

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**



**Analýza exprese inhibitorů serinových proteáz v klíštěti**  
***Ixodes ricinus* pomocí real-time PCR**

Diplomová práce

**Bc. Simona Hauserová**

Vedoucí práce: RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.

Školitel - specialista: RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

České Budějovice 2019

Hauserová, S., 2019: Analýza exprese inhibitorů serinových proteáz v klíštěti *Ixodes ricinus* pomocí real-time PCR. [Analysis of expression of serine protease inhibitors in *Ixodes ricinus* tick using real-time PCR]. Mgr. Thesis, in Czech. – 73 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## Anotace

Tick saliva contains a lot of biological active substances helping them to successfully complete their feeding which is necessary for their next development. Both proteinaceous and non-proteinaceous molecules including protease inhibitors are present in tick saliva. The biggest family of these proteases are serpins. Serpins are involved in many biological processes as blood coagulation, fibrinolysis, apoptosis or inflammation. The aim of this diploma work was to determine expression profiles of 10 serpins from nymphs of *Ixodes ricinus* fed for different times using quantitative real-time PCR. For chosen genes (IRS-10, IRS-20) dsRNA for silencing of the gene was prepared and using RNA interference the role of these genes during tick (*I. ricinus* nymphs) feeding and transmission of *Borrelia afzelii* spirochetes, a vector of Lyme borreliosis, was evaluated.

Diplomová práce byla financována z grantu GAČR 31-16-07117Y.

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

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

V Českých Budějovicích dne.....

.....

Bc. Simona Hauserová

## *Poděkování*

*Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu katedry RNDr. Jindřichu Chmelařovi, PhD. za zadání zajímavého tématu diplomové práce a všechny konzultace, které byly přínosné a důležité k vyřešení dané problematiky. Především bych ale poděkovala své školitelce RNDr. Heleně Langhansové, PhD. za cenné rady, naučení molekulárních metod (qPCR, izolace nukleových kyselin či příprava vlastní dsRNA), za trpělivost a hlavně čas, který nebyl vždycky příhodný. Dále bych poděkovala panu Janu Erhartovi a týmu Parazitologického ústavu, RNDr. Radku Šímovi, PhD., RNDr. Ondřejovi Hajduškovi, PhD., i Ing. Gabriele Loosové za pomoc s in vivo pokusem. Rovněž dlužím poděkování Mgr. Adéle Chlastákové a ostatním kolegyním v laboratoři za přínosnou kritiku a podnětné rady. V poslední řadě bych moc poděkovala své rodině a příteli za trpělivost během celého studia.*

# Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce.....	2
3	Přehled literatury.....	3
3.1	Klíšťata .....	3
3.1.1	Klíště obecné ( <i>Ixodes ricinus</i> ).....	4
3.1.2	Interakce klíště - hostitel .....	5
3.1.3	Klíštěcí sliny .....	6
3.1.4	Inhibitory proteáz v klíštěcích slinách .....	9
3.2	SERPINY ( <u>S</u> erin <u>P</u> rotease <u>I</u> nhibitors).....	11
3.2.1	Strukturální charakteristika a mechanismus inhibice.....	12
3.2.2	Funkční význam serpinů .....	14
3.3	Serpiny u krevsajících členovců .....	15
3.4	Serpiny u klíštěte <i>Ixodes ricinus</i> .....	16
3.5	RNA interference .....	17
3.5.1	Experimentální využití RNAi u klíšťat .....	20
4	Materiál a metody.....	22
4.1	Izolace RNA a příprava cDNA .....	22
4.2	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase .....	23
4.2.1	Princip metody .....	23
4.2.2	Navrhnutí primerů serpinových genů .....	24
4.3	Příprava dsRNA .....	25
4.3.1	Příprava PCR produktu .....	25
4.3.2	Příprava plasmidu pLL10.....	26
4.3.3	Transformace plasmidu do <i>E. coli</i> .....	27
4.3.4	Restrikce purifikovaného plasmidu .....	28
4.3.5	Purifikace linearizovaného plasmidu .....	28

4.3.6	Syntéza jednořetězcové RNA a její purifikace .....	28
4.3.7	Hybridizace, syntéza dvouvláknové RNA .....	29
4.4	RNA interference v klíšťatech .....	30
4.4.1	Ověření silencingu .....	30
4.4.2	RNAi <i>in vivo</i> .....	31
5	Statistická analýza dat .....	33
6	Výsledky.....	34
6.1	Stanovení expresního profilu vybraných genů pro serpiny v průběhu sání nymf pomocí qPCR .....	34
6.2	Příprava dsRNA pro IRS-10, IRS-20 a IRS-22 .....	37
6.2.1	Transformace plasmidu do <i>E. coli</i> .....	37
6.2.2	Purifikace linerizovaného plasmidu a hybridizace IRS-10 a IRS-20 .....	39
6.3	Studium úlohy vybraných serpinů při sání nymf <i>I. ricinus</i> pomocí RNAi... ..	40
6.3.1	Ověření silencingu .....	40
6.3.2	Vliv serpinů na fitness klíšťat .....	40
6.3.3	Vliv serpinů na přenos borelií <i>B. afzelii</i> .....	43
7	Diskuze.....	45
8	Shrnutí .....	52
9	Seznam použitých zkratk.....	53
10	Seznam literatury .....	55

# 1 Úvod

Klíšťata ve svých slinách obsahují vedle proteinových a neproteinových látek i celou škálu inhibitorů proteáz, od inhibitorů s Kunitz doménou, přes cystatiny až po serpiny. Serpiny hrají důležitou roli v mnoha procesech jako je koagulace krve, fibrinolýza, apoptóza nebo zánět. Serpiny s touto inhibiční aktivitou fungují tedy jak extracelulárně, tak intracelulárně (Silverman et al., 2001; Whisstock et al., 2005).

Doposud zkoumané bioaktivní látky s imunomodulačními, protizánětlivými či protisrážlivými schopnostmi jsou předmětem mnoha studií, které se zabývají přípravou protiklíštěcích vakcín. Vakcinace je jednou z možností jak ochránit hostitele před infekcí, a zároveň snížit životaschopnost vektora (Mulenga et al., 2000). K přípravě účinné vakcinační směsi je nezbytná identifikace konkrétních molekul obsažených v klíšťatech. Je třeba nalézt imunogenní molekulu, která současně vyvolá rezistenci k samotnému klíšťeti, což je ovšem problematické, neboť ne každý protein schopný indukovat tvorbu protilátek musí být schopen vyvolat rezistenci vůči klíšťeti (Das et al., 2000). Vhodnými antigeny mohou být molekuly bránící shlukování trombocytů a vzniku zánětu. Pro tyto účely jsou studovány serpiny (Mulenga et al., 2001). Nadějnými kandidáty na vakcínu jsou ale i BPTI-Kunitz trombinové inhibitory, Ixolaris nebo Penthalaris (Maritz-Olivier et al., 2007).

Z výše zmíněných důvodů jsou rovněž studovány expresní profily serpinů v průběhu sání v klíšťeti *Ixodes ricinus*. Stanovením expresního profilu zjistíme, zda je exprese konkrétního serpinu během sání významně zvýšena. Vhodné kandidáty s předpokládanou úlohou při sání lze testovat např. pomocí RNA interference, kdy sledujeme vliv těchto genů na fitness klíšťat, dobu sání či přenos patogenů, což je cílem i této diplomové práce.

## 2 Cíle práce

- 1) Literární rešerše současných poznatků o serpinech krev sajících členovců a jejich potenciálním využití v humánní medicíně.
- 2) Příprava cDNA z nenasátých, částečně nasátých a plně nasátých nymf *Ixodes ricinus*.
- 3) Stanovení expresního profilu vybraných genů pro serpiny v průběhu sání nymf pomocí kvantitativní real-time PCR.
- 4) Studium úlohy vybraných serpinů při sání nymf *I. ricinus* pomocí RNA interference.

## 3 Přehled literatury

### 3.1 Klíšťata

Klíšťata jsou hematofágní obligátní ektoparazité suchozemských obratlovců včetně obojživelníků, plazů, ptáků a savců. Klíšťata náleží do kmene členovci (Arthropoda), podkmene klepítkatci (Chelicerata), třídy pavoukovci (Arachnida), podtříd roztoči (Acari), řádu Parasitiformes a podřádu klíšťatovci (Ixodida). Podřád Ixodida zahrnuje celkem 3 čeledi – klíšťákovité (Argasidae, „měkká“ klíšťata), klíšťovitité (Ixodidae, „tvrdá“ klíšťata) a Nuttalliellidae (Black et Piesman, 1994). Do čeledi Nuttalliellidae se řadí pouze jediný druh, jež který nese rysy klíšťákovitých i klíšťatovitých, a to *Nuttalliella namaqua* (Mans et al., 2011).

Pro čeleď Ixodidae je charakteristická přítomnost chitinizovaného hřbetního štítku. Naopak Argasidae tento hřbetní štítek postrádají (Nava et al., 2009), místo toho je celé jejich tělo pokryto měkkým kožovitým obalem zvaným integument (Mans et al., 2011). Zástupci obou čeledí se rovněž liší ve způsobu příjmu krve. Klíšťatovití na svém hostiteli sají poměrně dlouho dobu (dny až týdny), přičemž nasají velké množství krve, přibližně až stonásobek jejich tělesné hmotnosti. Přebytkovou vodu přijatou s krví poté vylučují zpět do hostitele přes slinné žlázy. Argasidae jsou schopni nasát malé množství krve odpovídající dvou až desetinásobku jejich počáteční tělesné hmotnosti. Na rozdíl od klíšťatovitých sají v kratším časovém intervalu (minuty až hodiny) a nadbytečnou tekutinu sekretují kožnými žlázami (Mans et al., 2011).

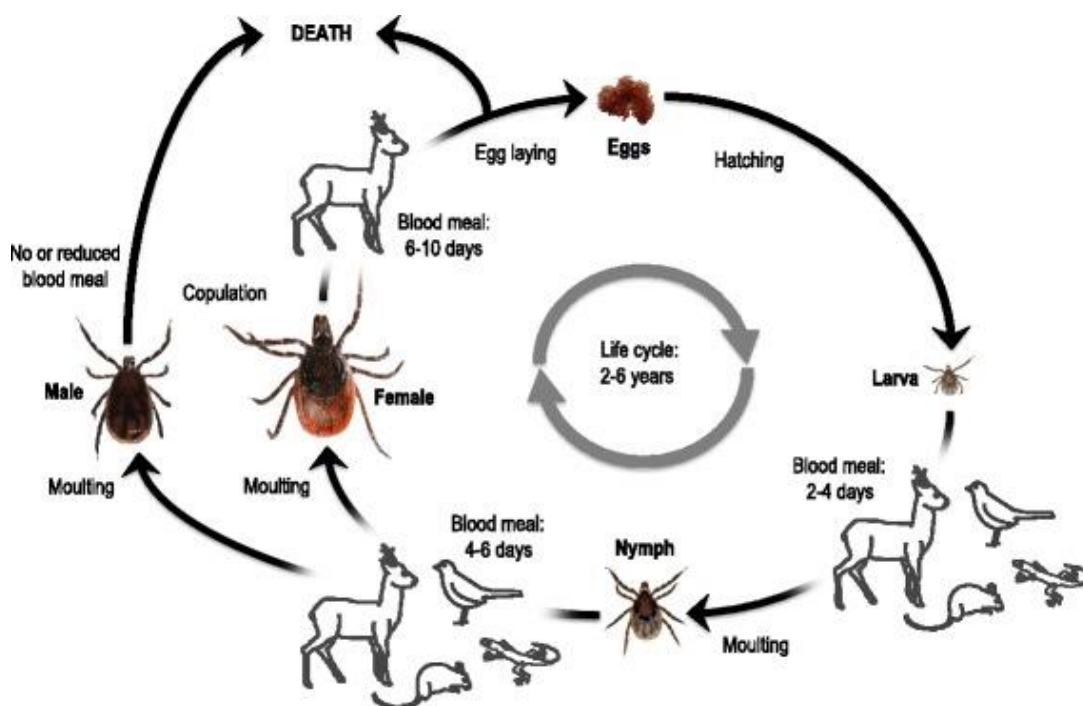
Čeleď Ixodidae se dále dělí na dvě hlavní morfologické a fylogenetické skupiny, jednou z nich je Prostriata. Tato skupina zahrnuje podčeleď Ixodinae s jediným rodem *Ixodes* (Black et Piesman, 1994; Klompen et al., 2002). Zástupci rodu *Ixodes* jsou dnes rozšířeni po celém světě a představují vektory mnoha virů, bakterií, rickettsií či protist. Z hlediska přenosu lidských nemocí jsou významné obzvláště 4 druhy - *Ixodes scapularis* na východě Severní Ameriky, *I. ricinus* v Evropě a západní Asii, *I. persulcatus* v severovýchodní Evropě a severní Asii a *I. pacificus* na západě USA (Nicholson et al., 2009).



