4.2.2 Ligace a transformace do *E. coli* TOP10 buněk

Pro expresi rekombinantního proteinu bylo nezbytné amplifikovanou sekvenci zaligovat do pASK vektoru a transformovat do bakterií. Vektor pASK IBA 37 plus je bakteriální vektor velikosti 3,27 kbp s rezistencí na ampicilin a 6x His-tagem pro

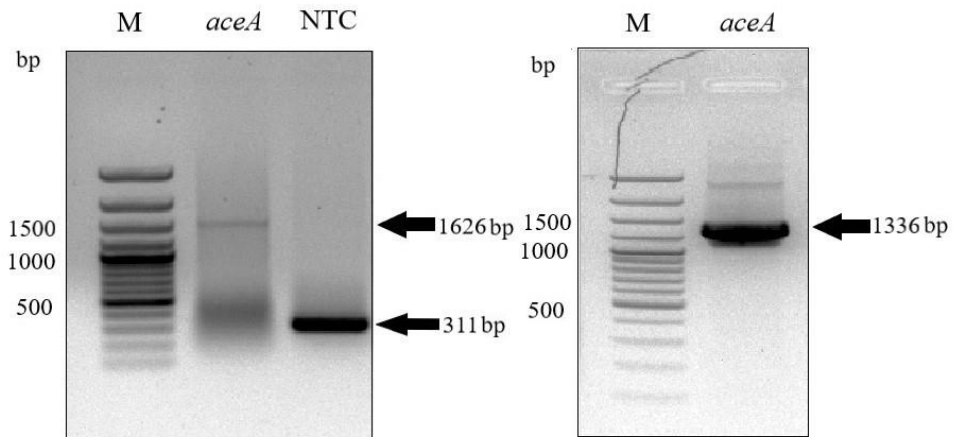
případné přečištění rekombinantního proteinu. Vektor je pod těsnou kontrolou tetracyklinového promotoru. Exprimovaný rekombinantní protein je pak lokalizován v cytoplasmě, exprese je indukována přidáním anhydrotetracyklinu (200 µg/l) a je možná v běžném kmenu *E. coli*.

Amplifikovaný templát byl vyčištěn a restrikcí enzymem BsaI byly štěpeny jeho konce. Stejně tak byly štěpeny i konce vektoru, úspěšnost restrikce byla ověřena na 1% agarózovém gelu, viz obrázek 8. Následně byly templát s vektorem ligovány.



Obrázek 8: Ověření restrikce vektoru a templátové DNA pomocí BsaI restriktázy na 1% agarózovém gelu. Střížený vektor byl velikosti 3270 bp, stejně tak jako nestřížený vektor. Střížený templát byl velikosti 1313 bp. NV = nestřížený vektor, SV = střížený vektor, ST = střížený templát. Jako marker (M) byl využit 1kb ladder (Biolabs).

Po ligaci byly plasmidy zatransformovány do TOP10 buněk. Byla získána pouze jedna kolonie. Transformace byla ověřena pomocí PCR metody za užití jak sekvenačních, tak specifických primerů. Výsledné produkty PCR reakce byly vyneseny na 1% agarózový gel. Očekávaný produkt měl 1626 bp v případě užití sekvenačních primerů a 1336 bp v případě specifických primerů (obrázek 9). Sekvenací plasmidu byla ověřena správnost klonování a po namnožení bakterií bylo možno přejít k expresi isocitrát lyázy.



Obrázek 9: Ověření transformace na 1% agarózovém gelu pomocí sekvenačních primerů (A) pro pASK vektor a specifických primerů (B) pro *aceA* gen. *AceA* značí úspěšnou ligaci a transformaci plasmidu (1626 bp při užití sekvenačních primerů a 1336 bp se specifickými primery), NTC je pro srovnání prázdný vektor (311 bp). M (marker) je 100bp ladder (Thermoscientific).

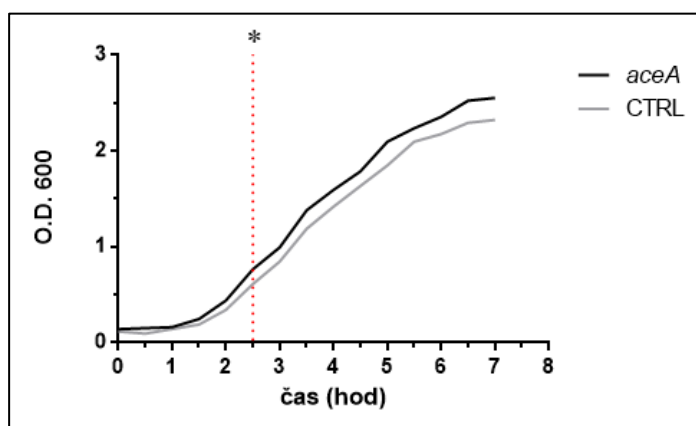
4.2.3 Exprese rekombinantního proteinu pomocí anhydrotetracyklinu

Finálním krokem k vytvoření rekombinantní isocitrát lyázy pro použití v biochemickém testu byla exprese funkčního enzymu. Namnožené TOP10 buňky se zatransformovaným plazmidem byly přes noc namnoženy, 5 ml narostlých buněk bylo přepipetováno do čerstvého LB média a každou půlhodinu byla měřena optická densita (při 600 nm). Naměřené hodnoty jsou v tabulce XII.

Při hodnotě O.D. 0,8 byl k bakteriální kultuře přidán anhydrotetracyklin sloužící ke stimulaci exprese isocitrát lyázy z pASK vektoru. Protože úspěšnost transformace plasmidu byla nízká (nemožnost zaklonovat do pET 100 vektoru (Invitrogen)) a obávala jsme se toxicity exprimovaného proteinu, byla sledována křivka růstu bakterií v porovnání s expresí kontrolního netoxického enzymu prolidázy (ID genu 948335), viz obrázek 10. Po 7 hodinách od začátku exprese se buňky dostaly do stacionární fáze, byly stočeny a použity k ověření exprese isocitrát lyázy do cytoplasmy buněk pomocí SDS-PAGE a western blot metody. Po přidání anhydrotetracyklinu nebyl viditelný žádný toxický vliv exprese isocitrát lyázy na růst bakterií, proto jsem se rozhodla správnost exprese ověřit pomocí SDS-PAGE a western blot metod.

Tabulka XII: Hodnoty O.D. bakteriální kultury s transformovaným plasmidem s *aceA* genem pro tvorbu isocitrát lyázy a kontrolní kultury, která nesla genetickou informaci kódující enzym prolidázu (EC 3.4.13.9) ligovanou v pASK vektoru. V čase 2,5 hodiny (po změření O.D.) byla stimulována exprese proteinů přidáním anhydrotetracyklinu a sledován vliv na růst buněk.

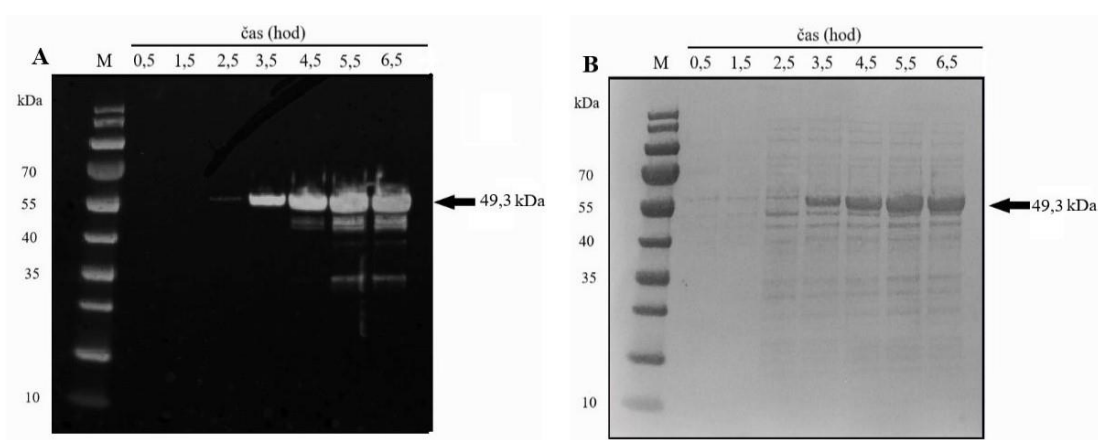
čas (hod)	O.D. <i>aceA</i>	O.D. CTRL	čas (hod)	O.D. <i>aceA</i>	O.D. CTRL
0	0,142	0,115	4	1,593	1,418
0,5	0,15	0,095	4,5	1,787	1,633
1	0,161	0,142	5	2,097	1,849
1,5	0,247	0,19	5,5	2,236	2,096
2	0,44	0,341	6	2,356	2,176
2,5	0,766	0,612	6,5	2,523	2,294
3	0,994	0,846	7	2,553	2,323
3,5	1,382	1,188			



Obrázek 10: Křivka nárůstu optické density bakteriálních kultur v čase. Hvězdička (*) značí přidání anhydrotetracyklinu v čase 2,5 hodiny od počátku k indukci exprese proteinů. Dle obrázku je zřejmé, že exprimovaná isocitrát lyáza nemá vliv na růst kultury. *AceA* = křivka znázorňující růst O.D. kultury, která nese gen pro expresi isocitrát lyázy. CTRL = křivka znázorňující růst bakteriální kultury obsahující gen kódující enzym prolidázu (EC = 3.4.13.9). Tečkované čáry symbolizují optickou densitu v čase přidání anhydrotetracyklinu ke kultuře. O.D. 600 = optická densita.