### 3.1.1 Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

*Ixodes ricinus* je nejběžnějším klíštětem ve střední Evropě (Overzier et al., 2013). Jeho životní cyklus zahrnuje tři vývojová stádia – larvu, nymfu a dospělého jedince (samce nebo samici). Pro larvy a nymfy je sání krve nezbytné, neboť bez parazitování nejsou schopny přejít do dalšího vývojového stádia. Pro samice je zase příjem krve nutným předpokladem pro naklazení vajíček (Estrada-Peña, 2015). Každé stádium saje krev pouze jednou po dobu několika dní. Po nasátí odpadá a následně prochází metamorfózou na další vývojové stádium. Samci *I. ricinus* krev nepřijímají, jejich jediným úkolem je oplodnit samici v momentě, kdy saje na hostiteli. Oplodněná nasátá samička odpadne, naklade vajíčka a uhynie. Celý cyklus trvá přibližně 1-2 roky (Estrada-Peña, 2015).

*Ixodes ricinus* se vyznačuje trojhostitelským životním cyklem, tzn. každé vývojové stádium saje na jiném hostiteli (obr. 1) (Herrmann et Gern, 2015). Larvy a nymfy parazitují na hostitelích všech velikostí, upřednostňují ovšem hlodavce, ptáky nebo ještěrky. Dospělí jedinci sají primárně jen na větších savcích (skot, vysoká zvěř) (Medlock et al., 2013; Overzier et al., 2013).



Obr. 1: Životní cyklus klíštěte *Ixodes ricinus* (Herrmann et Gern, 2015).

Klíště obecné je předmětem mnoha studií zabývajících se přenosem patogenů na hostitele během sání a úlohou klíštěcích slin v tomto procesu. *I. ricinus* je vektorem

vážných lidských onemocnění jako je klíšťová encefalitida, lymeská borelióza, lidská granulocytární anaplazmóza, tularémie, rickettsiová skvrnitá horečka či babezióza (Medlock et al., 2013). V Evropě je *Ixodes ricinus* hlavním vektorem pro přenos borelií, jmenovitě *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii* a *B. afzelii* patogenních pro člověka (Wang et al., 1999). Recentně byly popsány i další druhy borelií izolovaných z lidských tkání, *B. bissettii*, *B. spielmanii* nebo *B. lusitaniae* a *B. valaisiana* (Wilske et al., 2007; Daniel et al., 2016).

Klíště se k hostiteli uchytí pomocí ozubených chelicer, jimiž prořízne pokožku a do vzniklé rány zasune hypostom (Obenchaim et al., 1982). V důsledku poranění jsou okamžitě spuštěny hostitelovy obranné mechanismy na úrovni buněčné i humorální imunity. Tyto obranné reakce mají jediný cíl – přerušit sání krve klíštětem a nechat ho odpadnout (Willadsen et al., 1999).

### 3.1.2 Interakce klíště - hostitel

Aktivní fáze životního cyklu *I. ricinus* se udává od března do října v závislosti na vnějších podmínkách, jako jsou vlhkost a teplota (Jaenson et al., 2011). Sání klíštěte je dlouhý a velmi komplexní proces. Samotné přísátí je pro hostitele fyzikálním a chemickým zásahem, jenž vede k vyvolání silné imunitní odpovědi. Přisátím klíštěte dochází k narušení pokožky hostitele a popraskání krevních vlásečnic. Za normálních okolností dochází ke konstrikcii cév, agregaci trombocytů, aktivaci koagulační kaskády a k vytvoření zánětlivé odpovědi doprovázené svěděním a bolestí. Všechny zmíněné obranné mechanismy narušují sání klíštěte a vedou k jeho rejekci, což se negativně podepisuje na životaschopnosti a reprodukčních schopnostech samotného klíštěte. Ovšem i přes rejekční reakci hostitele zůstává klíště přisáto a je schopno dosáhnout plného nasátí. Je to dáno tím, že klíštěcí sliny obsahují mnoho farmakologicky aktivních látek, bioaktivních proteinů a lipidů s antihemostatickými, protizánětlivými a imunomodulačními účinky. Všechny zmíněné fyziologicky aktivní složky jsou v průběhu sání produkovány v odlišné míře, působí redundantně a ve svých účincích jsou pleiotropní (Francischetti et al., 2009; Kazimirova et al., 2013; Chmelar et al., 2016).

Bylo prokázáno, že látky obsažené ve slinách klíšťat rovněž usnadňují přenos, přežití a množení některých klíšťatých přenášených patogenů v hostiteli. Tento jev se označuje jako slinami aktivovaný přenos neboli SAT (saliva-activated/assisted transmission). V experimentálních pokusech je přímým důkazem SAT efektu zvýšená infektivita patogena po jeho inokulaci společně se slinami nebo extraktem ze slinných žláz v porovnání s inokulací patogena samotného. SAT efekt byl poprvé popsán u arboviru Thogoto a klíštěte

*Rhipicephalus appendiculatus* (Jones et al., 1992). U morčat injekčně infikovaných Thogoto virem ve směsi s extraktem ze slinných žláz (SGE, salivary gland extract) v jednom místě došlo k úspěšnějšímu rozšíření viru než u morčat nakažených samotným virem.

Za nepřímý důkaz jevu SAT je považován neviremický přenos patogenů mezi nakaženými a nenakaženými klíšťaty, které společně sají na jednom hostiteli (Nuttall et Labuda, 2004). Dosud byl SAT efekt přímo i nepřímo pozorován u mnoha jiných patogenů přenášených klíšťaty, například *I. ricinus* a *B. afzelii* (Pechova et al., 2002), *I. ricinus* a *B. lusitaniae* (Zeidner et al., 2002) a *I. ricinus* a *B. burgdorferi* sensu stricto (Machackova et al., 2006). Ve slinách klíštěte *Ixodes scapularis* byl identifikován protein Salp 15, jež byl označen za první SAT faktor. Ukázalo se, že tento protein napomáhá k přenosu patogenů *B. burgdorferi* s.s. (Ramamoorthi et al., 2005). Jiným proteinem, který lze považovat za protein napomáhající přenosu *B. burgdorferi*, je sialostatin L2 z *I. scapularis* (Kotsyfakis et al., 2010).

### **3.1.3 Klíštěcí sliny**

Slinné žlázy jsou párový orgán, ve kterém dochází k tvorbě bioaktivních látek, které jsou v průběhu sání uvolňovány se slinami do hostitele (Obenchain et al., 1982). Sekrece slin je řízena neurohormonálně přes D1 dopaminový receptor přímo ve slinných žlázách (Simo et al., 2011). Slinné žlázy umožňují klíštěti i osmoregulaci, díky které je schopno koncentrovat přijímanou krev a vracet přebytečnou vodu zpět do hostitele, a to především v posledních dnech sání (Binnington et al., 1980). Touto cestou jsou přenášeny i patogeny přítomné v klíštěcích slinách (Wang et al., 1999).

Jak již bylo zmíněno, plné nasátí je potřebné pro dokončení životního cyklu klíštěte. Aby tak mohla učinit, musí být schopna potlačit imunitní reakci hostitele. Obrannými mechanismy hostitele proti klíštěti jsou hemostáza, aktivace komplementu a reakce na úrovni vrozené i adaptivní imunity.

#### **3.1.3.1 Vrozená imunita**

Do místa poranění způsobeného klíštětem během sání migrují leukocyty lokální zánětlivé reakce, tedy neutrofilů, makrofágů, žírné buňky, Langerhansovy buňky a prozánětlivé faktory uvolněné z poškozených endotelových buněk (Wikel et al., 1999). Klíčovou roli sehrávají makrofágy, jelikož v prozánětlivé odpovědi působí jako antigen prezentující buňky i jako významní producenti mnoha cytokinů a chemokinů např. IL-1, TNF- $\alpha$ , hydrolytické enzymy (Moser et al., 2008). Zánět je obecně doprovázen otokem

a bolestivostí, což jsou příznaky, které vedou hostitele k odstranění klíštěte. Proto si klíšťata vyvinula bioaktivní látky schopné ovlivňovat funkci makrofágů (Ramachandra et al., 1992).

Sliny z klíštěte *Ixodes ricinus* zvyšují produkci makrofágového zánětlivého proteinu MIP2 a MCP-1, který může v závěrečné fázi sání klíštěte stimulovat uvolnění histaminu, čímž zvyšuje prokrvení v místě přisátí klíštěte (Langhansova et al., 2015). Kýčková a Kopecký (2006) ve své práci prokázali snížení produkce prozánětlivého cytokinu TNF- $\alpha$  a sníženou schopnost fagocytózy spirochét *B. afzelii* myšimi makrofágy po působení slin i SGE z klíštěte *I. ricinus*.

Klíšťata *Ixodes ricinus* ve svých slinách obsahují kupříkladu protein Iris snižující produkci prozánětlivých cytokinů IL-6 a IL-8. Navázáním na monocyty či makrofágy Iris inhibuje i sekreci TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor) (Leboulle et al., 2002; Prevot et al., 2009). Sliny klíštěte *I. ricinus* jsou schopny snižovat expresi IL-9, IL-4 a IL-13 (Langhansova et al., 2012). Salp25D je pro změnu schopen neutralizovat oxidační reakce vyvolané aktivovanými neutrofily (Narasimhan et al., 2007). Správnou funkci neutrofilů mohou ovlivňovat slinné proteiny i snížením exprese  $\beta_2$  integrinů. Integriny zprostředkovávají migraci a adhezi buněk k místu sání, kde jsou důležité pro aktivaci imunitní odpovědi (Guo et al., 2009). Ribeiro et al. (1990) ve své práci rovněž popsal, že působením slinných proteinů klíštěte *I. scapularis* (dříve *I. dammini*) dochází ke snížení degranulace a infiltrace neutrofilů do místa sání klíštětem. Naopak lipokalin z *I. ricinus* snižuje nejen aktivaci, ale i chemotaxi neutrofilů (Beaufays et al., 2008).

Jiné druhy klíšťat syntetizují ve svých žlázách inhibitory IL-8 (chemoatraktant pro neutrofily) i jiných chemokinů (Hajnická et al., 2001; Vančová et al., 2010). Klíšťata si vyvinula proteiny, které jsou schopny regulovat zánětlivou reakci během krmení. Činí tak vázáním histaminu (HBP) produkovaného mastocyty (Paesen et al., 1999). Za zmínku stojí fakt, že u klíšťat byl objevený i faktor uvolňující histamin (HRF) (Mulenga et al., 2005), jež zajišťuje dostatečný přísun krve do místa sání. Později byla tato skutečnost vysvětlena tím, že klíště exprimuje oba faktory, HRF a HBP, v různých fázích svého sání dle potřeby snížit či zvýšit průtok krve místem sání (Dai et al., 2010).

V nedávné době byla ve slinách potvrzena přítomnost i neproteinových látek jako je prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) nebo adenosin. U PGE<sub>2</sub> bylo experimentálně zjištěno, že reguluje zánět a funkce různých buněk imunitního systému, např. aktivaci, maturaci a migraci dendritických buněk (Phipps et al., 1991; Harris et al., 2002). Protizánětlivé účinky

adenosinu jsou založeny na inhibici aktivace a rekrutace neutrofilů, na potlačení prozánětlivých cytokinů a chemokinů produkovaných makrofágy a současně na podpoře tvorby protizánětlivých cytokinů těmito buňkami, ale i na supresi funkce efektorových T-lymfocytů (Linden et Cekic, 2012; Haskó et Crostein, 2013). PGE<sub>2</sub> i adenosin jsou rovněž homeostatické faktory způsobující vasodilataci (Fredholm et al., 2011a).

### 3.1.3.2 Nespecifická imunita – komplement

Humorální složku nespecifické imunity představuje komplement, jehož cílem je lýza nežádoucího patogenu. Díky látkám přítomným v klišťecích slinách může být zablokována alternativní i klasická cesta komplementu skrze C3a a C5a složku (Ribeiro et al., 1987).

Ve slinách *Ixodes scapularis* byl identifikován specifický inhibitor aktivace alternativní cesty komplementu, protein Isac (Valenzuela et al., 2000). Z klišťete *I. ricinus* byly izolovány dvě isoformy genu pro tento protein, Irac 1 a Irac 2 (Schroeder et al., 2007). Oba proteiny jsou schopny se vázat na properdin, čímž inhibují funkci C3 konvertázy. Podobnou vlastnost vykazuje protein Salp20 izolovaný ze slin klišťete *Ixodes scapularis* (Tyson et al., 2007, 2008).

Dalším proteinem izolovaného ze slin klišťete *I. scapularis* je calreticulin (CRT). CRT váže Ca<sup>2+</sup> ionty a je schopen se vázat i na C1q složku komplementu, přičemž dochází k jeho inaktivaci (Ferreira et al., 2002; Kaewhom et al., 2008).

### 3.1.3.3 Specifická imunita

Specifickou složku buněčné imunity představují B-lymfocyty a T-lymfocyty.

Nejvýznamnější molekulou přítomnou ve slinách klišťete modulující specifickou imunitní odpověď je rodina proteinů Salp 15, jejichž primární úlohou je potlačení aktivace a proliferace CD4<sup>+</sup> T buněk. Vazbou Salp 15 na tyto buňky dochází k inhibici aktivace hydrolázy PLCy1, snížení příjmu Ca<sup>2+</sup> iontů do buňky, a tím snížení produkce interleukinu IL-2 (Garg et al., 2006; Juncadella et al., 2007). Byla také prokázána interakce s dendritickými buňkami, hlavními buňkami vývoje antigen-specifické imunity, kdy dochází ke snížení produkce protizánětlivých cytokinů vyvolané aktivací TLR (toll-like receptor) a potlačuje aktivaci T-lymfocytů (Hovius et al., 2008). Zástupci těchto proteinů byly objeveny u klišťete *Ixodes ricinus*, *I. scapularis*, *I. persulcatus*, *I. pacificus* (Hovius et al., 2007; Hojgaard et al., 2009). Sliny klišťete *I. scapularis* vylučují i IL-2 (BP - binding protein), který inhibuje mitogenem zprostředkovanou proliferaci T-buněk a potlačuje produkci IL-2 (Gillespie et al., 2001).

### 3.1.3.4 Hemostáza

Hemostáza neboli srážení krve je velice komplexní proces bránící ztrátám krve při poškození cév. Jedním z dějů vedoucích k zástavě krvácení je hemokoagulace. Postupnou aktivací koagulačních faktorů se spouští kaskáda enzymatických reakcí, kde inaktivní proenzym je přeměněn do aktivní formy a dochází k aktivaci dalších proenzymů. Klíčovou roli sehrává trombin. Trombin reguluje aktivitu krevních faktorů a stimuluje reakce krevních destiček. Účastní se konečné společné cesty koagulační kaskády, kde konvertuje fibrinogen na nerozpustný fibrin, který následně spojuje volně agregované trombocyty a vytváří definitivní sraženinu, trombus. Poté dochází k vazokonstrikci cév. Ta je způsobena serotoninem a tromboxanem A<sub>2</sub>, které jsou sekretovány trombocyty při jejich aktivaci.

Cílem klíštěte je zabránění nebo prodloužení krevní koagulace během sání (Koh et Kini, 2009; Kazimirova et al., 2010). Klíšťata *Ixodes pacificus* a *I. scapularis* používají k regulaci hemokoagulace ixodegriny, jejichž obranným mechanismem je vazba na fibrinogen, čímž naruší jeho vazbu na trombocyty (Francischetti et al., 2005). Ze slin *I. scapularis* byl rovněž izolován protein ixolaris známý jako inhibitor vnější cesty aktivace koagulační kaskády (Monteiro, 2005). Podobně Salp 14 je specifickým inhibitorem faktoru Xa (Narasimhan et al., 2002, 2004).

Dalším protisrážlivým proteinem klíšťat je inhibitor Ir-CPI z klíštěte *I. ricinus*, který specificky ovlivňuje faktory XIIa, XIa a kallikrein a prodlužuje aktivovaný tromboplastinový čas (aPTT) *in vitro* (Decrem et al., 2009). Mezi proteiny inhibující agregaci krevních destiček patří například apyráza z *I. scapularis* (Ribeiro et al., 1991).

Jiným mechanismem jak blokovat hemokoagulaci je ovlivňování vaskulární permeability (Chmelar et al., 2012), což je vlastnost, kterou vykazuje protein thrf (tick histamine release factor) z *Ixodes scapularis* nebo IRS-2 z *I. ricinus* (Chmelar et al., 2011). Mezi další významné inhibitory hemokoagulace, jejichž funkce jsou hojně studovány, patří cystatiny, inhibitory s tzv. Kunitz doménou či serpiny.

### 3.1.4 Inhibitory proteáz v klíštěcích slinách

Proteázy jsou enzymy štěpící peptidické vazby cílových proteinů na malé fragmenty. Popsány byly celkem čtyři typy proteáz – aspartylové, metalloproteázy, serinové a cysteinové. V lidském organismu hrají proteázy velmi důležitou roli mj. v obranných reakcích imunitního systému a při zánětu. Klíštěcí inhibitory těchto lidských proteáz působí

protizánětlivě a imunosupresivně (Wikel et al., 1999). Pro každý inhibitor je charakteristická doména, díky které je zmíněná inhibice proteolýzy umožněna (Francischetti et al., 2005).

#### **3.1.4.1 Inhibitory proteáz s Kunitz doménou**

Ve slinných žlázách byl identifikován relativně velký počet molekul patřící do skupiny tzv. Kunitz inhibitorů – (BPTI - bovine pancreatic trypsin inhibitors). Zástupci této rodiny jsou rozděleny podle prostorové struktury na jednodoménové inhibitory (Monolaris), dvoudoménové (Bilaris) a komplexní vícedoménové molekuly (Penthalaris), (Francischetti et al., 2005).

Protein ixolaris z rodiny TFPI (tissue factor pathway inhibitors) z klíštěte *I. scapularis* je charakteristický obsahem dvou Kunitzových domén. Jedná se o inhibitor vnější cesty aktivace koagulační kaskády, kde inhibuje faktorem VIIa/TF indukovaný fX (Francischetti et al., 2002). Bylo také zjištěno, že ixolaris interaguje s faktorem X skrze vazebné místo pro heparin, čímž inhibuje jeho aktivaci (Monteiro et al., 2005). Penthalaris obsahující pět Kunitzových domén specificky inhibuje faktor VII a váže se na fXa, fX (ve vyšších koncentracích byla potvrzena inhibice i fIX) (Francischetti et al., 2004).

#### **3.1.4.2 Cystatiny**

Cysteinové proteázy jsou proteolytické enzymy, které ve svém aktivním centru obsahují cystein, histidin a asparagin (Verma et al., 2016). Jsou důležité v metabolismu a degradaci proteinů (Kotyza et Krepela, 2002). Ve své struktuře mají přibližně 115 aminokyselin obsahujících čtyři cysteinové zbytky spojené disulfidickými můstky (Brown et Dziegielewska, 1997). Cystatiny schopné jak selektivní, tak specifické inhibice, jenž jsou obsaženy v klíštěcích slinách, potlačují funkci hostitelových cysteinových proteáz. Cystatiny jsou zkoumány především pro imunomodulační vlastnosti (Zhou et al., 2006). Dělí se do tří skupin – cystatiny 1. typu (stefiny, cytoplasmatické proteiny bez disulfidických můstků), 2. typu (dva disulfidické můstky) a 3. typu (kininogeny, proteiny o více doménách s třemi opakovanými cystatiny 2. typu) (Oliveira et al., 2003; Zhou et al., 2006). U řady klíšťat byly identifikovány cystatiny 1. a 2. typu, ovšem intenzivněji studovány jsou cystatiny 2. typu.

Sialostatin L a sialostatin L2 jsou cystatiny přítomné ve slinách *I. scapularis*. Svou funkcí se řadí mezi imunosupresivní a protizánětlivé proteiny. SialoL inhibuje katepsin L, V, C, S a papain (Kotsyfakis et al., 2006, 2007). SialoL potlačuje proliferaci cytotoxických T lymfocytů *in vitro* a dále vykazuje inhibiční účinky na lipopolysacharidem indukovanou maturaci dendritických buněk (Kotsyfakis et al., 2006). SialoL2 vykazuje podobnou afinitu

ke katepsinům L a V. Prokázalo se, že sialoL2 napomáhá klíštěti dokončit proces sání a ovlivňuje hostitelovu imunitu, neboť tento protein se během sání hromadí ve slinných žlázách, kdežto množství transkriptů sialoL klesá. Pokud byla exprese těchto dvou proteinů pomocí RNA interference vypnuta, klíšťata nebyla schopná dokončit proces sání a uhynula. Klíšťata, která byla schopná dokončit sání, měla výrazně sníženou hmotnost v porovnání s kontrolní skupinou a rovněž nakladla méně vajíček (Kotsyfakis et al., 2007). Podobného výsledku bylo dosaženo i u nymf *I. scapularis* (Kotsyfakis et al., 2008). SialoL2 podporuje i přenos spirochét *B. burgdorferi* z klíštěte na hostitele (Kotsyfakis et al., 2010).

### 3.2 SERPINY (Serin Protease Inhibitors)

Serpiny jsou největší rodinou proteázových inhibitorů. Jsou hojně distribuovány do celého organismu a zapojují se do mnoha biologických procesů jako je koagulace krve, fibrinolýza, apoptóza nebo zánět. Funkčně jsou tyto inhibitory velmi rozmanité proteiny (Irving et al., 2000), jejichž geny byly identifikovány u savců, poxvirů, rostlin, bakterií a u archaeí. Doposud bylo objeveno přes 1500 členů této rodiny. Analýzou genomů bylo odhaleno, že serpiny jsou exprimovány všemi mnohobuněčnými eukaryoty včetně člověka (Irving et al., 2000; Silverman et al., 2001), zatímco prokaryota mají pouze jeden jednoduchý gen pro serpin a serpiny jsou u nich přítomny zřídka (Silverman et al., 2001). Většina serpinů inhibuje serinové proteázy, byly ovšem objeveny i takové, které potlačují kaspázy zajišťující apoptózu nebo cysteinové proteázy podobné papainu (Schick et al., 1998; Irving et al., 2002). Zrovna tak existují i serpiny, které fungují jako hormonální přenašeči nebo jako chaperony či tumor supresorové geny (Pemberton et al., 1988; Zou et al., 1994; Nagata et al., 1996). Studie zabývající se strukturou serpinů odhalila, že serinové inhibitory fungují jako sebevražedné enzymy, které užívají unikátní konformační změny k inhibici proteázy (Huntington et al., 2000), čímž jsou serpiny labilnější a zranitelnější k mutacím (spontánní konformační změny, formace inaktivace serinových polymerů, deficiencie či chybné složení proteinu) (Carrell et al., 1997).

Serpiny s inhibiční aktivitou fungují extracelulárně i intracelulárně. Extracelulární serpiny jsou důležité při kontrole proteolytických kaskád v krevní plasmě, tedy při koagulaci. Intracelulární serpiny slouží k ochraně buňky před cytotoxickými proteázami (Whisstock et al., 2005). Tyto dvě rozsáhlé skupiny zahrnují u lidí celkem 36 serpinů, které jsou rozlišovány jako extracelulární molekuly skupiny „A“ (13 členů na chromozomu 1, 14



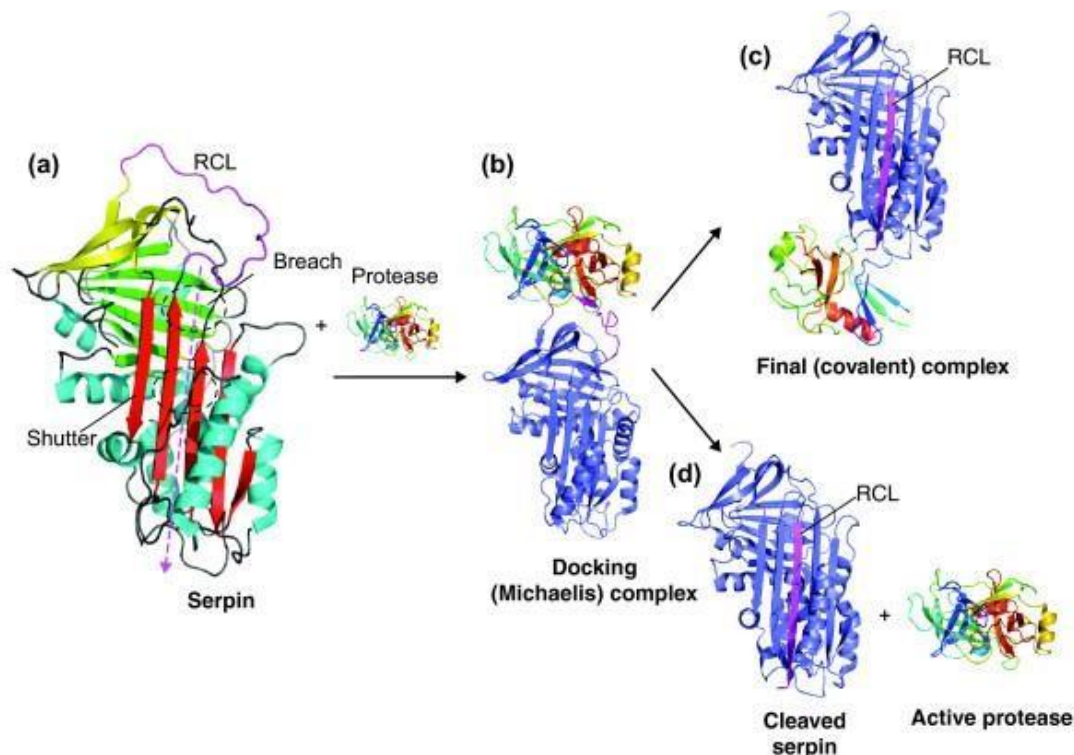
a X) a intracelulární serpiny skupiny „B“ (13 zástupců na chromozomu 18 a 6) (Silverman et al., 2001).