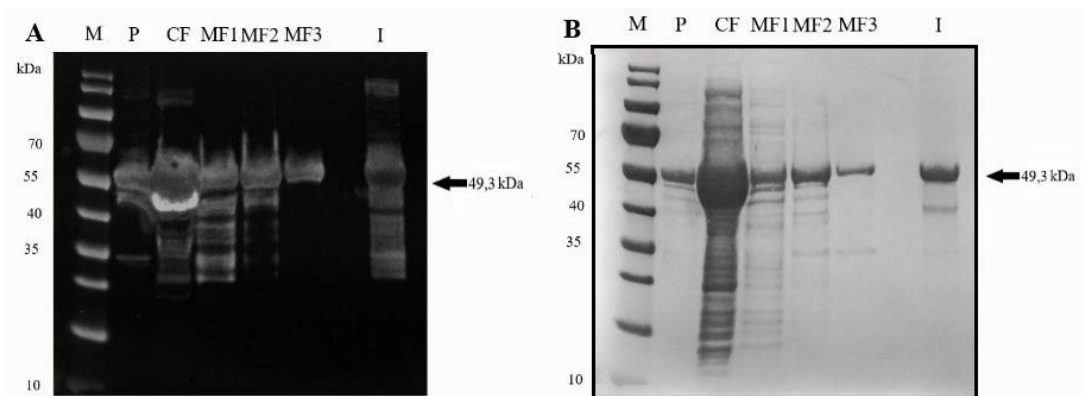
4.2.4 Ověření exprese rekombinantu *aceA*

Pro ověření správnosti exprese byly pelety bakterií odebírané v jednotlivých timepointech analyzovány pomocí metody SDS-PAGE a western blotu za použití protilátky proti His-tagu. Pomocí těchto metod jsem ověřila indukcii exprese rekombinantu po přidání anhydrotetracyklinu. Pro zajištění správné exprese rekombinantu výrobce doporučuje přidání anhydrotetracyklinu mezi O.D. 0,6 a 0,8. Po přidání anhydrotetracyklinu je vidět růst exprese proteinu v požadované velikosti 49,3 kDa. Velikost mnou exprimovaného proteinu byla zjištěna programem EditSeq (DNASTAR). Protilátka proti His-tagu detekovala nárůst exprese *aceA* po stimulaci.



Obrázek 11: Expese rekombinantního proteinu isocitrát lyázy v čase. A) Western blot detekující proteiny obsahující His-tag (zviditelněno pomocí fluorescence v přístroji Chemidoc (BioRad)). B) SDS-PAGE přeblovaný na PVDF membránu barvenou Coomassie brilliant blue. Čísla v záhlaví značí čas v hodinách od počátku inkubace. V čase 2,5 hodiny byl přidán anhydrotetracyklin k expresi. Jako proteinový standard (M) byl využit PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

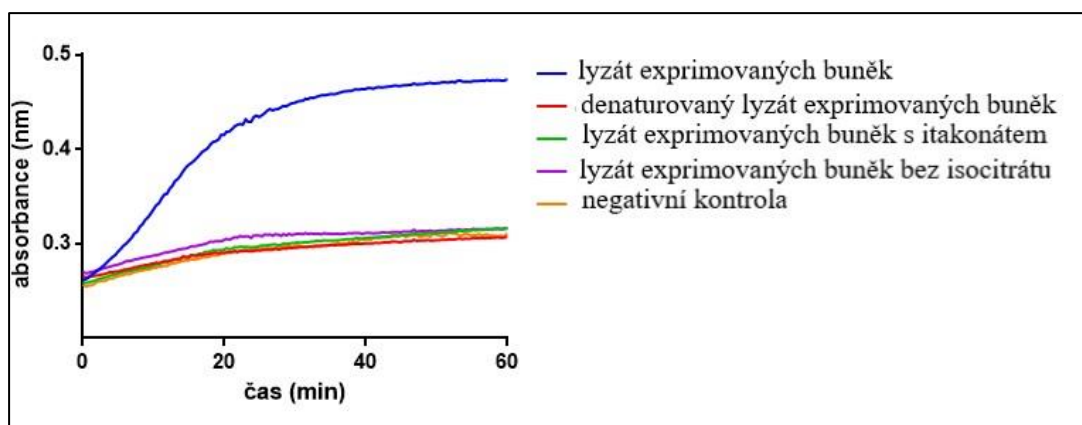
Abych zjistila, zda se můj rekombinantní protein exprimuje do cytoplasmy bakterií, do jejich membrán, nebo je precipitován do inkluzních tělísek, odizolovala jsem jednotlivé frakce, analyzovala je na SDS-PAGE a proteiny obsahující His-tag detekovala western blot analýzou. Molekulová hmotnost isocitrát lyázy bakterie *E. coli* je 48 kDa, rekombinantní isocitrát lyázy 49,3 kDa. Zjistila jsem, že se náš protein se nachází převážně v cytoplasmě bakterií. Malé množství proteinu bylo nalezeno i v ostatních buněčných frakcích (obrázek 12).



Obrázek 12: Detekce rekombinantního proteinu isocitrát lyázy v jednotlivých bakteriálních frakcích. A) Western blot detekující proteiny obsahující His-tag (zviditelněno pomocí fluorescence v přístroji Chemidoc (BioRad)). B) SDS-PAGE přebílený na PVDF membránu barvenou Coomassie brilliant blue. Z obrázku je zřejmé, že se mnou exprimovaný protein nachází v cytoplasmě (CF), méně pak i v ostatních buněčných frakcích. P = výchozí bakteriální pelet, CF = cytoplasmatická frakce, MF1-3 = membránové frakce, I = inkluzní tělíska. Jako proteinový standard byl využit PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

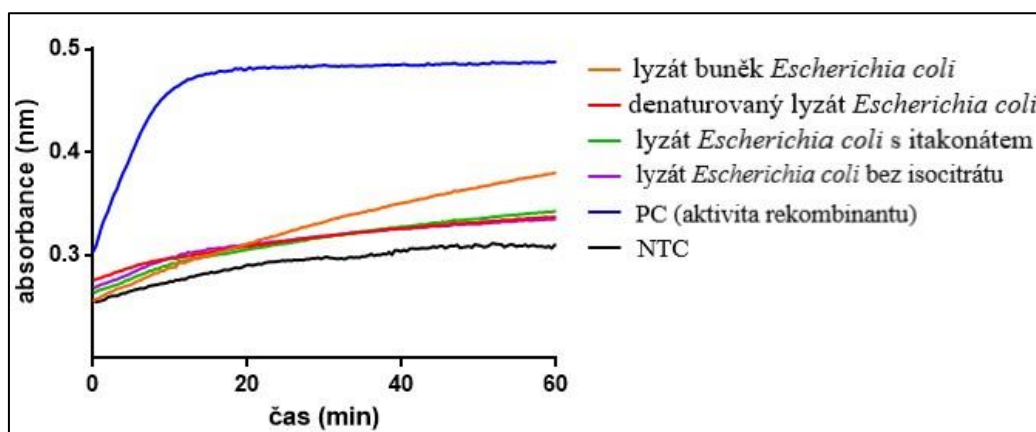
4.3 Ověření aktivity rekombinantního proteinu pomocí biochemické eseje

Protože v cytoplasmě bakterií se rekombinantní proteiny nachází v rozpuštěné formě, pro biochemickou analýzu byla použita tato frakce. Abych zjistila, zda je tento protein aktivní, otestovala jsem aktivitu cytoplasmatické frakce bakterií obsahující tento protein v biochemické eseji detekující přítomnost a vznik glyoxylátu (produkt isocitrát lyázy). K reakční směsi bylo bezprostředně před měřením přidáno 50 μ l lyzátu rozsonikovaných a stočených bakteriálních peletů buněk bakterií, které byly předtím exprimovány. K ověření specificity isocitrát lyázy bylo využito inhibice enzymu jeho specifickým inhibitorem itakonátem, inkubace bez přidaného substrátu (isocitrát) a denaturace rekombinantu teplem. Absorbance byly měřeny v čase při 324 nm a teplotě 25 $^{\circ}$ C. Ihned ze začátku reakce byl měřen nárůst produkce glyoxylátu (obrázek 13). Tato reakce byla inhibována itakonátem a denaturací rekombinantu teplem. Samotný lyzát netransformovaných *E. coli* má také detekovatelnou aktivitu isocitrát lyázy, ale nesrovnatelně nižší v porovnání s klonem exprimujícím rekombinantní enzym (obrázek 14). Můžu tedy konstatovat, že se mi podařilo vyexprimovat rekombinantní funkční enzym isocitrát lyázu z *E. coli*, který může dále sloužit jako pozitivní kontrola v mých biochemických esejích.



Obrázek 13: Ověření aktivity rekombinantní isocitrát lyázy pomocí biochemického testu.

V grafu je patrná produkce glyoxylátu, která je zviditelňována reakcí s phenylhydrazinem při 324 nm a teplotě 25 °C. Z grafu je patrný nárůst absorbance při reakci phenylhydrazinu s lyzátem exprimovaných buněk a naopak stagnace signálu při denaturaci lyzátu, přidání itakonátu do eseje a při reakci bez přidaného substrátu (isocitrátu). Jako NTC (negativní kontrola) byl použit 0,05M PBS. Aktivita byla stanovena jako nárůst absorbance při 324 nm v čase. Grafické znázornění je průměrem triplikátů.

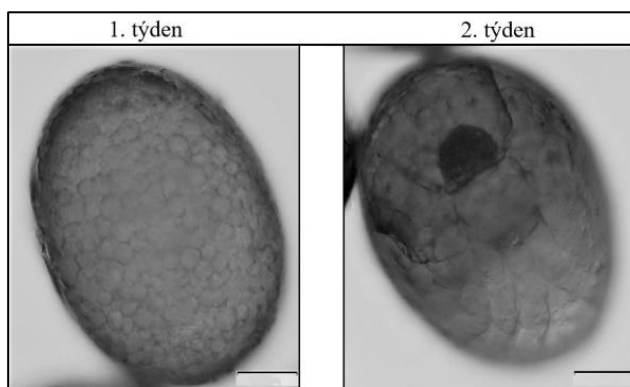


Obrázek 14: Detekce aktivity isocitrát lyázy u bakterie *E. coli* K-12. K porovnání byla využita aktivita rekombinantní isocitrát lyázy, aktivita byla inhibována itakonátem, denaturací lyzátu teplem a nepřidáním isocitrátu do biochemického testu. Z grafů je patrné, že i netransformovaná *E. coli* má aktivitu isocitrát lyázy, která je však nesrovnatelně nižší, než v případě transformovaných buněk. PC = aktivita rekombinantního proteinu, NTC = 0,05M PBS. Absorbance byly měřeny v triplikátech, graf je jejich průměrem.