### 3.2.1 Strukturální charakteristika a mechanismus inhibice

V porovnání s jinými proteázovými inhibitory jsou serpiny relativně velké molekuly o 330-500 aminokyselinách (Ruhlmann et al., 1973). Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 40–50 kDa. Serpiny jsou složeny ze tří  $\beta$  listů (A, B a C) a 8-9  $\alpha$  helixů (hA-hI). Důležitá oblast zodpovědná za interakci s cílovými proteázami se nazývá smyčka reaktivního centra (RCL - reactive center loop). Tato smyčka, která nápadně vyčnívá nad horní oblastí serpinu, tvoří pružný úsek 17 aminokyselin. Složení těchto aminokyselin je charakteristické pro každý serpin. RCL obsahuje místo rozpoznání proteinu (Silverman et al., 2001). V RCL oblasti se nachází takzvaný „scissile bond“ (P1- P1' residua), který se po aktivaci proteolýzy oddělí (Li et al., 1999).

Princip mechanismu působení serpinů je navázání proteázy, což vyvolá dramatickou změnu konformace proteinu. Následuje proteolýza, amino-terminální konec RCL smyčky se vloží do centra  $\beta$  skládaného listu A, čímž vytvoří nové čtvrté vlákno (s4A). Tento konformační přechod se odborně označuje jako „stressed (S) -to-relaxed (R)“ transformace vyvolaná zvýšenou teplotou ovlivňující stabilitu serpinu během štěpení RCL smyčky. Nativní serpiny jsou výjimečné, neboť se vyskytují převážně v metastabilním stavu (Cabrita et al., 2004).

Serpiny využívají k inhibici cílových proteáz již zmíněný „S-to-R“ proces. Podrobnější studie zabývající se strukturou těchto proteinů odhalila, že odštěpením RCL smyčky a následnou inzercí do  $\beta$  listu A je zajištěna efektivní inhibice dané proteázy. Struktura finálního serpin-proteázového komplexu ukázala, že serpin se nachází v rozvolněné konformaci a proteáza zůstává kovalentně vázaná k serpinu acylovou vazbou (Huntington et al., 2000). V porovnání s přirozenou konformací je proteáza v konečném komplexu výrazně deformovaná (Huntington et al., 2000). Fluorescenční studie později prokázala, že tato proteáza ve finálním komplexu nemusí být zcela zavřena svému okolí, což je dáno přítomností tzv. residuí (Tew et al., 2001).



**Obr. 2: Struktura a mechanismus inhibice serpinů** (Law et al., 2006). (a) struktura nativního serpinu SERPINA1. A  $\beta$ -skládaného listu je červené, B zelené a C žluté. Modrou barvou jsou označeny  $\alpha$ -helixy. RCL smyčka se nachází na vrcholu serpinu. Přerušovanou čarou je znázorněna cesta RCL smyčky protínající serpin (Elliot et al., 1996). (b) Michaelisův komplex mezi SERPINA1 a inaktivním trypsinem, s proteázou (odlišena barevně) navázanou v RCL smyčce (Dementiev et al., 2003). Při navázání proteázy následují dvě možnosti: (c) Finální kovalentně vázaný komplex serpin-enzym podléhající S-to-R transformaci (Huntington et al., 2000) nebo (d) struktura odštěpeného serpinu s RCL smyčkou vkládající se do  $\beta$ -skládaného listu A (Loebermann et al., 1984).

Zmíněné konformační změny vedou k distorzi v aktivním místě, efektivní hydrolýze acylových vazeb a uvolnění proteázy. Tím, že dochází k absolutnímu odštěpení oblasti RCL, jsou serpiny charakteristické jako sebevražedné inhibitory. Inhibiční aktivita serpinů může být kontrolována kofaktory, což je jedna z výhod v porovnání s ostatními menšími proteázami. Příkladem je lidský SERPINC<sub>1</sub> (antitrombin), který je slabým inhibitorem trombinu a faktoru Xa, dokud není aktivován kofaktorem – heparinem (Rezaie, 1998).

### 3.2.2 Funkční význam serpinů

U serinových proteáz byly zjištěny rozmanité funkce v mnoha procesech – ve skládání dvoušroubovice DNA, kondenzaci chromatinu u kuřecích erytrocytů (Irving et al., 2002), v imunoregulaci hmyzu (Levashina et al., 1999), v embryonálním vývoji hlístic (Pak et al., 2004) či v regulaci apoptózy (Ray et al., 1992).

Inhibitory serinových proteáz jsou klasifikovány do dvou funkčních skupin lišících se schopností inhibovat buď trypsin (trombin), nebo chymotrypsin (elastáza) (Blisnick et al., 2017). U lidí se vyskytuje 29 serpinů fungujících jako inhibiční molekuly, zatímco zbývajících 7 zastávají funkci neinhibičních serpinů (Heit et al., 2013).

V lidském organismu serpiny skupiny A zahrnují zánětlivé molekuly jako antitrypsin (SERPINA<sub>1</sub>) nebo antichymotripsin (SERPINA<sub>3</sub>), zrovna tak sem patří serpiny fungující jako „neinhibiční“ transportery hormonů SERPINA<sub>6</sub> (globulin vázající kortikosteroid) a SERPINA<sub>7</sub> (globulin vázající thyroxin). Serpiny skupiny B se podílejí především na regulaci apoptózy, což znamená, že brání nežádoucí cytotoxické aktivitě apoptických proteáz (SERPINB<sub>6</sub>, SERPINB<sub>9</sub>). Rovněž tyto serpiny potlačují enzymy podobné papainu (SERPINB<sub>3</sub>, carcinoma antigen-1) nebo SERPINB<sub>5</sub> (maspin) (Zou et al., 1994; Law et al., 2005).

Jak bylo již zmíněno, serpiny jsou náchylné k destabilizujícím mutacím (Whistock et al., 2005). Mutace v kritické oblasti může způsobit, že RCL jedné molekuly se vloží do  $\beta$  listu A jiné molekuly, přičemž vytvoří vazbu smyčka- $\beta$ -skládaný list. Následně dochází k polymerizaci této vazby a k agregaci (Khan et al., 2011). U mnoha onemocnění byla prokázána souvislost s funkční deficiencí serpinů. S polymerizací serpinů je spojen např. emfyzém - deficience antytrypsinu (Lomas et al., 1992), trombóza - deficience antitrombinu (Bruce et al., 1994) nebo angioedém - deficience inhibitoru C1 esterázy (Aulak et al., 1988). Hromadění polymerů v endoplasmatickém retikulu může též přispět k onemocnění jako je cirhóza (polymerizace SERPINA<sub>1</sub>) (Lomas et al., 1992) či demence (polymerizace SERPINI<sub>1</sub> v neuronech) (Davis et al., 1999). Další choroby jsou vyvolané mutacemi serpinů, jež ovlivňují specifickou nebo inhibiční funkci daného serpinu (Stein et al., 1995).

Leboulle a kolektiv (2002) sestrojili dvě cDNA knihovny, první ze slinných žláz hladových klíšťat *I. ricinus* a druhou ze slinných žláz klíšťat krmených po dobu 5 dnů. V prvním případě se nenašly žádné sekvence, které by vykazovaly podobnost s již známými sekvencemi. Naopak sekvence z druhé cDNA knihovny prokázaly homologii se známými

geny. Ukázalo se, že sekvence z této cDNA knihovny jsou podobné antikoagulantům, inhibitorům srážení trombocytů nebo proteinům podílejících se v imunitní odpovědi. Konkrétně sekvence Seq24 se shoduje s geny z rodiny serpinů jako je lidský inhibitor trombinu nebo prasečí monocytové/neutrofilové inhibitory elastáz. Chmelař a kolektiv (2008) sestavili 4 cDNA knihovny z různě nasátých samic klíštěte *I. ricinus*. Z každé knihovny bylo náhodně vybráno, osekvenováno a analyzováno 600 klonů. Odhalilo se, že 62 sekvencí obsahovalo Kunitz doménu charakteristickou pro inhibitory trypsinu. Ukázalo, že transkripce těchto genů je zvýšena již první den po přisátí a postupně klesá s dalšími dny sání, což naznačuje, že hrají důležitou roli během sání.

V současné době se sekvenuje a analyzuje funkce dalších inhibitorů serinových proteáz.

### 3.3 Serpiny u krevsajících členovců

Serpiny jsou součástí imunity řady členovců a zastupují rozmanité fyziologické funkce. U hmyzu kupříkladu regulují vrozenou imunitu prostřednictvím inhibice kaskády spouštěnou sérií serinových proteáz. Inhibicí jsou iniciovány imunitní odpovědi jako je melanizace a produkce antimikrobiálních peptidů (Gregorio De E. et al., 2002). Zrovna tak byly objeveny příklady serpinů mající vliv na vývoj a reprodukci octomilek (Coleman et al., 1995; Mueller et al., 2007) nebo lišaje *Manduca sexta* (Zou et al., 2005). Významně studovanou skupinou jsou serpiny exprimované ve slinných žlázách krevsajících členovců - klíšťat a komárů. Charakterizace inhibitorů proteáz v klíštěti je přínosná, jelikož inhibitory hrají důležitou roli v regulaci trávení hemoglobinu (Renard et al., 2002).

Prvním identifikovaným serpinem byl alboserpin, hlavní antikoagulant ve slinách komára *Aedes aegypti* a *Ae. albopictus* (Stark et al., 1995; Calvo et al., 2011). Alboserpin potlačuje koagulaci *in vitro* a *in vivo* prostřednictvím inhibice faktoru Xa, a to neobvyklým způsobem inhibice, která je charakterizována reversibilní interakcí proteinázy a inhibitoru v poměru 1:1 (Stark et al., 1998; Calvo et al., 2011). Alboserpin je také schopen vázat fosfolipidy, heparin a zřejmě i jiné glykosaminoglykany, které pravděpodobně usnadňují lokalizaci alboserpinu k místu zranění a/nebo agregaci trombocytů (Calvo et al., 2011). Nicméně se ukázalo, že alboserpin je spíše evoluční výjimkou, neboť sliny komárů neobsahují mnoho serpinů (Calvo et al., 2007).

Mnohem méně se ví o biochemických a funkčních vlastnostech serpinů exprimovaných v klíštěti *Ixodes scapularis*. Existuje pouze jeden charakterizovaný serpin,

konkrétně IxscS-1E1 s argininem v P<sub>1</sub> místě. Rekombinantní IxscS-1E1 *in vitro* inhibuje trombin a trypsin, potlačuje agregaci krevních destiček a prodlužuje dobu srážení krve zprostředkovanou inhibicí trombinu *in vivo* (Ibelli et al., 2014). Nicméně nebyl prokázán vliv tohoto serpinu na aktivaci klasické cesty komplementu (Ibelli et al., 2014). Jiným a zároveň jediným charakterizovaným serpinem ze slin klíštěte *Ixodes persulcatus* je serpin Ipis-1 (Toyomane et al., 2016). Transkriptomy byly detekovány pouze ve slinných žlázách, a to ve všech fázích krmení. Toyomane et al. (2016) zjistili, že Ipis-1 významně snižuje produkci IFN- $\gamma$  a předpokládají, že by tento serpin mohl inhibovat funkci T buněk po přímé interakci s těmito buňkami.

Z klíštěte *Rhipicephalus haemophysaloides* byly charakterizovány dva serpiny, konkrétně RHS-1 a RHS-2. Serpiny byly exprimovány ve slinných žlázách a ve střevě klíšťat krmených po dobu 4 dnů. Ukázalo se, že oba serpiny inhibují chymotrypsin a RHS-1 rovněž i trombin (Yu et al., 2013).

Nedávno byly funkčně analyzovány další serpiny jiných klíštěcích druhů, například RmS-3,-6,-7 a -15 ze slin *Rhipicephalus microplus* (Tirloni et al., 2016; Xu et al., 2016). Inhibitory RmS-3 a RmS-17 se podílejí na inhibici agregace trombocytů, zatímco serpiny RmS-15 a RmS-17 prodlužují srážení krve (Mulenga et al., 2013; Kim et al., 2015). U serpinů 6 a 19 izolovaných ze slin klíštěte *Amblyomma americanum* bylo zjištěno, že usnadňují přenos ehrlichiozy. Serpin19 je schopen inhibovat několik serinových proteáz v koagulační kaskádě, a tím vytvářet komplexy s faktory Xa, XIa a trypsinem (Kim et al., 2015).

### 3.4 Serpiny u klíštěte *Ixodes ricinus*

Pro klíšťata jsou serpiny spolehlivou kontrolou homeostázy a imunity hostitele. Nejlépe charakterizovaným serpinem je protein Iris, významný imunopresor ze slin klíštěte *Ixodes ricinus*. Iris je aktivní inhibitor serinové proteázy s P<sub>1</sub> methioninem. Iris je upregulovaný během krevního sání (Leboulle et al., 2002) a vyznačuje se pleiotropními účinky na imunitní systém a homeostázu. Iris se chová jako antikoagulant a zasahuje do fibrinolýzy inhibicí serinových proteáz, zvláště elastázy a tkáňového plasminogenu (Prevot et al., 2006). Bylo rovněž zjištěno, že Iris zasahuje do hemostázy potlačením adheze krevních destiček dosud neznámým mechanismem (Prevot et al., 2006). Vedle homeostatických účinků Iris inhibuje sekreci i prozánětlivých cytokinů (INF- $\gamma$ , IL-6) produkovaných T-buňkami nebo makrofágy, stejně tak potlačuje sekreci i TNF- $\alpha$  (Leboulle

et al., 2002). Protizánětlivá funkce Iris je zprostředkována fyzikální vazbou Iris na buněčné monocyty/makrofágy, přičemž nevyžaduje inhibiční aktivitu. Předběžnou analýzou s využitím peptidových protilátek bylo zjištěno, že tato funkce Iris pravděpodobně spoléhá na přítomnost vnějších částí (tzv. exosites) v helixech D a E (Prevot et al., 2009).