4.4 Detekce isocitrát lyázy biochemickým testem ve vajíčkách klíštěte

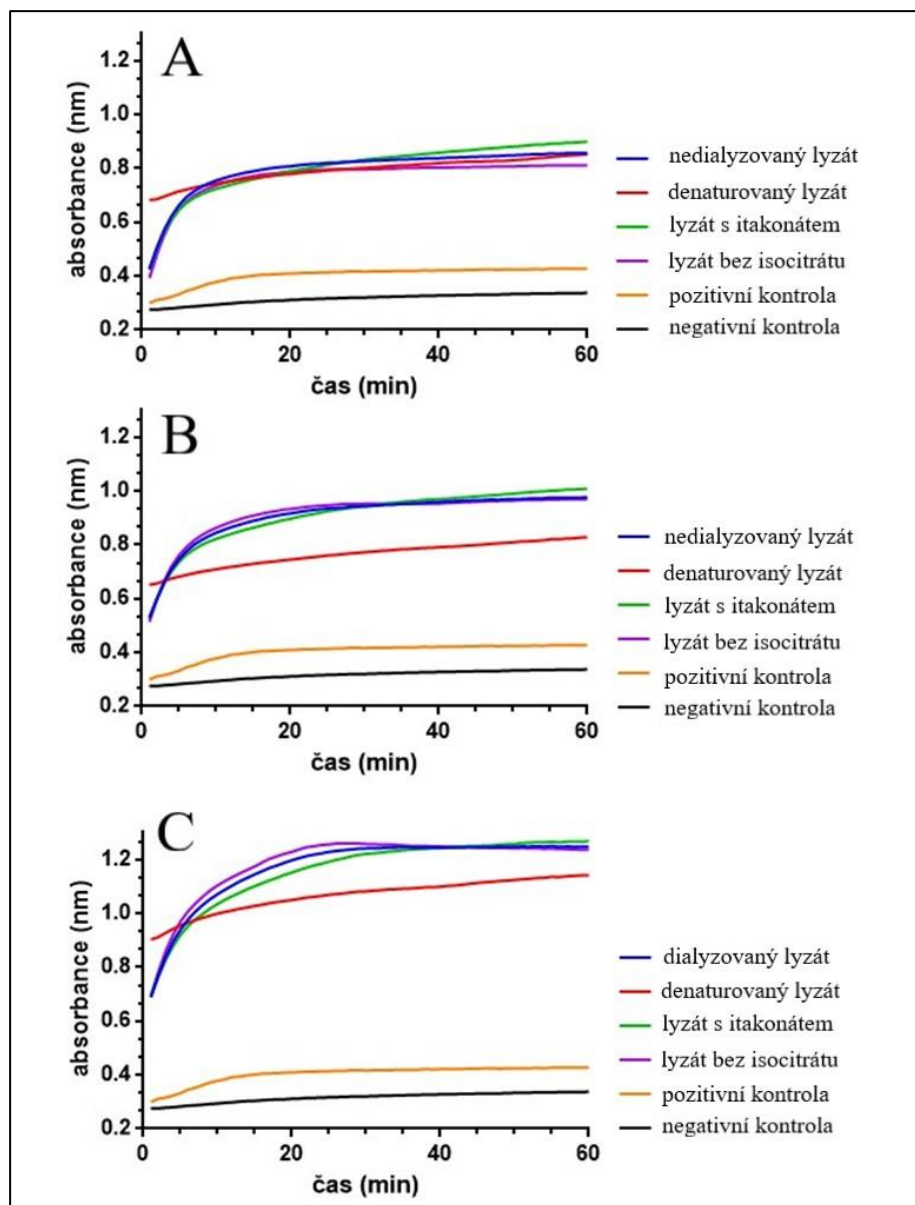
Ixodes ricinus

S optimalizovaným biochemickým testem jsem mohla přistoupit k vlastní detekci isocitrát lyázy ve dvoutýdenních vajíčkách klíštěte *Ixodes ricinus* (vajíčka s vyvíjejícími se embryi, viz obrázek 15). Tři vzorky vajíček byly rozbity sterilním plastovým tloučkem, stočeny a lyzát byl rozsonikován a použit ve stejné enzymatické esaji jako rekombinantní protein isocitrát lyáza. Jeden vzorek byl navíc tři hodiny dialyzován, kvůli odfiltrování endogenního isocitrátu a hemu, popřípadě jiných malých molekul reagujících s phenylhydrazinem.



Obrázek 15: Vajíčko klíštěte *I. ricinus* na začátku vývoje a v druhém týdnu vývoje. Měřítko v obrázcích znázorňuje 100 μm .

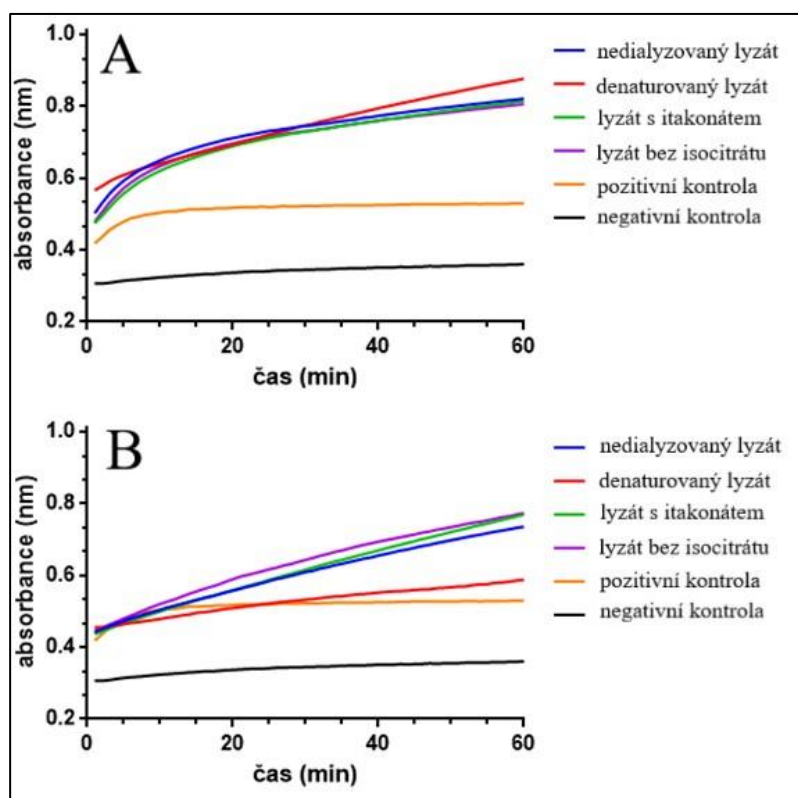
Lyzát i dialyzovaný lyzát vykazovaly aktivitu, nárůst absorbance byl ovšem patrný jak v esaji s isocitrátem a bez inhibitoru, tak v esajích s itakonátem a bez isocitrátu. Teplem inhibovaný lyzát nevykazoval nárůst aktivity, nicméně vykazoval poměrně vysoké hladiny absorbance (obrázek 16). Vzhledem k tomu, že enzymatická aktivita nebyla inhibována itakonátem, ani nepřítomností substrátu (isocitrátu), nebyla aktivita pravděpodobně způsobena enzymatickým rozkladem isocitrátu pomocí isocitrát lyázy na glyoxylát a sukcinát, nýbrž došlo k zaznamenání aktivity v důsledku jiného biochemického procesu.



Obrázek 16: Detekce glyoxylátu ve vajíčkách *Ixodes ricinus*. V případech A a B byl užit nedialyzovaný lyzát vajíček, v případě C byl lyzát před biochemickou esejí dialyzován tři hodiny proti 0,05M PBS (denaturace teplem byla provedena až po dialýze). Z grafů je patrné, že v nedialyzovaných i dialyzovaném vzorku je viditelná aktivita, a to i za inhibice itakonátem a bez přidaného isocitrátu k reakci. Jako pozitivní kontrola byla využita aktivita rekombinantu isocitrát lyázy, která je v porovnání s aktivitou nalezenou ve vzorcích nízká pravděpodobně kvůli vyšší absorbanci lyzátů (obsah proteinu 5 ng/μl, A280). Pozitivní kontrola obsahovala 2,5 ng/μl (A280). Negativní kontrolu představoval 0,05M PBS. Vzorky byly měřeny v triplikátech, grafické vyobrazení je jejich průměrem.