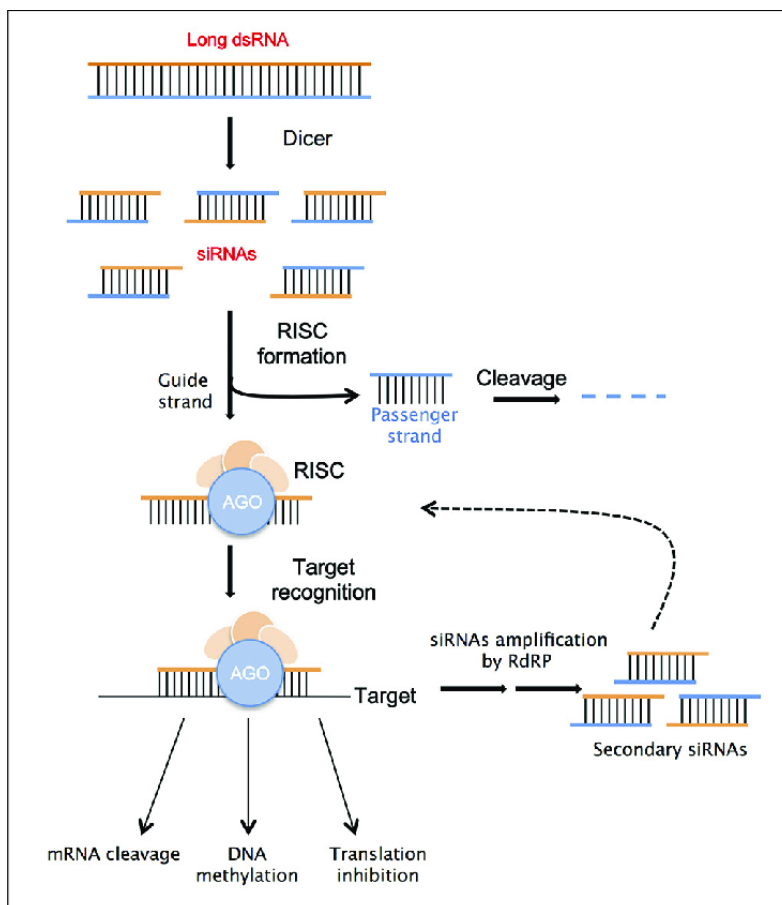
Druhý serpin získaný z klíštěte *Ixodes ricinus*, jehož protizánětlivá aktivita je založena výhradně na jeho funkci jako inhibitoru serinových proteáz, se nazývá IRS-2 (Chmelar et al., 2011). Podobně jako Iris, IRS-2 je sekretován během sání do klíštěcích slin a následně vyloučen do hostitele. V pokusech s využitím myši jako akutních zánětlivých modelů se zjistilo, že IRS-2 je schopen předcházet vzniku edému a zabránit hromadění neutrofilů v zánětlivých tkáních. Bylo potvrzeno, že P<sub>1</sub> místem pro IRS-2 je tyrosin 341, indikující inhibiční aktivitu proti serinovým proteázám podobných chymotrypsinu (Chmelar et al., 2011). Zaměřuje se na dvě cílové prozánětlivé serinové proteinázy, katepsin G a chymázu žírných buněk, a ve vysokých koncentracích i trombin. Tím, že IRS-2 potlačuje katepsin G a trombin, ovlivňuje srážení krve, neboť blokuje agregaci trombocytů (Chmelar et al., 2011). V další studii bylo prokázáno, že IRS-2 interferuje s buňkami získané imunitní odpovědi (Palenikova et al., 2015). Ukázalo se, že IRS-2 inhibuje diferenciaci buněčné subpopulace Th17 zeslabením signalizační dráhy IL-6/STAT3. Aktivované dendritické buňky produkují mj. IL-6, který spouští onu signalizační dráhu. STAT3 je po aktivaci IL-6 hlavním transkripčním faktorem této signalizační cesty. Palenikova a kolektiv (2015) zjistili, že IRS-2 selektivně inhibuje IL-6 produkovaný DC buňkami stimulovanými spirochetami rodu *Borrelia*, což vede k atenuaci fosforylace STAT3 faktoru a ovlivnění Th17 diferenciaci.

### 3.5 RNA interference

RNA interference (RNAi) je evolučně konzervovaný přirozený jev, který ovlivňuje genovou expresi. Existence RNAi byla poprvé zaznamenána vědcem Napoli et al. (1990), který prováděl experimenty s petúniemi. Cílem tohoto pokusu bylo vnést do rostlin gen pro chalcon syntázu, jež se uplatňuje v biosyntéze flavonoidů. Analýzou RNA u transformovaných rostlin v porovnání s rodičovskými byla zjištěna snížená úroveň mRNA produkovaná genem pro chalcon syntázu. Ovšem za objev RNAi získali Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu profesori A. Z. Fire a C. Mello (2006), kteří jako první popsali molekulární podstatu procesu RNAi při pokusech prováděných u hád'átka *Caenorhabditis*

*elegans* (Fire et al., 1998). Cílem experimentu bylo vnesení antisense vlákna RNA do *C. elegans* a zablokování genu *unc-22*, jehož mRNA byla komplementární k antisense RNA. Dle očekávání se jednovláknová antisense RNA navázala na mRNA genu, což vedlo ke vzniku dvouvláknové RNA (dsRNA), a translaci cílového proteinu tak bylo zabráněno. Jako kontrolu vnesli do několika háďátek rovněž sense RNA. Tím zjistili, že aplikace sense RNA zrovna tak vyvolala inaktivaci genu *unc-22*. Důvodem byla ovšem kontaminace připraveného transkriptu malým množstvím dsRNA, která způsobila degradaci mRNA cílového genu. Úspěšná inaktivace cílového genu prostřednictvím antisense RNA byla rovněž způsobena kontaminací transkriptu. Je možné tvrdit, že iniciátorem RNAi je dvouvláknová RNA. Později se ukázalo, že i u jiných eukaryotních organismů jakou jsou houby, protozoa, zástupci bezobratlých nebo savci včetně člověka, je možné tento děj pozorovat (Cogoni et Macino, 2000; Cerutti et Casas-Mollano, 2006).

RNAi slouží k regulaci genové exprese prostřednictvím dsRNA. Během procesu dochází k interferenci mezi dsRNA a komplementární mRNA, jež kóduje určitý gen. K utlumení genové exprese (genový silencing) prostřednictvím dsRNA dochází buď na úrovni transkripční, nebo na úrovni posttranskripční. V prvním případě jde o aktivaci RNAi pomocí exogenní siRNA, kdy je cílová mRNA rozštěpována (a to buď rozdílnou methylací, nebo vazbou specifických proteinů na DNA), což vede k pozastavení exprese odpovídajícího genu. V druhém případě se jedná o regulaci exprese endogenních genů přes miRNA. mRNA je následně rozpoznána za pomoci endogenní miRNA a výsledkem je zastavení translace daného genu (Berkhout et Haasnoot, 2006).



**Obr. 3: Stručný mechanismus RNA interference** (Limera et al., 2017).

Dvouvláknová molekula RNA se naváže na Dicer – protein, jenž rozštěpí dlouhou RNA molekulu na krátké interferující fragmenty RNA (siRNA). Tyto molekuly siRNA se postupně váží na molekulu AGO, proteinovou část komplexu vyvolávající umlčování RNA (RISC). RISC postupně separuje siRNA do dvou řetězců: vedlejšího řetězce (modrá barva), jenž je degradován, zatímco hlavní řetězec (oranžová barva) sloužící jako průba spojuje komplex RISC s komplementární RNA. Po rozpoznání cílové sekvence mRNA následuje regulace exprese genů několika odlišnými způsoby (zde za přítomnosti RNA dependentní polymerázy). Podobně je tomu tak u RNAi vyvolanou přes miRNA (v cytoplasmě se naváže na ribonukleovou částici a rovněž ji rozdělí na dva řetězce jako je tomu u siRNA).

RNAi je přirozeným mechanismem obrany genomu proti parazitickým DNA jako jsou transpozony (Dernburg et al., 2000) a nukleovým kyselinám RNA virů (Mourrain et al., 2000). Zrovna tak slouží k obraně vůči abiotickému stresu či k regulaci chromatinu. Bylo prokázáno, že porucha v genech zodpovídajících za RNAi vede u organismů často k poruchám morfologického vývoje nebo k poruchám diferenciaci buněk (Grishok et al., 2001).

RNA interference je důležitou metodou pro analýzu funkce genů u eukaryot. Selektivním vyřazením funkce určitého genu lze pozorovat utlumení příslušného fenotypového projevu. V této diplomové práci jde o případ transkripčního umlčování genů se zbytkovou expresí kolem 12 %.



### 3.5.1 Experimentální využití RNAi u klíšťat

RNAi se u klíšťat používá pro výzkum střevních trávicích enzymů, antikoagulačních a imunomodulačních slinných proteinů a proteinů, které ovlivňují vztah mezi klíštětem a virem, bakterií nebo parazitem. Do klíšťat lze dsRNA vnášet až čtyřmi různými metodami (de la Fuente et al., 2007), z nichž nejpoužívanější je aplikace dsRNA pomocí mikroinjekce. Další metodou je přidání dsRNA přímo do stravy nymf nebo dospělců (Soares et al., 2005). Jinou metodou je inkubace klíšťat nebo „namáčení“ jejich orgánů do roztoku dsRNA (Bowman et Sauer, 2004) a/nebo pro zkoumání RNAi dráhy lze klíšťata infikovat RNA virem (Garcia et al., 2005).

Pomocí RNAi byla určena nebo ověřena funkce slinných proteinů, které mají významnou roli při ovlivňování sání klíšťat. Jedním z nich je například protein s antikagulační funkcí Salp14 z *I. scapularis* (Narasimhan et al., 2004). Za pomoci dsRNA se specifickou sekvencí Salp14 se podařilo umlčet i jiné paralogy tohoto proteinu (Salp9pac). Důsledkem silencingu Salp14 byla snížená schopnost klíštěte sát. U klíštěte *A. americanum* byl pomocí dsRNA inhibován homolog synaptobrevinu a homolog nSec1, což způsobilo sníženou schopnost sekrece antikoagulačních látek do slin během sání, čímž byla rovněž utlumena schopnost klíšťat sát (Karim et al., 2004a; 2004b). Jiné studie se zabývaly zkoumáním funkce subolesinu. Subolesin je protein charakterizovaný jako protektivní antigen ovlivňující trávení nasáté krve, reprodukci a vývoj klíšťat. V pozdějších studiích byl prokázán vliv subolesinu i na genovou expresi (de la Fuente et al., 2008). Fuente et al. (2005) za pomoci RNAi provedli mapování obranných antigenů klíšťat, čímž se subolesin stal jedním z cílových proteinů pro výzkum a vývoj klíštěcích vakcín. Tento protein byl studován u různých druhů klíšťat – *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus microplus*, *R. sanguineus*, *I. scapularis* aj. Během RNAi došlo ke snížení koncentrace mRNA subolesinu, což vedlo u klíšťat k úbytku hmotnosti, ke snížení schopnosti samic klást vajíčka a vůbec k celkovému poklesu vitality jedinců (de la Fuente et al., 2006a; 2006b; Nijhof et al., 2007).

RNAi byla rovněž použita ve výzkumu funkce střevních antikoagulantů a trávicích enzymů. Haemalin, známý svou důležitostí pro rozklad krve v trávicím systému klíštěte *Haemaphysalis longicornis* a pro inhibici agregace krevních destiček, byl pomocí dsRNA umlčen, čímž došlo k znemožnění sání (Liao et al., 2009). RNAi umožnila objasnit i metabolismus železa u klíštěte *I. ricinus*. Bylo zjištěno, že ferritin 2 hraje významnou roli

při vstřebávání železa z nasáté krve a jeho využití v dalších tkání. Silencingem mRNA pro ferritin 2 došlo k obtížím při sání klíšťat (Hajdusek et al., 2009).