4.5 Detekce isocitrát lyázy biochemickým testem u jiných druhů klíšťat

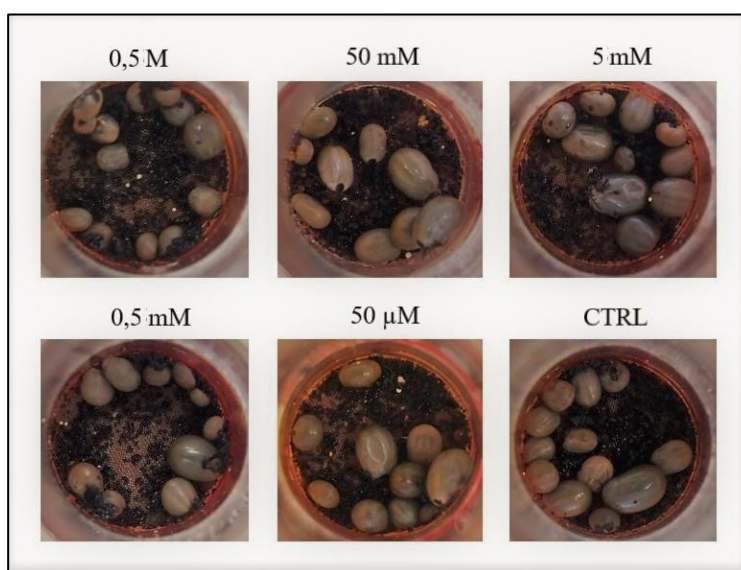
Vajíčka dvou druhů klíšťat, *Amblyomma americanum* a *Dermacentor reticulatus* byla získána z chovu Akademie věd a použita k enzymatické eseji. Byla zpracována stejným způsobem jako vajíčka *Ixodes ricinus*. Vajíčka byla odebírána v čase vývoje, který mikroskopicky odpovídal druhému týdnu vývoje klíšťat. Po rozbití plastovým tloučkem, stočení a sonikaci byly lyzáty po naředění na koncentraci proteinu 5 ng/ μ l přidány do enzymatické eseje. Stejně jako u *Ixodes ricinus*, i zde je patrná aktivita, ale je srovnatelná s aktivitou po inhibici itakonátem a v reakci bez přidaného isocitrátu. Lze tedy usuzovat, že ani v těchto dvou případech nebyla měřena aktivita isocitrát lyázy.



Obrázek 17: Výsledky biochemického testu u klíšťat *Amblyomma americanum* (A) a *Dermacentor reticulatus* (B). Měřená aktivita je nespecifická, není inhibována ani přidáním itakonátu, ani nepřítomností substrátu (isocitrát). Z toho lze soudit, že ani v těchto 2 případech se nejedná o aktivitu enzymu glyoxylátového cyklu, isocitrát lyázy. Jako pozitivní kontrola byla využita aktivita rekombinantu isocitrát lyázy, jako negativní kontrola 0,05M PBS. **A:** *Amblyomma americanum*, **B:** *Dermacentor reticulatus*.

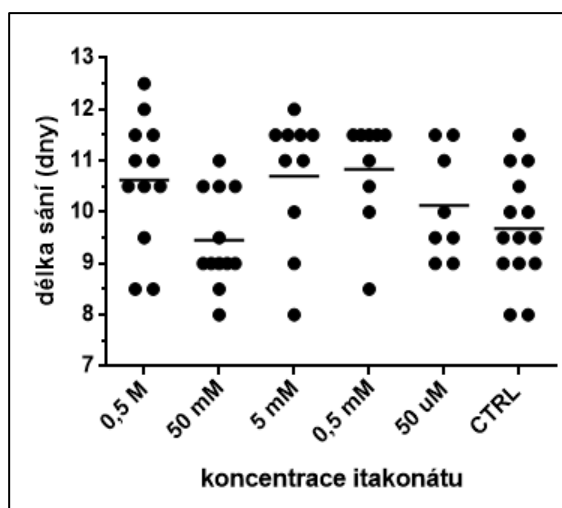
4.6 Test inhibitoru na krmítku

I když se mi biochemickým testem u klíšťat nepodařilo detekovat přítomnost glyoxylátové dráhy, přesto jsem přistoupila k finálnímu in-vivo experimentu. Byl testován vliv itakonátu na sání, kladení a líhnutí larev. Očekávala jsem, že itakonát, jakožto inhibitor isocitrát lyázy a zároveň sukcinát dehydrogenázy bude mít negativní dopad na reprodukci klíšťat. Na obrázku 18 jsou vidět samice 6. den od počátku sání. V průběhu experimentu jsem nepozorovala žádný rozdíl ve velikostech ani počtu samic sajících na membráně.



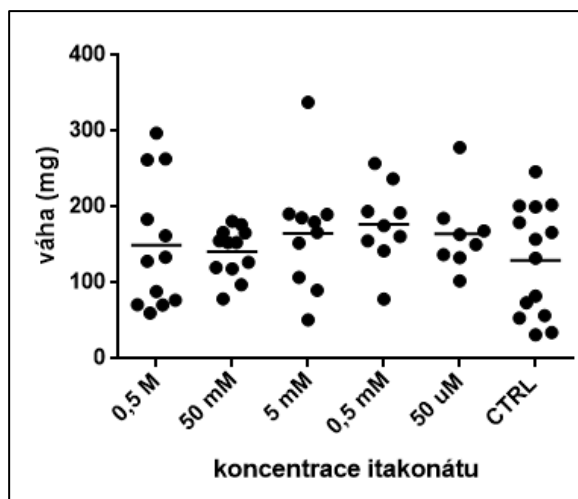
Obrázek 18: Krmení klíšťat přes umělou membránu na krvi suplementované itakonátem o různých koncentracích.

Doba sání byla zaznamenávána a je graficky znázorněna na obrázku 19. Data nepocházela z normální distribuce, byla proto otestována pomocí neparametrického Mann-Whitney testu, vždy ve dvojici skupina ošetřená – kontrola. Ukázalo se, že koncentrace 0,5 M, 50 mM a 50 μM se na hladině $p < 0,05$ nelišily od kontrolní skupiny v délce sání, skupiny 5mM a 0,5mM sály déle než kontrola. Hodnoty p – value byly pro 0,5 M ($p = 0,0558$), 50 mM ($p = 0,4943$), 5 mM ($p = 0,0353$), 0,5 mM ($p = 0,0141$) a 50 μM ($p = 0,4266$).



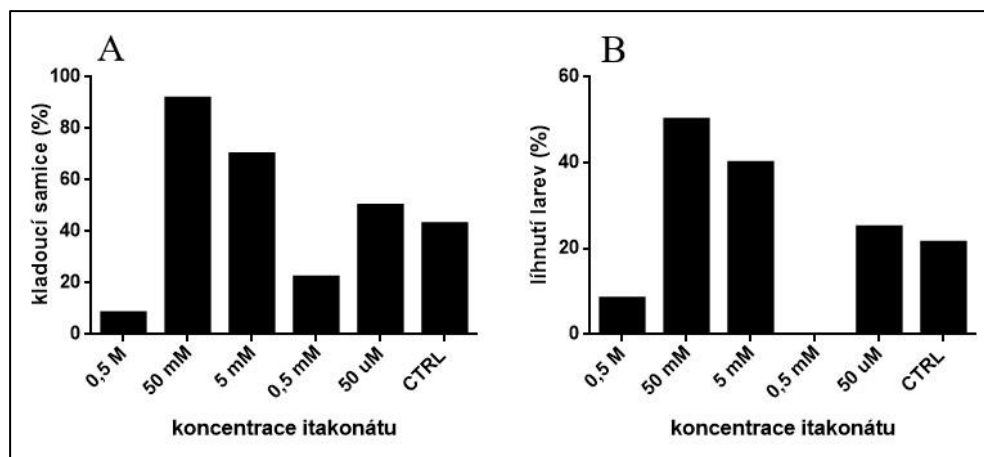
Obrázek 19: Doba sání samic v jednotlivých skupinách. Jeden bod znázorňuje jednu samici. V grafu je naznačen průměr v jednotlivých skupinách. Data byla otestována pomocí neparametrického Mann-Whitney testu, kdy se ukázalo, že skupiny s 0,5mM a 50μM koncentrací itakonátu se lišily v délce sání od kontrolní skupiny.

Po nasátí byly samice zváženy a jejich váhy statisticky otestovány pomocí Mann-Whitney testu, vždy byla porovnávána skupina ošetřená itakonátem s kontrolou. Nebyl prokázán vliv itakonátu na váhu samic po dosátí na hladině $p < 0,05$ (obrázek 20). Hodnoty p – value byly následující: $p = 0,5541$ (0,5 M), $p = 0,9694$ (50 mM), $p = 0,4677$ (5 mM), $p = 0,2235$ (0,5 mM), $p = 0,4390$ (50μM). Průměry vah jednotlivých skupin se standardní chybou průměru uvedenou v závorce byly od nejvyšší koncentrace itakonátu po kontrolní skupinu následující: 149,9 mg (24,44), 141,2 mg (9,363), 165,3 mg (24,51), 177,1 mg (17,57), 164,9 mg (18,54) a 130 mg (19,46).



Obrázek 20: Vliv itakonátu na sání samic. Jedna tečka znázorňuje 1 samici. Na obrázku je znázorněn průměr. Nebyl zjištěn žádný vliv itakonátu na sání samic (statisticky ověřeno pomocí Mann-Whitney testu, vždy porovnávána ošetřená skupina s kontrolou).

Dále bylo sledováno kladení vajíček nasátých samic. Samice ošetřené nejvyšším množstvím itakonátu s výjimkou jedné nekladly, samice ošetřené druhou nejvyšší koncentrací kladly s výjimkou jedné všechny. Samic s nulovým obsahem itakonátu v potravě kladla téměř polovina. Počet kladoucích samic/počet nasátých samic byl následovný: 1/12 (0,5 M), 11/12 (50 mM), 7/10 (5 mM), 2/9 (0,5 mM), 4/8 (50 µM) a 6/14 (CTRL). Z výsledků nelze usoudit, zda měl itakonát vliv na kladení samic, bylo by vhodné pokus opakovat. Zároveň nelze ani posoudit vliv na líhnutí larev (obrázek 21). Počet líhnoucích se snůšek/počet nasátých samic byl u jednotlivých skupin následovný: 1/12 (0,5 M), 6/12 (50 mM), 4/10 (5 mM), 0/9 (0,5 mM), 2/8 (50 µM) a 3/14 (CTRL).



Obrázek 21: Graf znázorňující vliv itakonátu na kladení samic a líhnutí larev. Ze získaných dat nelze rozhodnout, zda měl inhibitor vliv na kladení a líhnutí a bylo by vhodné experiment zopakovat. A) Procenta samic, které kladly při různých koncentracích itakonátu. Počet kladoucích samic/počet nasátých samic byl následovný: 1/12 (0,5 M), 11/12 (50 mM), 7/10 (5 mM), 2/9 (0,5 mM), 4/8 (50 μM) a 6/14 (CTRL). B) Procento samic, z jejichž snůšek se vylíhly larvy po sání na různých koncentracích itakonátu. Počet kladoucích samic/počet nasátých samic byl následovný: 1/12 (0,5 M), 6/12 (50 mM), 4/10 (5 mM), 0/9 (0,5 mM), 2/8 (50 μM) a 3/14 (CTRL). Jako 100 % (A i B) byly brány všechny nasáté samice.

5 Diskuze

Glyoxylátový cyklus je anaplerotickou drahou, která umožňuje organismům využívajícím dvouuhlíkaté sloučeniny jako svůj hlavní příjem uhlíku tyto dvouuhlíkaté sloučeniny přeměnit na čtyřuhlíkaté bez oxidačních kroků citrátového cyklu. (Kornberg and Krebs, 1957). Cyklus je pro tyto organismy méně energeticky výhodný, avšak slouží jako zdroj organických sloučenin (oxalacetátu), který může být použit k tvorbě biomasy přeměnou ve fosfoenolpyruvát a následně na sacharidy. (Dolan and Welch, 2018). Tuto dráhu využívají hlavně bakterie rostoucí na acetátu a jiných živinami chudých médiích (Dolan and Welch, 2018) a rostliny, kdy klíčící semena musí přetvářet lipidy v sacharidy (Kornberg and Beevers, 1957). U některých metazoi, včetně člověka byla detekována aktivita (Davis and Goodman, 1992), potvrzené homologní geny jsou však evolučně nejvýše jen u hlístic (Kondrashov et al., 2006). Tato aktivita byla detekována vždy jen za extrémně stresových nebo patologických podmínek, například medvědů při hibernaci (Davis et al., 1990a) nebo hladovějících krys (Popov et al., 1998). Homologní geny pro enzymy glyoxylátového cyklu však nikdy v těchto organismech objeveny nebyly, což může být dáno jejich absencí, nebo se sekvence velmi liší.

Pro detekci glyoxylátového cyklu, konkrétně enzymu isocitrát lyázy, jsem se rozhodla na základě objevu vědců Kamela a Fahmyho, kteří provedli biochemický test na detekci glyoxylátu ve vajíčkách klíštěte *Hyalomma dromedarii* (Kamel and Fahmy, 1982). Nárůst glyoxylátu si vykládali jako aktivitu isocitrát lyázy, avšak v eseji nepoužili itakonát (v té době jediný známý specifický inhibitor isocitrát lyázy), nedenaturovali enzym, nedekovali aktivitu bez přidaného isocitrátu a v práci nepokračovali dál charakterizací struktury enzymu. Proto jsem chtěla najít aktivitu isocitrát lyázy ve vajíčkách našeho klíštěte *Ixodes ricinus*, enzym purifikovat a pomocí hmotnostní spektrometrie ho charakterizovat. Pak jsem chtěla zjistit sekvenci genu kódující tento enzym, najít tento gen v genomu klíštěte a poté ověřit jeho přítomnost (nebo přítomnost homologního genu) v lidském genomu. Biochemický test uvedený v tomto článku se částečně lišil od testu používaného mnou. Uvedený biochemický test obsahoval vedle phenylhydrazinu, isocitrátu, $MgCl_2$ a 0,05M PBS navíc β -mercaptoethanol, který do reakce vnášel thiolové skupiny. Tento biochemický test byl při různých pH otestován na mém rekombinantním proteinu, stejně jako na

lyzátech klíštěcích vajíček, bez úspěchu (v práci neuvedeno). Proto jsem se rozhodla pro klasický standardizovaný test na isocitrát lyázu (Chell et al., 1978), který je dostupný i na stránkách společnosti Sigma-Aldrich. Další věcí, která byla provedena jinak než v článku, byla příprava lyzátu. V práci Kamela a Fahmyho byl lyzát připraven pouze rozbitím vajíček pomocí teflonového homogenizéru, já jsem snůšky nejenom homogenizovala, nýbrž i za předpokladu, že je enzym isocitrát lyáza přítomna v endosomech, sonikovala za přítomnosti detergentu.

V původním článku byla k detekci využita vajíčka odebraná v různých fázích vývoje a nejvyšší aktivita byla naměřena 15. den po ovipozici. Po srovnání vývoje *Hyalomma dromedarii* s embryonálním vývojem našeho klíštěte *Ixodes ricinus* (příloha 1), jsem se rozhodla pro vajíčka odpovídající 14. dnu vývoje (podle Jasik, 2007). Vajíčka jsem vždy kontrolovala pod mikroskopem (obrázek 15), protože část experimentu probíhala v zimě, kdy klíšťata pomaleji sají a pomaleji se vyvíjejí, proto by mohla být orientace pouze podle data ovipozice nepřesná.

Nejprve bylo nutné zkontrolovat obsah bakterií ve snůškách, které měly být použity k biochemické esaji. Pro co nejvyšší čistotu snůšek byly samice injikovány vysokým množstvím antibiotik, před kladením byly promývány v naředěném peroxidu vodíku a ethanolu, taktéž i snůšky před použitím. Jako antibiotika byla zvolena kombinace tetracyklinu a chloramfenikolu, obě dvě antibiotika jsou širokospektrá. Tetracyklin inhibuje proteosyntézu reverzibilní vazbou na 30S podjednotku ribozomu, chloramfenikol inhibuje proteosyntézu vazbou na 50S podjednotku ribozomu (Kapoor et al., 2017). V porovnání s klíšťaty z kontrolní skupiny, ošetřené jen směsí PBS a ethanolu, se klíšťat dosálo méně (pouze 8 v porovnání s kontrolou, ve které se dosálo všech 15 samic). Skupina ošetřená antibiotiky obsahovala pouze genom *Midichloria mitochondrii* (tabulka XI), která je pravděpodobně důležitá pro sání a vývoj klíštěte (Ninio et al., 2015), proto se zřejmě veškerá klíšťata, která jsme tohoto symbionta zbavili, nepřisála, nebo nedosála. Tato endosymbiotická bakterie byla pozorována hlavně ve vaječnicích samic klíštěte *Ixodes ricinus*, u samců nebyla nalezena (Sassera et al., 2006). Kontrolní skupina vyjma *Midichloria mitochondrii* obsahovala endosymbiotickou bakterii *Nicolleia massiliensis* (tabulka XI), která dle mého experimentu pravděpodobně není pro sání a vývoj podstatná. Genom *Midichloria*

mitochondrii překvapivě neobsahuje gen pro isocitrát lyázu (KEGG), proto jsem mohla vyloučit vliv symbiontů na esej.

Dalším důležitým bodem byla tvorba pozitivní kontroly pro mou biochemickou esej. *Escherichia coli* obsahuje gen pro tvorbu isocitrát lyázy (KEGG), ale enzym je v bakteriích přítomný pouze v malých koncentracích, proto jsem se rozhodla zaklonovat gen *aceA* kódující isocitrát lyázu, a enzym pak exprimovat. Pro klonování *aceA* jsem původně chtěla využít pET100 vektor (v práci nezmiňuji), ale nepodařilo se mi do něj gen zaklonovat. Předpokládala jsem, že by se mohlo jednat o toxický gen, který např. buňce spotřebovává většinu isocitrátu a buňka tudíž nemá substrát pro Krebsův cyklus a proto nemá dostatek energie na důležité životní procesy (např. tvorba ATP). Proto jsem se rozhodla gen klonovat do vektoru pASK, kde je exprese vyvolána až po přidání anhydrotetracyklinu a exprimuje protein do cytoplasmy, proto je vhodný i pro klonování toxických genů. Do pASK vektoru se mi gen zaklonovat podařilo, nicméně jsem získala jen jednu kolonii buněk nesoucí mnou požadovaný gen. Gen překvapivě neměl vliv na růst bakterií, jak jsem předpokládala (obrázek 10).

Enzym isocitrát lyázu se podařilo vyexprimovat solubilní, rozpuštěnou v cytoplasmě (obrázek 12). Enzym nese His-tag pro purifikaci, která ale zatím nebyla využita. Pro účely biochemického testu nebyla purifikace podstatná, naopak by mohlo dojít k ztrátě aktivity. Lyzát bakterií jsem pak používala v biochemickém testu jako pozitivní kontrolu. Že se jedná skutečně o mnou požadovaný enzym jsem ověřila pomocí western blot analýzy, inhibicí itakonátem a esejí bez isocitrátu, který je substrátem reakce (obrázek 13). Existuje velká spousta inhibitorů isocitrát lyázy (Lee et al., 2015), já jsem se rozhodla pro inhibici tímto specifickým inhibitorem zejména proto, že je nejdéle známým inhibitorem isocitrát lyázy, poprvé zmíněn v roce 1977 (McFadden and Purohit, 1977). Výhodou itakonátu je inhibice i při velmi nízkých koncentracích. Značná nevýhoda je, že ve vyšších koncentracích působí hemolýzu červených krvinek (0,5M koncentrace itakonátu v krvi působí hemolýzu během pár minut), proto jsem v mém experimentu se sáním klíšťat na umělých membránách musela použít velmi malá množství itakonátu.