Slinné i střevní proteiny mimo jiné mají velký význam při imunitní reakci a toleranci patogenů přenášených klíšťaty způsobujících závažné onemocnění, jako je například lymeská borelióza. Lymeskou boreliózou (*B. burgdorferi*) se zabývají mnohé studie, přičemž jedna z nich se zaměřuje na proteiny Isac a jejich umlčení u *I. scapularis*. Díky RNAi, která vedla ke snížené expresi těchto proteinů, byla zjištěna snížená množství borelií v trávicí soustavě klíštěte (Soares et al., 2005). Pal et al. (2004) umlčením mRNA TROSPA genů, kódujících střevní proteiny umožňující navázání patogenu na střevní epitel klíštěte, dosáhli rovněž sníženého počtu borelií v klíštěti. RNA interference byla použita i pro bližší zkoumání funkce slinného proteinu Salp15 u klíšťat rodu *Ixodes*. Ukázalo se, že Salp15 sehrává roli při interakci s *B. burgdorferi*, neboť vazebné domény Salp15 jsou komplementární k povrchovým proteinům bakterie (Hojgaard et al., 2009).

Výše zmíněné metody vnášení dsRNA jsou používány ke zkoumání nebo ověření funkce mnoha jiných proteinů i u dalších krevsajících členovců. Ale protože cílem této diplomové práce je zhodnocení vlivu RNAi na fitness klíšťat *I. ricinus* a přenos borelií na myšího hostitele, není jim věnována větší pozornost.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Izolace RNA a příprava cDNA

cDNA byla připravena z nenasátých, částečně nasátých a plně nasátých neinfekčních nymf klíštěte *Ixodes ricinus* darovaných z chovného zařízení Parazitologického ústavu (Biologické centrum, AVČR). Byly použity nymfy nenasáté (označené D0), nymfy sající jeden den (D1), sající 2 dny (D2) a plně nasáté nymfy sající 3-4 dny (D3/4). Ve skupině D0 bylo použito 28 nenasátých nymf, ve zbylých třech skupinách bylo nasazeno na myši po 17 nymfách. Protože ale není možné bezpečně odstrojit všechny nasazené částečně nasáté nymfy, bylo rozdělení následující: D0 = 28 nymf, D1 = 14 nymf, D2 = 9 nymf a D3/4 = 9 nymf.

Nymfy byly nasazeny na tři myši samice C3H/HeN v SPF kvalitě původem z Charles River Laboratories. V době pokusu byly staré 10 týdnů a byly umístěny v klecovém systému IVC (sterilní stelivo, krmivo a sterilní voda okyselená HCl na pH 3, voda i dieta *ad libitum*). Na vyholený hřbet myši byly umístěny tzv. kloboučky, do kterých byly následně přidány nymfy. Nymfy byly z myši odebírány podle výše popsaných skupin. Strojení/odstrojení myši probíhalo ve zvěřinci PAÚ s pomocí Jana Erharta, a to ve všech pokusech.

V rámci každé skupiny byly nymfy rovnoměrně rozděleny tak, aby na jeden časový interval byly 3 vzorky izolované RNA. Poté byla z těchto nymf izolována RNA pomocí TRIZOLu podle následujícího protokolu:

1. Nymfy na podložním sklíčku rozsekat žiletkou a přemístit do mikrozkušavek.
2. Přidat 500  $\mu$ l TRIZOLu (TRI Reagent, MCR).
3. Nechat 5 min odstat při pokojové teplotě (RT).
4. Přidat 100  $\mu$ l chloroformu (SERVA) a vortexovat 15 s na maximální otáčky.
5. Nechat opět 2 min při RT.
6. Centrifugovat 15 min při 12 000 g v chlazené centrifuze (HERMLE Labortechnik GmbH, Z326K).
7. Odebrat horní fázi do čistých RNase-free zkumavek.
8. Přidat isopropanol (SERVA) v poměru 1:1.
9. Promíchat 10x v ruce.

10. Nechat odstát 10 min při RT.
11. Centrifugovat 10 min při 10 000 g.
12. Opatrně slít supernatant a přidat 800  $\mu$ l 80% ethanolu (VWR Chemicals).
13. Opět centrifugovat 7 min při 10 000 g.
14. Slít supernatant, osušit a centrifugovat 15 s při 10 000 g.
15. Zbylou tekutinu odsát pipetou a nechat 5-10 min vyschnout na vzduchu.
16. Rozpustit ve 20  $\mu$ l čisté vody (PCR grade).
17. Změřit koncentraci a čistotu na nanofotometru (IMPLEN, P330).

Izolovaná RNA byla uskladněna při  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Reverzní transkripce byla poté převedena do cDNA podle kitu *Transcriptom First Strand cDNA Synthesis kit* (Roche) v thermocycleru (T100<sup>TM</sup> Thermal cycler, BioRad). Do reakční směsi pro každý vzorek byl přidán 1  $\mu$ g RNA doplněný vodou na objem 18  $\mu$ l. Poté bylo přidáno 1,5  $\mu$ l oligo dT, 6  $\mu$ l pufru, 0,75  $\mu$ l inhibitoru, 3  $\mu$ l dNTPs a 0,75  $\mu$ l reverzní transkriptázy. Reakční směsi byly vloženy do thermocycleru s následujícím průběhem reakce: 30 min při  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 min při  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  a chlazení  $\infty$  při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . cDNA byla 5x naředěna PCR vodou a uložena při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## **4.2 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase**

### **4.2.1 Princip metody**

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce vychází z klasické PCR, která je ovšem obohacená o kvantifikaci produktu PCR v reálném čase, tedy již v průběhu reakce. Tato metoda se jinak označuje jako qPCR či real-time PCR a představuje důležitou metodu při studiu exprese genů (Heid et al., 1996).

Principem qPCR je detekce množství DNA pomocí fluorescenčně značeného substrátu (v tomto případě SyberGreen), jenž je zaznamenáván detektorem po jeho navázání na přítomnou dvojvláknovou DNA, a to v každém cyklu PCR. qPCR je považována za velmi citlivou metodu pro detekci DNA (Higuchi et al., 1993).

#### 4.2.2 Navrhnutí primerů serpinových genů

qPCR metoda byla použita pro stanovení expresních profilů 10 serpinových genů v průběhu sání nymf. Primery pro tyto geny byly navrženy v programu Oligoanalyzer (<https://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) tak, aby nasedaly na templát při teplotě 62 °C a obsahovaly 50 % GC párů. Primery byly syntetizovány firmou Generi Biotech (ČR). Primery byly otestovány pomocí qPCR za stejně definovaných podmínek, jako templát byla použita starší cDNA z klíčecích nymf. Sekvence primerů deseti vybraných genů jsou shrnuty v tabulce 1.

**Tab. I: Primery použité pro qPCR.**

Název	Sekvence (5'→3')
IRS-10	GTCTTGCTGAACGCCATCTA GTGTCGACTAGTGTAGGAGAG
IRS-13	CACAGCTGGTGGATCGTAAA GGTCCGAAGCGAGTATTCTG
IRS-16	GATGCCACGACCTTTCTACA CTCTCGAACTGAGGCTATCAAG
IRS-20	CCTCTTGATAGCGATGGGAATG TCTGGGTCTGGTGAGTGTA
IRS-22	GGTCAGTGAAGAAGGGACATT GTCTGTCGACGTCCATGAAG
IRS-23	TACGCATTTTCGGAGGTTGTC GTTGCGACCTGCTACAGATT
IRS-24	TTGGGTGTGCGTTCAATCT ACCGTTCCTTCTTCGTTGAC
IRS-25	ACTTCGGGCTGACTCTGTA AGGAGGACCATCGTCAAGA

---

IRS-26	GAGGATACCGCCATGTTTCT AAGGTCGTGACTTCGTCTTC
--------	--

---

IRS-27	CAGGATGCCGTGGACATAAT GCTCCACACTCCCATGAAATA
--------	---

---

Pro účely qPCR byla námi připravena cDNA 5x naředěná. Primery byly naředěny podle údajů na originální lahvičce (0,1 mM) a poté zředěné ještě 10x pro dosažení požadované koncentrace (10 μM). V celkové reakci 10 μl bylo použito 5 μl *FastStart Universal SYBR® Green Master Mix* (Roche) 3,4 μl vody, 0,3 μl od každého primeru (F+R) a 1 μl cDNA. Analýza vzorků byla provedena s použitím přístroje RotorGene 6000 (PCR cycler, Corbett Research, software Microsoft Windows). Reakce byla zahájena při 95 °C po dobu 10 min, poté následovala denaturace při 95 °C po dobu 15 s, nasednutí primerů při 60 °C po dobu 10 s a syntéza DNA při 72 °C po dobu 30 s. Celý cyklus se opakoval 45x. Následovala postupné zvyšování teploty v rozmezí 72-95 °C za účelem analýzy křivky tání. Vzorky byly analyzovány v technických duplikátech a hodnoty byly srovnány s genovou expresí referenčního genu elongačního faktoru (EF-1). Relativní exprese těchto serpinových genů byla vyhodnocena metodou  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  hodnot s použitím matematického algoritmu (Livak et al., 2001).

## 4.3 Příprava dsRNA

Po analýze genových expresních profilů byly pro přípravu dsRNA vybrány 3 geny, konkrétně IRS-10, IRS-20 a IRS-22. S genem IRS-22 se ovšem po nezdařilé koloniové PCR, kdy nevycházely opakované kontroly, dál nepokračovalo. Proces celé přípravy dsRNA probíhal tedy jen se dvěma geny, IRS-10 a IRS-20.

### 4.3.1 Příprava PCR produktu

Pomocí OligoAnalyzer byly navrženy genově specifické primery s restrikcčními místy pro enzymy ApaI, XbaI a AT převísem o velikosti ampliconu 500 bp (výjimkou byl gen IRS-22 o velikosti ampliconu 200 bp). Teplota pro nasedání primerů na templát byla zvolena 51 °C.

a) Primery pro přípravu IRS-10:

IRS-10\_197F\_XbaI: 5' ATT CTA GAG GAG AGA CAC AGG AGA GGA A - 3'

IRS-10\_696R\_ApaI: 5' ATG GGC CCG TCG AAA GAG CCG TAT CCA A - 3'

b) Primery pro přípravu IRS-20:

IRS-20\_285F\_XbaI: 5' ATT CTA GAC CAG AAG TAT CAG TCT GCC C - 3'

IRS-20\_784R\_ApaI: 5' ATG GGC CCC AAC ACC GGT CTT CTC TCT G - 3'

c) Primery pro přípravu IRS-22:

IRS-22\_40F\_XbaI: 5' ATT CTA GAG ACC GCC ATG GAA TCA AAG T - 3'

IRS-22\_239R\_ApaI: 5' ATG GGC CCA AAA ACA GAG CAC GTC TCG T - 3'

Pro každý gen byla provedena standardní PCR s elektroforézou. Jako templát byla použita cDNA s nejvyšší expresí daného genu. Jedna reakce obsahovala 12,5 µl *FastStart Universal SYBR® Green Master Mix* (Roche), 9 µl PCR vody, 1,25 µl od každého primeru (F+R) a 1 µl cDNA. PCR reakce byla provedena v thermocycleru T100™ (BioRad) s tímto průběhem: počáteční denaturace při 95 °C 3 min, celkem 45x opakována denaturace při 95 °C 30 s a nasedání primerů při 51 °C 30 s, včetně syntézy cDNA při 72 °C 30 s, a konečná syntéza cDNA při 72 °C 5-15 min.

Poté byla provedena elektroforéza v 1% TAE (Envison) agarózovém gelu s barvičkou SYBR® Safe (Invitrogen). Do všech 25µl směsí bylo přidáno 5 µl 6x DNA OrangeG loading dye (Thermo Scientific). Jako DNA marker byl použit 200-1500 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Elektroforéza běžela při napětí 75-80V a proudu 50 mA přibližně 45 min. PCR produkt byl poté vyříznut a přečištěn dle pokynů v kitu *Nucleospin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel) s jedinou změnou: eluováno do 30 µl PCR vody.

Po přečištění PCR produktu každého genu následovala restrikce při 37 °C 2 hodiny v termobloku. V každé reakční směsi byly smíchány 3 µl pufru 10x TANGO, 20 µl DNA, 5 µl vody a 1 µl od každého enzymu (ApaI, XbaI). Štěpený PCR produkt byl purifikován podle kitu *Nucleospin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel) pro odstranění krátkých fragmentů DNA odštipnutých z konců (cut-off 50 bp). Opět bylo eluováno do 30 µl PCR vody a vzorky byly uloženy při teplotě -20 °C.

#### **4.3.2 Příprava plasmidu pLL10**

Plasmid pLL10 je vhodný pro přípravu dsRNA, neboť obsahuje 2 T7 promotory v opačné orientaci, což umožňuje transkribovat inzert v obou směrech, a připravit tak sense a antisense RNA (Levashina et al., 2001). Nejdříve však bylo nutné provést restrikci příslušnými enzymy při 37 °C po dobu 2 hodin v termobloku. V jedné restrikční směsi byly namíchány 3 µl pufru TANGO 10x, 3 µl DNA, 1 µl od každého enzymu (ApaI, XbaI)

a 22  $\mu$ l vody. Po inkubaci následovala elektroforéza plasmidu po restrikci enzymem ApaI nebo XbaI i plasmidu neštěpeného jako kontrola. Po přečištění z gelu dle kitu *Nucleospin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel) byla změřena koncentrace připraveného plasmidu pLL10 (45 ng/ $\mu$ l).