Po přípravě pozitivní kontroly a ověření specifity jeho inhibice itakonátem jsem detekovala aktivitu ve vajíčkách druhů *Ixodes ricinus*, *Amblyomma americanum* a *Dermacentor reticulatus* (obrázek 16 a 17). Po denuraci vzorku teplem absorbance

vzorku vzrostla, ale aktivita se dostala na úroveň negativní kontroly (PBS), což naznačuje, že se považením uvolnila látka reagující s phenylhydrazinem, která se bezprostředně po přidání k enzymatické eseji navázala na phenylhydrazin, ale dále už se žádná nevytvářela. U nedenaturovaných vzorků byl sledován nárůst aktivity v čase, který ale nebyl blokován itakonátem, ani nepřítomností isocitrátu v reakci. To, že itakonát neblokoval nárůst aktivity v čase by mohlo znamenat buď to, že inhibitor nefunguje kvůli strukturním odlišnostem enzymu, nebo že v reakci enzym není. Nicméně aktivita byla přítomna i za nepřítomnosti isocitrátu. Proto jsem se rozhodla dialyzovat a odstranit tím všechen volný isocitrát získaný lýzou klíštěcích buněk. Ani po dialýze aktivita nezmizela (obrázek 16), proto se domnívám, že aktivita, která je v reakci měřená nepochází z glyoxylátového cyklu. Vzhledem k tomu, že phenylhydrazin nereaguje pouze s glyoxylátem, nýbrž i s jinými sloučeninami obsahujícími karbonylové skupiny, je tato reakce nespecifická a může docházet k chybnému měření absorbance jiných vznikajících látek. Pravděpodobně tedy dochází k reakci phenylhydrazinu jinou látkou, například hemem vázaným ve vajíčku na vitellin (Shetlar and Hill, 1985). Vitellin je u klíšťat hlavním zásobním proteinem ve vajíčkách, má na sobě navázané tuky a hem (Logullo et al., 2002). Phenylhydrazin je známý svými hemolytickými účinky, vystavení phenylhydrazinu působí hemolytickou anémii (Grigorovich, 1966). Navázáním phenylhydrazinu na hem dochází k oxidaci phenylhydrazinu a tím k nárůstu absorbance. V práci Dr. Augustové, která zkoumala reakce phenylhydrazinu s hemoglobinem, je uvedeno, že inkubace velkého nadbytku phenylhydrazinu (1mM) s oxyhemoglobinem je provázena spotřebou kyslíku, která je první tři minuty velmi rychlá, poté přechází do pomalejšího procesu, který nepřetržitě pokračuje minimálně dalších 15 minut (Augusto et al., 1982), což se velmi podobá mnou naměřeným výsledkům. Toto může být příčinou měření nárůstu absorbance u mnohých organismů.

Vitellin se v mojí práci nedá odstranit dialýzou a ve vyvíjejícím se vajíčku se přirozeně štěpí katepsiny za uvolnění hemu (Franta et al., 2011). Po denuraci samozřejmě vitellin i enzymy ho štěpící denaturují, proto nevidíme vzrůstající signál. V budoucí práci bych chtěla použít inhibitory katepsinu, abych ověřila, zda se skutečně jedná o aktivitu pocházející ze štěpení vitellinu, případně hmotnostní spektrometrií specificky detekovat množství glyoxylátu před a po reakci.

Samozřejmě nelze vyloučit, že je měřen nárůst glyoxylátu, nicméně glyoxylát může v organismech vznikat i jinými metabolickými procesy, např. metabolismem glykolátu. Glykolát je oxidován v peroxizomech glykolát oxidázou na glyoxylát. Gen kódující glykolát oxidázu, na rozdíl od genů kódujících enzymy glyoxylátového cyklu, byl nalezen a popsán v genomu *Ixodes scapularis* (KEGG). Nově byly dvě formy glykolát oxidázy nalezeny i v klíštěti *Amblyomma sculptum* (Martins et al., 2017).

Většina pokusů na detekci isocitrát lyázy je prováděna biochemickými testy založenými na měření absorbance vznikajících glyoxylát phenylhydrazonů reakcí phenylhydrazinu s glyoxylátem. Prakticky všechny práce, které popisují glyoxylátovou dráhu u metazoí, s výjimkou hlístic, skončily u ověření biochemickou esejí a nikdy nebyly dokončené například charakterizací proteinu.

I když se přítomnost isocitrát lyázy in-vitro ve vyvíjejících se klíštěcích embryích nepotvrdila, přesto jsem se rozhodla udělat in-vivo experiment. V krmítku na kravské krvi doplněné o různé koncentrace itakonátu jsem pozorovala sání a kladení samic a líhnutí snůšek. Skupina klíšťat sající na nejvyšší koncentraci itakonátu sála (obrázek 20), ale nekladla (obrázek 21), což když vyloučíme inhibicí isocitrát lyázy klíštěcích vajíček, by mohlo být dáno inhibicí sukcinát dehydrogenázy. Bohužel skupina s druhou nejvyšší koncentrací itakonátu v krmení byla tou nejúspěšnější co se týče sání, kladení i líhnutí (obrázek 20 a 21). Z tohoto důvodu bude experiment nutné zopakovat. Experiment byl prováděn v červenci, proto mohlo na výsledek mít vliv i klima.

K ochraně před klíšťaty jsou v současné době využívány akaricidy, jsou ale toxické nejen pro klíšťata (Dahlgren et al., 2012), proto má také význam věnovat se vývoji vakcín. Je třeba hledat biochemické dráhy, které u obratlovců chybí, abychom proti nim mohli tyto vakcíny, nebo inhibitory, cílit. Glyoxylátový cyklus by takovou biochemickou drahou být mohl, nicméně z našich dat vyplývá, že pravděpodobně u klíšťat zcela chybí.

6 Závěr

V mé bakalářské práci jsem se zabývala průkazem dříve publikovaného glyoxylátového cyklu u klíšťat. Podařilo se mi zavést funkční biochemický test pro detekci glyoxylátu, produktu isocitrát lyázy, klíčového enzymu této dráhy. Jako pozitivní kontrolu v testu jsem použila mnou vyexprimovanou isocitrát lyázu z bakterie *E. coli*. Ve vyvíjejících se embryích klíšťat se mi podařilo detekovat aktivitu, ale pomocí kontrol jsem vyloučila, že by se jednalo glyoxylát vznikající činností isocitrát lyázy. Phenylhydrazin zřejmě reagoval s produkty postupně se uvolňujícími z lyzátu vajíček (například s hemem uvolňujícím se ze zásobního vitellinu).

7 Příloha

Příloha 1: Rozdíl ve vývoji klíšťat *Hyalomma dromedarii* a *Ixodes ricinus*. V 80. letech vědci Kamel a Fahmy (Kamel and Fahmy, 1982) detekovali nárůst glyoxylátu, který považovali za produkt enzymu isocitrát lyázy, v 15 denních vajíčkách klíštěte *Hyalomma dromedarii*. V tabulce je stručné shrnutí a porovnání embryologických dějů odehrávajících se v těchto dvou druzích během vývoje, což bylo nápomocné při rozhodování, kdy odebírat vajíčka *Ixodes ricinus* pro biochemický test.

vývojový proces	<i>Hyalomma dromedarii</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
cleavage	4 - 6h po ovipozici	1. den
blastula	8. den	3. den
gastrulace	10. den	6. den
pedipalpy, končetiny	11. den - 12. den, 4. pár končetin se nevyvíjí	17. den, 4. pár končetin se vyvíjí, ale zaniká
nervová tkáň	14. den - 15. den	14. den
proktodeum	11. den	14. den
rectal sac	16. den	14. den
stomodeum	nevyvinuto	nevyvinuto
líhnutí larev	17.-18. den	31. den

Příloha 2: Seznam použitých pufrů a médií.

pufr	složení
1x PBS	8 g NaCl, 0,2 g KH ₂ PO ₄ , 2,9 g Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O, 0,2 g KCl v 1 l dH ₂ O
0,05M PBS (Gomori, 1955)	A = 27,8 g NaH ₂ PO ₄ v 1 l dH ₂ O B = 71,7 g Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O v 1 l dH ₂ O výsledný pufr (400ml, pH 7,4) = 19 ml A + 81 ml B + 300 ml dH ₂ O
50xTAE pufr	242 g TRIS-HCl, 100 ml 0,5M EDTA (pH=8), 57,1 ml 100% kyselina octová v 1 l dH ₂ O
1xTAE pufr	50x ředěný 50xTAE pufr (20 ml 50xTAE do 1 l dH ₂ O)
LB medium	10 g trypton, 5 g yeast extract a 10 g NaCl v 1 l dH ₂ O
1% agarózový gel	0,3 g agarózy + 30 ml 1x TAE pufru
lyzační pufr	2,43 g Tris-HCl v 1 l dH ₂ O
izolační pufr	2,43 g Tris-HCl (pH = 8,0), 29,22 g NaCl, 120 g urea, 0,68 g imidazol, 80 µl β-mercaptoethanol, 20 ml Triton-X v 1 l dH ₂ O
solubilizační pufr	114,3 g guanidin hydrochlorid, 0,48 g Tris-HCl (pH = 8,0), 5,84 g NaCl, 0,07 g imidazol, 16 µl β-mercaptoethanol ve 200 ml dH ₂ O
PBST	0,5 ml TWEEN v 1 l dH ₂ O
Coomassie blue	125 mg Blue R (Serva), 125 ml methanol, 100 ml dH ₂ O, 25 ml kyselina octová

Příloha 3: Kompletní sekvence genu *aceA* (*Escherichia coli*). Podtržením jsou vyznačeny START a STOP kodon, žlutě pak pozice forward a reverse primeru.