Naštípaný a přečištěný PCR produkt každého genu byl zaligován do příslušného plazmidu (1+1  $\mu$ l) pomocí T4 ligázy (0,5  $\mu$ l) ve 2,5  $\mu$ l 2x pufru (*pGEM T-easy* kit, Promega). Po hodinové inkubaci při laboratorní teplotě následovala další inkubace při 4 °C do druhého dne.

### 4.3.3 Transformace plasmidu do *E. coli*

K transformaci byly použity buňky *E. coli* TOP10 (ThermoFisher Scientific C404003). K 15  $\mu$ l buněk bylo přidáno 5  $\mu$ l ligační směsi. Tato směs byla nejdříve inkubována 30 min na ledu a posléze ponechána 1 min v termobloku při 42 °C k dosažení teplotního šoku a nakonec byla opět dána na 2 min na led. Po přidání 300  $\mu$ l SOC média (Invitrogen) o laboratorní teplotě se směs dala na 1 hod třepat při 37 °C. Všechny buňky (resp. celý objem 300  $\mu$ l) byly poté vysety na plotny s LB agarem a 50 ng/ml ampicilinem a inkubovány do druhého dne při 37 °C. Druhý den bylo provedeno křížkování (15 křížků/gen) a do dalšího dne se znovu ponechalo v inkubátoru při 37 °C. Následující den byla provedena koloniová PCR za použití genově specifických primerů. Jeden vzorek o 15  $\mu$ l obsahoval 7,5  $\mu$ l mastermixu, 0,75  $\mu$ l od každého primeru, 6  $\mu$ l vody a směs bakterií (pomocí špičky setřen „křížek“ a vymáčan v připraveném mixu pro PCR). PCR proběhla za použití přístroje RotorGene za standardních podmínek (počáteční denaturace při 95 °C 3 min, celkem 45x opakována denaturace při 95 °C 30 s a nasedání primerů při 51 °C 30 s, včetně syntézy cDNA při 72 °C 30 s, a konečná syntéza cDNA při 72 °C 5-15 min). Jako negativní kontrola byla použita PCR voda. Po skončení reakce byla provedena kontrolní elektroforéza pro selekci pozitivních a negativních kolonií.

Vybrané pozitivní kolonie byly kultivovány v tekutých kulturách 100 ml LB média s ampicilinem (50 ng/ml) a inkubovány za stálého třepání do druhého dne při 37 °C. Následně bylo odebráno 800  $\mu$ l bakteriální suspenze do 200  $\mu$ l 100% glycerolu. Takto připravený glycerolový stock byl uchován při -80 °C. Ze zbytku bakteriální suspenze byl izolován plasmid pomocí kitu *NucleoBond Xtra Midi* (Macherey Nagel) dle instrukcí v návodu s výjimkou eluce (do 100  $\mu$ l PCR vody). Nanofotometrem (IMPLEN, P330) byla změřena koncentrace izolované DNA.



Pro ověření úspěšného vložení inzertu do plasmidu byla provedena ve společnosti SEQme Sangerova sekvenace s univerzálními primery M13 (F+R):

M13\_F: 5' TGTAACGACGGCCAGT - 3'

M13\_R: 5' CAGGAAACAGCTATGACC - 3'

#### 4.3.4 Restrikce purifikovaného plasmidu

Plasmid s ověřenými sekvencemi byl rozštěpen restrikčními endonukleázami ve dvou oddělených reakcích. Restrikční směs byla připravena z 30 µg plasmidu, 5 µl pufru TANGO a 6 µl enzymu (ApaI nebo XbaI). Objem reakce byl doplněn do 50 µl. Připravená směs se poté ponechala 2 hod v termobloku při 37 °C.

#### 4.3.5 Purifikace linearizovaného plasmidu

Ke všem 50 µl reakcím bylo přidáno 25 µl roztoku proteinázy K (Sigma P5568), připraveného smícháním 1 µl proteinázy K (20 mg/ml) se 150 µl 10 mM Tris-HCl o pH 8 a 2 mM CaCl<sub>2</sub>, a 3,75 µl 10% SDS. Směs byla inkubována 30 min při 50 °C. Po inkubaci bylo přidáno 80 µl fenol-chloroformu (Sigma P3803), promícháno na vortexu a centrifugováno 5 min při laboratorní teplotě na maximální otáčky. Vznikly dvě fáze. Horní (vodná) fáze byla opatrně odebrána a následně bylo přidáno 80 µl chloroformu, opět promícháno na vortexu a centrifugováno 5 min při laboratorní teplotě na maximální otáčky. Poté byla odebrána další vodná fáze a bylo přidáno 56 µl isopropanolu. Směs byla inkubována 15 min v mrazáku při -20 °C a poté stočena v chlazené centrifuze při 4 °C při maximálních otáčkách (18 000 g) po dobu 30 min. Centrifugací získaný pelet byl promyt 80 µl 80% ethanolu vychlazeného na -20 °C stočením při 4 °C na maximum po dobu 8 min. Po dvojnásobném promytí byl vysušený pelet rozpuštěn ve 20 µl PCR vody. Poté byla změřena koncentrace linearizovaných plasmidů. Výsledek (0,5 µg dsDNA) byl zkontrolován na gelu, pro porovnání byl použit neštěpený plasmid.

#### 4.3.6 Syntéza jednořetězcové RNA a její purifikace

Syntéza byla provedena pomocí *MEGAscript™ T7 Transcription Kit* (ThermoFisher Scientific). Pufr byl předeřhřátý na 37 °C a následně promíchán. Každá reakce obsahovala směs 8 µl NTPs (2 µl od každého), 2 µl pufru, 2 µl enzymu a 2-3 µg linearizovaného plasmidu (maximální objem 8 µl). Na celkový objem reakce 20 µl bylo doplněno dle potřeby PCR vodou. Mikrozkuhavky byly inkubovány přes noc v thermocycleru T100™ (BioRad). ssRNA pro specifický gen byla označena podle enzymu, kterým byla provedena restrikce (ssRNA štěpená enzymem ApaI je označena písmenem A, ssRNA štěpená enzymem XbaI

písmenem X). IRS-10A, IRS-10X, IRS-20X byly inkubovány při 40 °C, ovšem IRS-20A při 37,9 °C. Důvodem rozdílných teplot byly nízké výtěžky pro IRS-20A, proto bylo nezbytné tento krok opakovat.

Po inkubaci následovala purifikace ssRNA, ve které byly použity chemikálie ze stejného kitu k syntéze ssRNA. Ke všem vzorkům byl přidán 1 µl DNázy s následnou 15 min inkubací při 37 °C. Pak bylo přidáno 115 µl vody a 15 µl octanu amonného (5 M, 100 mM EDTA). Po promíchání bylo přidáno 150 µl fenol-chloroformu (Sigma), promícháno na vortexu a centrifugováno 5 min při laboratorní teplotě na maximální otáčky. Opět vznikly dvě fáze. Vodní fáze byla opatrně odebrána, smíchána se s 150 µl chloroformu, rovněž promíchána a centrifugována 5 min při laboratorní teplotě na maximální otáčky. Druhá vodní fáze byla po odebrání smíchána se s 110 µl isopropanolu a po promíchání inkubována 15 min v mrazáku při -20 °C. Poté byla směs centrifugována v chlazené centrifuze při 4 °C na maximální otáčky 18 000 g po dobu 30 min. Centrifugací vzniklý pelet byl vysušen při laboratorní teplotě a rozpuštěn v 10 µl PCR vody. Pomocí nanofotometru (IMPLEN, P330) byla změřena koncentrace všech vzorků, která musela dosahovat hodnot vyšších než 3000 µg/ml. Pro kontrolní elektroforézu bylo uschováno 1,5 µg všech vzorků a zamrazeno při -70 °C.

#### **4.3.7 Hybridizace, syntéza dvouvláknové RNA**

Obě přečištěné ssRNA o stejné koncentraci 3000 µg/ml byly smíchány v poměru 1:1, a to pro oba geny (IRS-10, IRS-20). Mikrozkušavky byly zajištěny parafilmem, aby nedocházelo k odpařování vzorků. Odměrný válec o objemu jednoho litru byl naplněn vařící vodou, na jeho hladinu byly položeny zajištěné vzorky RNA umístěné v plováku. Válec byl přikryt hliníkovou fólií a uzavřen do polystyrenové krabice. Takto připravená RNA byla inkubována přes noc. Zhybridizovaná dsRNA byla uložena do hlubokomrazicího boxu při -80 °C. Pro ověření úspěšnosti pokusu byla provedena elektroforéza v 1% TAE agarózovém gelu za použití RNA ladder loading dye. Jako kontrola posloužila ssRNA z předchozího kroku.

## 4.4 RNA interference v klíšťatech

### 4.4.1 Ověření silencingu

Před samotným *in vivo* pokusem bylo nejdříve nutné ověřit, zda připravená dsRNA pro daný gen způsobí „vypnutí“ genu na úrovni transkripce. Kromě námi připravené dsRNA IRS-10 a IRS-20 byla použita ještě GFP jako negativní kontrola, aby všechny nymfy prodělaly stejný proces.

32 nl dsRNA těchto genů bylo napícháno do 15 nymf/gen. Nymfy pocházející z chovu PAÚ byly injikovány RNDr. Ondřejem Hajduškem, Ph.D. za pomoci Ing. Gabriely Loosové. Následující 3 dny byly nymfy ponechány v chovu a poté byly nasazeny na 3 myši samice C3H/HeN. V době pokusu byly staré 5 měsíců a rovněž byly umístěny v klecovém systému IVC (sterilní stelivo, krmivo a sterilní voda okyselená HCl na pH 3, voda i dieta *ad libitum*). Na vyholenou zadní část myši byly umístěny kloboučky, do kterých byly následně přidány nymfy. Tyto nymfy byly odstraněny v den maximální exprese daného genu dle expresního profilu a poté z nich byla standardním způsobem izolována RNA a připravena cDNA (viz kap. 4.1).

Vypnutí genu, neboli silencing či knock-out, bylo ověřeno pomocí qPCR se specifickými primery. Jako templát byla použita připravená 3x naředěná cDNA. Specifita RNAi byla ověřena způsobem „každý s každým“, což znamená, že byla namíchána reakce s primery pro IRS-10 a jako templát byly použity všechny 3 cDNA (analogicky provedeno pro IRS-20, včetně GFP). Cílem této analýzy bylo zjistit, zda vpich příslušné dsRNA vedl k silencingu daného genu, nikoli genů ostatních. Po ověření specifity dsRNA vybraných genů následoval vlastní *in vivo* pokus.

## 4.4.2 RNAi *in vivo*

### 4.4.2.1 Nymfy a myši použité v pokusech

Všechny nymfy použité v následujících pokusech pocházely z chovu PAÚ Biologického centra AVČR (konkrétně od RNDr. Radka Šímy, Ph.D.). Pro tento pokus byly infikované boreliemi následujícím způsobem: Kmen borelií *B. afzelii* CB43 (13) byl kultivován v BSK-H médiu (Sigma-Aldrich) při 33 °C po dobu 5-7 dnů. Šestitýdenní myši samice C3H/HeN byly infikovány subkutánně injekcí  $10^5$  spirochét/myš. Přítomnost spirochét v myši byla ověřena ušní biopsií 3 týdny po infekci pomocí PCR. Čisté larvy *Ixodes ricinus* se krmily na infikovaných myších, dokud nebyly plně nasáté a schopné odpadnutí. Nymfy byly považovány za infikované, pokud > 90% z nich vyšlo jako pozitivní pomocí PCR.

RNAi *in vivo* experiment byl proveden ve dvou opakováních. V prvním pokuse bylo injikováno 25 nymf/gen (čili 5 nymf/myš), v druhém pokuse 30 nymf/gen (čili 7-8 nymf/myš v každé skupině). Do nymf bylo injikováno vždy 32 nl dsRNA.

V prvním pokuse byly nymfy nasazeny na 15 myších samic C3H/HeN (Charles River Laboratories). V době pokusu byly staré 8 týdnů (5 myší/gen) a umístěné v klecovém systému se stejnými podmínkami jako v předchozích pokusech a jako v následujících. V druhém pokuse byly nymfy nasazeny na 12 myších C3H/HeN (5 samečů + 7 samic) z vlastního chovu. V době pokusu byly tyto myši staré 6 měsíců (4 myší/gen). Rozložení pohlaví myší pro IRS-10 a IRS-20 bylo 2 ♂ : 2 ♀, pro GFP 1 ♂ : 3 ♀.