ATGAAAACCCGTACACAACAAATTGAGAATTACAGAAAGAGTGGACTCAACC
 GCGTTGGGAAGGCATTACTCGCCCATACAGTGCGGAAGATGTGGTGAAATTACG
 CGGTTCAAGTCAATCCTGAATGCACGCTGGCGCAACTGGGCGCAGCGAAAATGTG
 GCGTCTGCTGCACGGTGAGTCGAAAAAAGGCTACATCAACAGCCTCGGCGCACT
 GACTGGCGGTCAGGCGCTGCAACAGGCGAAAGCGGGTATTGAAGCAGTCTATCT
 GTCCGGGATGGCAGGTAGCGGGCGGACGCTAACCTGGCGGCCAGCATGTATCCGGA
 TCAGTCTGCTCTATCCGGCAAACCTCGGTGCCAGCTGTGGTGGAGCGGATCAACAA
 CACCTTCCGTCGTGCCGATCAGATCCAATGGTCCGCGGGCATTGAGCCGGGCGA
 TCCGCGCTATGTCGATTACTTCTGCCGATCGTTGCCGATGCGGAAGCCGGTTTT
 GGCGGTGTCCTGAATGCCTTTGAACTGATGAAAGCGATGATTGAAGCCGGTGCA
 GCGGCAGTTCACCTCGAAGATCAGCTGGCGTCAGTGAAGAAATGCGGTCACATG
 GGCGGCAAAGTTTTAGTGCCAACCTCAGGAAGCTATTCAGAAACTGGTCGCGGGC
 CGTCTGGCAGCTGACGTGACGGGCGTTCCAACCCTGCTGGTTGCCCGTACCGATG
 CTGATGCGGCGGATCTGATCACCTCCGATTGCGACCCGATGACAGCGAATTTAT
 TACCGGCGAGCGTACCAGTGAAGGCTTCTTCCGTAATCATGCGGGCATTGAGCA
 AGCGATCAGCCGTGGCCTGGCGTATGCGCCATATGCTGACCTGGTCTGGTGTGA
 AACCTCCACGCCGGATCTGGAACCTGGCGCGTCGCTTGCACAAGCTATCCACGC
 GAAATATCCGGGCAAACCTGCTGGCTTATAACTGCTCGCCGTCGTTCAACTGGCAG
 AAAACCTCGACGACAAAACCTATTGCCAGCTTCCAGCAGCAGCTGTCCGATATG
 GGCTACAAGTTCAGTTCATCACCTGGCAGGTATCCACAGCATGTGGTTCAACA
 TGTTTGACCTGGCAAACGCCTATGCCAGGGCGAGGGTATGAAGCACTACGTTG
 AGAAAGTGCAGCAGCCGGAATTTGCCGCCGCGAAAGATGGCTATACCTTCGTAT
 CTCACCAGCAGGAAGTGGGTACAGGTTACTTCGATAAAGTGACGACTATTATTC
 AGGGCGGCACGTCTTCAGTCACCGCGCTGACCGGCTCCACTGAAGAATCGCAGT
 TCTAA

Příloha 3: Navržení primerů pro klonování *aceA* do vektoru pASK pomocí BsaI

restriktázy. Forward (Ace-F) a reverse (Ace-R) primer pro klonování do pASK vektoru, kurzívou je vyznačená část primeru nutná pro klonování do pASK vektoru pomocí BsaI restriktázy. Žlutě jsou vyznačeny forward a reverse primer, červeně START a STOP kodon. Fialová barva značí rozeznávací sekvenci pro BsaI restriktázu, která po sekvenci GGTCTC štěpí řetězec po 1 nukleotidu (v mém případě A). Podtržením jsou vyznačeny převisy, které nám zaručí směrovost a správnou ligaci do pASK vektoru.

název	sekvence primeru
Ace-F	5'-ATG GTA GGTCTCAGCGCAAAAACCCGTACACAACAAATTGA-3'
Ace-R	5'-ATGGTAGGTCTCATATCTTAGAACTGCGATTCTTCAGTGG-3'

8 Seznam použité literatury

- Ackermann, W. W., and Potter, V. R. (1949). Enzyme Inhibition in Relation to Chemotherapy. *Exp. Biol. Med.* 72, 1-9.
- Aeschlimann, A. (1961). Complément à l'étude de l'embryologie d'*Ornithodoros moubata* (Murray). *Acta Trop.* 18, 57–60.
- Ahantari, A., Trinachartvanit, W., Baimai, V., and Grubhoffer, L. (2013). Hard ticks and their bacterial endosymbionts (or would be pathogens). *Folia Microbiol.* 58, 419–428.
- Arthur, D. R. (1948). On the egg of the tick, *Ixodes ricinus* L. *Parasitology* 39, 53–60.
- Augustos, O., Kunze, K. L., and Ortiz De Montellano, P. R. (1982). N-Phenylprotoporphyrin IX formation in the hemoglobin-phenylhydrazine reaction. Evidence for a protein-stabilized iron-phenyl intermediate. *J Biol Chem.* 257(11):6231-6241.
- Bambouskova, M., Gorvel, L., Lampropoulou, V., Sergushichev, A., Loginicheva, E., Johnson, K., et al. (2018). Electrophilic properties of itaconate and derivatives regulate the IkappaBzeta-ATF3 inflammatory axis. *Nature* 556, 501–504.
- Beninati, T., Lo, N., Sacchi, L., Genchi, C., Noda, H., and Bandi, C. (2004). A novel alpha-proteobacterium resides in the mitochondria of ovarian cells of the tick *Ixodes ricinus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2596–2602.
- Britton, K. L., Abeysinghe, I. S. B., Baker, P. J., Barynin, V., Diehl, P., Langridge, S. J., et al. (2001). The structure and domain organization of *Escherichia coli* isocitrate lyase. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 57, 1209–1218.
- Chell, R. M., Sundaram, T. K., and Wilkins, A. E. (1978). Isolation and Characterization of Isocitrate Lyase from a Thermophilic *Bacillus* sp. *Biochem J.* 173(1), 165-177.
- Cornah, J. E., and Smith, S. M. (2002). Synthesis and Function of Glyoxylate Cycle Enzymes. *Plant Peroxisomes*, 57–101.
- Crousilles, A., Dolan, S. K., Brear, P., Chirgadze, D. Y., and Welch, M. (2018). Gluconeogenic precursor availability regulates flux through the glyoxylate shunt in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 293, 14260–14269.
- Dahlgren, L., Johnson, R. M., Siegfried, B. D., and Ellis, M. D. (2012). Comparative Toxicity of Acaricides to Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Workers and Queens. *J Econ Entomol.* 105, 1895-1902.
- Dai, J., Wang, P., Adusumilli, S., Booth, C. J., Narasimhan, S., Anguita, J., et al. (2009). Antibodies against a Tick Protein, Salp15, Protect Mice from the Lyme Disease Agent. *Cell Host Microbe* 6, 482–492.

- Davis, W. L., and Goodman, D. B. P. (1992). Evidence for the glyoxylate cycle in human liver. *Anat. Rec.* 234, 461–468.
- Davis, W. L., Goodman, D. B. P., Crawford, L. A., Cooper, O. J., and Matthews, J. L. (1990a). Hibernation activates glyoxylate cycle and gluconeogenesis in black bear brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1051, 276–278.
- Davis, W. L., Jones, R. G., Farmer, G. R., Dickerson, T., Cortinas, E., Cooper, O. J., et al. (1990b). Identification of glyoxylate cycle enzymes in chick liver—the effect of vitamin D3: Cytochemistry and biochemistry. *Anat. Rec.* 227, 271–284.
- Davis, W. L., Jones, R. G., and Goodman, D. B. P. (1986). Cytochemical localization of malate synthase in amphibian fat body adipocytes: Possible glyoxylate cycle in a vertebrate. *J. Histochem. Cytochem.* 34, 689–692.
- de la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Venzal, J. M., Kocan, K. M., and Sonenshine, D. E. (2008). Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.* 13, 6938–6946.
- Dolan, S. K., and Welch, M. (2018). The Glyoxylate Shunt, 60 Years On. *Annu. Rev. Microbiol.* 72, 309–330.
- Dunn, M. F., Ramírez-Trujillo, J. A., and Hernández-Lucas, I. (2009). Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis. *Microbiology* 155, 3166–3175.
- Eprintsev, A. T., Semenova, E. V., and Popov, V. N. (2002). Induction of aconitate hydratase in hepatocytes of starving rats. *Biochem.* 67, 795–801.
- Fourie, J. J., Evans, A., Labuschagne, M., Crafford, D., Madder, M., Pollmeier, M., et al. (2019). Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) by *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) ticks feeding on dogs and artificial membranes. *Parasit. Vectors* 12, 136.
- Franta, Z., Sojka, D., Frantova, H., Dvorak, J., Horn, M., Srba, J., et al. (2011). IrCL1 - The haemoglobinolytic cathepsin L of the hard tick, *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* 41, 1253–1262.
- Gerhart, J. G., Moses, A. S., and Raghavan, R. (2016). A Francisella-like endosymbiont in the Gulf Coast tick evolved from a mammalian pathogen. *Sci. Rep.* 6, 1–6.
- Gomori, G. (1955). Preparation for Use in Enzyme Studies. *Methods Enzym.* 1, 138–146.
- Goodman, D. B. P., Davis, W. L., and Jones, R. G. (1980). Glyoxylate cycle in toad urinary bladder: Possible stimulation by aldosterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 1521–1525.
- Grigorovich, N. A. (1966). Pathogenesis of hemolytic anemia caused by phenylhydrazine - Experimental data. *Bull. Exp. Biol. Med.* 61, 126–129.

- Guglielmone, A. a (2010). Zootaxa, The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa* 2528, 1–28.
- Houck, M. A. (1994). Principles of Acarology. *American Entomologist*, 112–113.
- Huang, A. H. C., Trelease, R. N., and Moore, T. S. J. (1983). *Plant Peroxisomes. Academic Press, Inc.*
- Idnurm, A., and Howlett, B. J. (2002). Isocitrate lyase is essential for pathogenicity of the fungus *Leptosphaeria maculans* to canola (*Brassica napus*). *Eukaryot. Cell* 1, 719–724.
- Ivanov, I. N., Mitkova, N., Reye, A. L., Hübschen, J. M., Vatcheva-Dobrevska, R. S., Dobрева, E. G., et al. (2011). Detection of new Francisella-like tick endosymbionts in *Hyalomma* spp. and *Rhipicephalus* spp. (Acari: Ixodidae) from Bulgaria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5562–5565.
- Jasik, K. (2007). Embryonic development of *Ixodes ricinus* (L.). *Zool. Pol.* 52, 5–60.
- Kamel, M. Y., and Fahmy, A. S. (1982). Biochemical studies of tick embryogenesis. V. Purification and partial characterization of isocitrate lyase from eggs of the tick *Hyalomma dromedarii*. *Comp. Biochem. Physiol.* 72, 107–115.
- Kammah, K. M. E., Adham, F. K., Tadross, N. R., and Osman, M. (1982). Embryonic development of the camel tick *hyalomma dromedarii* (Ixodoidea: Ixodidae). *Int. J. Acarol.* 8, 47–54.
- Kapoor, G., Saigal, S., and Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* 33, 300–305.
- Keirans, J. E. (2009). Order Ixodida. *A Manual of Acarology*, 111–123.
- Keirans, J. E., Clifford, C. M., Hoogstraal, H., and Easton, E. R. (1976). Discovery of *Nuttalliella namaqua* Bedford (Acarina: Ixodoidea: Nuttalliellidae) in Tanzania and Redescription of the Female Based on Scanning Electron Microcopy. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 69, 926–932.
- Ko, Y. H., and McFadden, B. A. (1990). Alkylation of isocitrate lyase from *Escherichia coli* by 3-bromopyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.* 278, 373–380.
- Kondrashov, F. A., Koonin, E. V., Morgunov, I. G., Finogenova, T. V., and Kondrashova, M. N. (2006). Evolution of glyoxylate cycle enzymes in Metazoa: Evidence of multiple horizontal transfer events and pseudogene formation. *Biol. Direct* 1, 31.
- Kornberg, H. L. (1965). Control of biosynthesis from C2 compounds. *Mec. Regul. des Act. Cell. chez les microrganismes. Colloq. Intemationaux du Cent. Natl. la Rech. Sci.* 124, 193–207.
- Kornberg, H. L. (1966). The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 99, 1–11.

- Kornberg, H. L., and Beevers, H. (1957). The glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *BBA - Biochim. Biophys. Acta* 26, 531–537.
- Kornberg, H. L., and Krebs, H. A. (1957). Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Gr. Nat. Publ.* 180, 756–757.
- Krebs, H. A., and Johnson, W. A. (1980). The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *FEBS Lett.* 117, K2–K10.
- Lee, Y. V., Wahab, H. A., and Choong, Y. S. (2015). Potential inhibitors for isocitrate lyase of mycobacterium tuberculosis and Non- M. tuberculosis: A summary. *Biomed Res. Int.*
- Lewis, D. (1979). The detection of rickettsia-like microorganisms within the ovaries of female Ixodes ricinus ticks. *Zeitschrift für Parasitenkd. Parasitol. Res.* 59, 295–298.
- Liang, J., Zeng, F., Guo, A., Liu, L., Guo, N., Li, L., et al. (2011). Microarray analysis of the chelerythrine-induced transcriptome of mycobacterium tuberculosis. *Curr. Microbiol.* 62, 1200–1208.
- Liu, F., Thatcher, J. D., Barral, J. M., and Epstein, H. F. (1995). Bifunctional glyoxylate cycle protein of Caenorhabditis elegans: A developmentally regulated protein of intestine and muscle. *Dev. Biol.* 169, 399–414.
- Logullo, C., Moraes, J., Dansa-Petretski, M., Vaz, I. S., Masuda, A., Sorgine, M. H. F., et al. (2002). Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, Boophilus microplus. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1805–1811.
- Lu, J., Yue, J., Wu, J., Luo, R., Hu, Z., Li, J., et al. (2010). In vitro and in vivo activities of a new lead compound I2906 against Mycobacterium tuberculosis. *Pharmacology* 85, 365–371.
- Macleod, J. (1932). The bionomics of Ixodes ricinus L., the “sheep tick” of scotland. *Parasitology* 24, 382–400.
- Macleod, J. (1935). Ixodes ricinus in Relation to its Physical Environment:II. Climate and Reproduction. *Parasitology* 27, 489–500.
- Maharjan, R. P., Yu, P. L., Seeto, S., and Ferenci, T. (2005). The role of isocitrate lyase and the glyoxylate cycle in Escherichia coli growing under glucose limitation. *Res. Microbiol.* 156, 178–183.
- Martins, L. A., de Melo Galletti, M. F. B., Ribeiro, J. M., Fujita, A., Costa, F. B., Labruna, M. B., et al. (2017). The distinct transcriptional response of the midgut of Amblyomma sculptum and Amblyomma aureolatum ticks to rickettsia rickettsii correlates to their differences in susceptibility to infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7.
- McFadden, B. A., and Purohit, S. (1977). Itaconate, an isocitrate lyase directed inhibitor in Pseudomonas indigofera. *J. Bacteriol.* 131, 136–144.

- McKinley, M. P., Field, L. A., and Trelease, R. N. (1979). Multiple forms of isocitrate lyase in the matrix of *Turbatrix aceti* mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 253–263.
- Mills, E. L., Ryan, D. G., Prag, H. A., Dikovskaya, D., Menon, D., Zaslona, Z., et al. (2018). Itaconate is an anti-inflammatory metabolite that activates Nrf2 via alkylation of KEAP1. *Nature* 556, 113–117.
- Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A., and Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 148, 257–266.
- Nava, S., Guglielmo, A. A., and Mangold, A. J. (2009). An overview of systematics and evolution of ticks. *Front. Biosci.* 14, 2857–2877.
- Ninio, C., Plantard, O., Serra, V., Pollera, C., Ferrari, N., Cafiso, A., et al. (2015). Antibiotic treatment of the hard tick *Ixodes ricinus*: Influence on *Midichloria mitochondrii* load following blood meal. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 6, 653–657.
- Okabe, M., Lies, D., Kanamasa, S., and Park, E. Y. (2009). Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84, 597–606.
- Olenev, N. O. (1927). Contribution to the Biology of the Cattle Tick, *Ixodes ricinus*, L., in the Novgorod Government. *Zashchita rastenii ot Vred.* 4.
- Park, Y., Cho, Y., Lee, Y. H., Lee, Y. W., and Rhee, S. (2016). Crystal structure and functional analysis of isocitrate lyases from *Magnaporthe oryzae* and *Fusarium graminearum*. *J. Struct. Biol.* 194, 395–403.
- Perner, J., Sobotka, R., Sima, R., Konvickova, J., Sojka, D., de Oliveira, P. L., et al. (2016). Acquisition of exogenous haem is essential for tick reproduction. *Elife* 5.
- Popov, V. N., Volvenkin, S. V., Eprintsev, A. T., and Igamberdiev, A. U. (1998). Glyoxylate cycle enzymes are present in liver peroxisomes of alloxan-treated rats. *FEBS Lett.* 440, 55–58.
- Reiss, U., and Rothstein, M. (1974). Isocitrate Lyase from the Free-Living Nematode, *Turbatrix aceti*: Purification and Properties. *Biochemistry* 13, 1796–1800.
- Rothstein, M., and Mayoh, H. (1965). Nematode biochemistry-VII. Presence of isocitrate lyase in *Panagrellus redivivus*, *turbatrix aceti*, and *Rhabditis anomala*. *Comp. Biochem. Physiol.* 16.
- Sassera, D., Beninati, T., Bandi, C., Bouman, E. A. P., Sacchi, L., Fabbi, M., et al. (2006). *Candidatus Midichloria mitochondrii*, an endosymbiont of the *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2535–2540.
- Schloss, J. V., and Cleland, W. W. (1982). Inhibition of Isocitrate Lyase by 3-Nitropropionate, a Reaction-Intermediate Analogue. *Biochemistry* 21, 4420–4427.

- Scoles, G. A. (2004). Phylogenetic Analysis of the Francisella -like Endosymbionts of Dermacentor Ticks . *J. Med. Entomol.* 41, 277–286.
- Shetlar, M. D., and Hill, H. A. (1985). Reactions of hemoglobin with phenylhydrazine: a review of selected aspects. *Environ. Health Perspect.* 64, 265–281.
- Siddiqui, A. A., Stanley, C. S., and Berk, S. L. (2000). Cloning and expression of isocitrate lyase from human round worm *Strongyloides stercoralis*. *Parasite* 7, 233–236.
- Sonenshine, D. E. . (1991). *Biology of Ticks*. Vol. 1. New York: Oxford University Press.
- Thauer, R. K. (1988). Citric-acid cycle, 50 years on: Modifications and an alternative pathway in anaerobic bacteria. *Eur. J. Biochem.* 176, 497–508.
- Tveten, A. K., and Sjøstad, K. K. (2011). Identification of bacteria infecting ixodes ricinus ticks by 16S rDNA amplification and denaturing gradient gel electrophoresis. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 11, 1329–1334.
- Uchida, M., Ueda, M., Matsuki, T., Okada, H., Tanaka, A., and Fukui, S. (1986). Properties of isocitrate lyase from an alkane-utilizable yeast, *Candida tropicalis*. *Agric. Biol. Chem.* 50, 127–134.
- Volvenkin, S., Popov, V., Biokhimiia, A. E.-B., and 1999, U. (1999). Subcellular localization and properties of glyoxylate cycle enzymes in the liver of rats with alloxan diabetes. *Biochemistry* 64, 994-999.
- Willke, T., and Vorlop, K. D. (2001). Biotechnological production of itaconic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 289–295.
- Woolley, T. A. (1988). *Acarology : mites and human welfare*.
- Xu, Z., Zhi, Y., Dong, J., Lin, B., Ye, D., and Liu, X. (2016). Requirement of the isocitrate lyase gene ICL1 for VPS41-mediated starvation response in *Cryptococcus neoformans*. *J. Microbiol.* 54, 487–491.
- Yu, X. H., Zhang, D. W., Zheng, X. L., and Tang, C. K. (2019). Itaconate: an emerging determinant of inflammation in activated macrophages. *Immunol. Cell Biol.* 97, 134–141.
- Zellner, B., and Huntley, J. F. (2019). Ticks and tularemia: Do we know what we don't know? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 146.
- Zu Bentrup, K. H., Miczak, A., Swenson, D. L., and Russell, D. G. (1999). Characterization of activity and expression of isocitrate lyase in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 181, 7161–7167.