### 4.4.2.2 Provedení experimentu

Po 3 dnech od napichování nymf dsRNA byly nastrojeny myši a nasazena na ně klíšťata. Počínaje druhým dnem od nastrojení byly myši 2x denně kontrolovány a zapisovány počty přisátých/nepřisátých/mrtvých/odpadlých nymf. Plně nasáté nymfy byly průběžně sbírány do epruвет a v den odpadnutí rovnou zváženy. Poté byly uloženy do chovů klíšťat a po 2-3 měsících (dle ročního období) byla vyhodnocena úspěšnost metamorfózy do stádia dospělé, rovněž byl zaznamenán poměr pohlaví v jednotlivých skupinách. Dva týdny po nasazení klíšťat byl pokus ukončen pitvou myší – odběrem orgánů (ucho, srdce, močový měchýř a kloub-kotník). Z orgánů byla izolována genomická DNA pomocí komerčního kitu *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche) s těmito změnami: eluováno do 100 µl PCR vody, ke kloubu bylo navíc přidáno 12,5 µl liberázy.

Po izolaci DNA byla provedena qPCR pro detekci borelií (flagelin) v technických duplikátech, u pozitivních vzorků pak byla provedena qPCR pro myší  $\beta$ -aktin také v technických duplikátech. Výsledek byl vyjádřen jako počet borelií na  $10^5$  myších genomů. Složení reakce (20  $\mu$ l) bylo shodné pro oba typy qPCR: 10  $\mu$ l Luna<sup>®</sup> Universal qPCR Master Mix (NEB), 5,7  $\mu$ l PCR vody, 0,1  $\mu$ l od každého primeru (FlaF + FlaR x ActF + ActR), 0,1  $\mu$ l příslušné sondy (FlaProbe1 x mActP, Generi Biotech) a 4  $\mu$ l genomické DNA. Kalibrační řada pro qPCR flagelin byla připravena z DNA izolované z borelií z kultury naředěné desítkovou řadou. Kalibrační řada qPCR pro myší  $\beta$ -aktin byla připravena z DNA z příslušných orgánů neinfikované myši, opět naředěna desítkově. Jako NTC kontrola pro obě qPCR byla použita PCR voda, další negativní kontrolou pro qPCR flagelin byla použita čistá DNA určitého orgánu. U všech vzorků pozitivních na přítomnost boreliové DNA byla provedena qPCR (RotorGene) pro myší aktin (kromě vody (NTC) jako negativní kontrola použita boreliová DNA z předchozí kalibrační řady). Průběh reakce byl rovněž totožný pro obě qPCR: zahájení při 95 °C po dobu 5 min, cyklus opakovaný 45x při 95 °C 15 s a 45 s při 60 °C.

a) Primery pro *Borrelia* flagellin (154 bp) a sekvence sondy:

FlaF1 (5' AAGCAAATTTAGGTGCTTTCCAA - 3')

FlaR1 (5' GCAATCATTGCCATTGCAGA - 3')

FlaProbe1 (5' TGCTACAACCTCATCTGTCATTGTAGCATCTTTTATTTG - 3'),

(Schwaiger et al., 2001).

b) Primery pro Mouse  $\beta$ -actin a sekvence sondy:

5' AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC - 3' (F)

5' CAA TAGTGA TGA CCT GGC CGT - 3' (R)

5' AC TGC CGC ATC CTC TTC CTC CC -3' (Probe) (Dai et al. 2009).

## 5 Statistická analýza dat

Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programech MS Excel (Microsoft Corporation, USA) a GraphPad Prism 6 (verze pro Windows, GraphPad Software).

Pro vytvoření databází byl využit program MS Excel, ve kterém byly vytvářeny potřebné tabulky. Data byla zpracována v programu GraphPad Prism 6, který byl použit pro statistické analýzy, včetně tvorby grafů. Pro vyhodnocení expresních profilů genů byla použita jednocestná analýza variance (parametrický test ANOVA). Pro porovnání mezi jednotlivými skupinami byl použit *post-hoc* test s Tukeyho korekcí. Statisticky významná hodnota byla považována  $p < 0,05$  (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Data získaná z *in vivo* pokusu byla rovněž vyhodnocena v programu GraphPad Prism 6. Pro analýzu těchto výsledků byl použit neparametrický test, konkrétně Man-Whitney U test (bez Gaussova rozdělení). Statisticky významná hodnota byla považována \*  $p < 0,05$ .

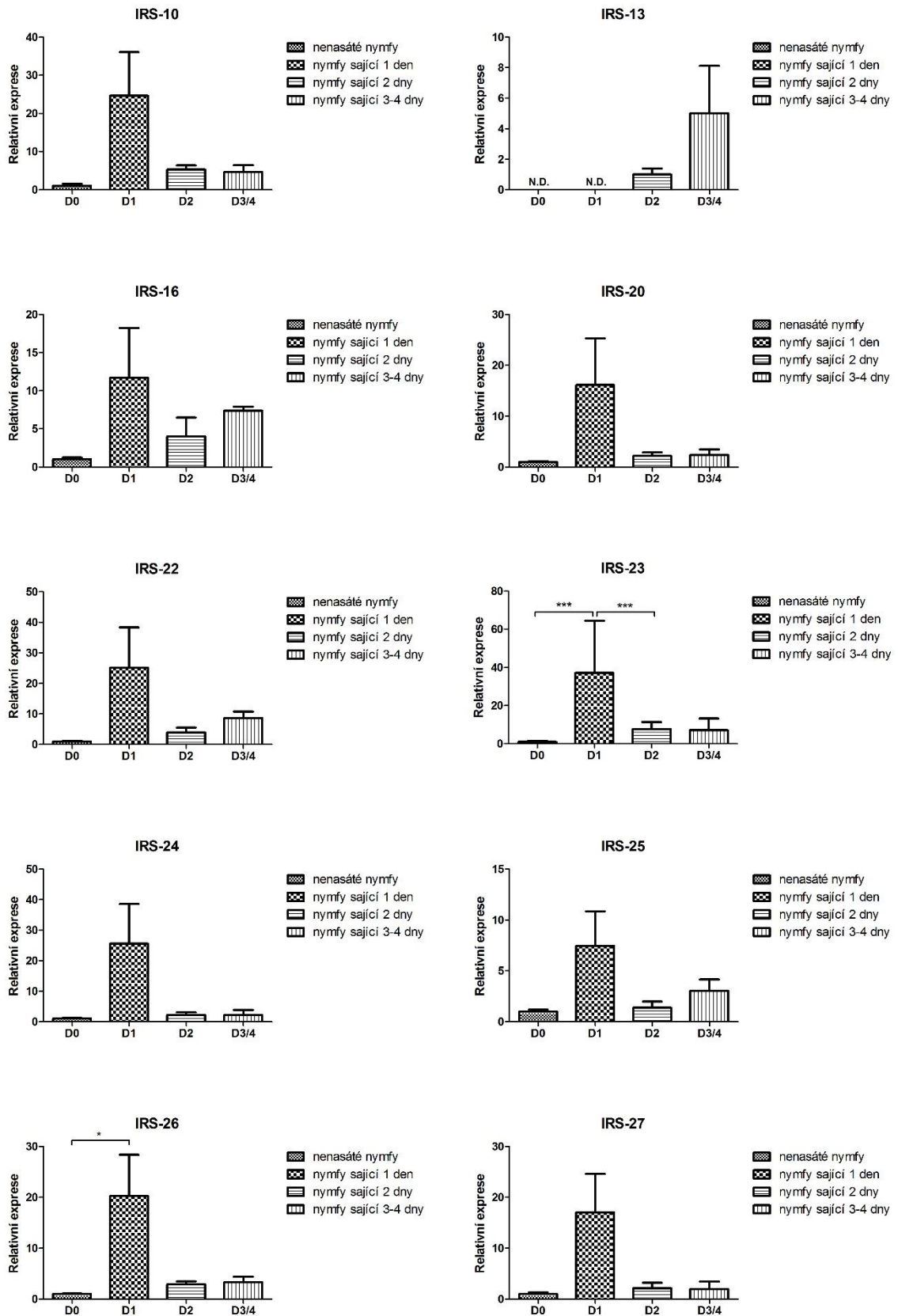
Doba sání nymf klíštěte *Ixodes ricinus* byla analyzována v programu Statistica 12 CZ licencovaným od JČU s použitím Kaplan-Meierovy křivky přežití. Pro srovnání skupin byla použita ANOVA a *post-hoc* test s Tukeyho korekcí v programu Jamovi.

## 6 Výsledky

### 6.1 Stanovení expresního profilu vybraných genů pro serpiny v průběhu sání nymf pomocí qPCR

Pro stanovení profilové exprese 10 vybraných sepinových genů bylo nejdříve nutné připravit cDNA z různě nasátých nymf klíštěte *Ixodes ricinus* (skupiny D0, D1, D2 a D3/4). cDNA byla získána reverzní transkripcí RNA, jež byla izolována pomocí TRIZOLu (kapitola 4.1.).

S použitím přístroje RotorGene 6000 (PCR cycler, Corbett Research) byla provedena analýza všech připravených vzorků a byly stanoveny expresní profily následujících IRS-genů: IRS-10, -13, -16, -20, -22, -23, -24, -25, -26 a -27. Pro první pokus byla použita již připravená cDNA z předešlých pokusů. Nová cDNA byla připravená především pro zopakování stanovení expresního profilu 3 genů, které byly vybrány pro další experimenty.



Obr. 4: Expresní profily IRS-genů u různě nasátých nymf *I. ricinus*.

IRS-13: N.D. - nedetekovaná exprese

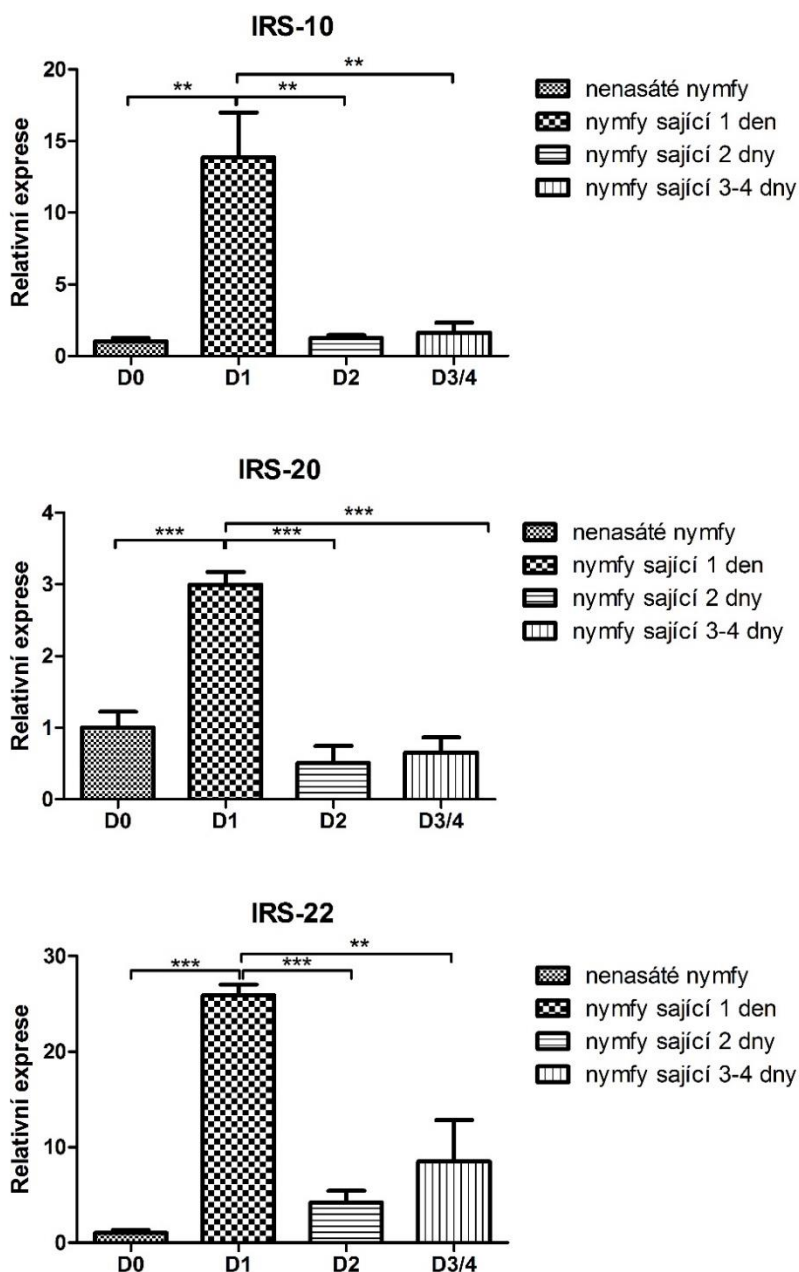
IRS-23: D0 vs. D1 \*\*\*  $p < 0,001$ ; D1 vs. D2 \*\*\*  $p < 0,001$ .

IRS-26: D0 vs. D1 \*  $p < 0,05$ .



Všechny mnou analyzované inhibitory serinových proteáz jsou charakteristické nejvyšší expresí daného genu první den po sání, vyjma IRS-13. IRS-13 patří mezi serpiny, u nichž je maximální exprese genu dosaženo v posledních dnech sání.

Poté, co byly vybrány 3 geny (IRS-10, -20 a -22), byla pro potvrzení expresních profilů zopakována kvantitativní PCR analýza s novou sadou cDNA.



**Obr. 5: Expresní profily vybraných genů u různě sajících nymf *I. ricinus*.**

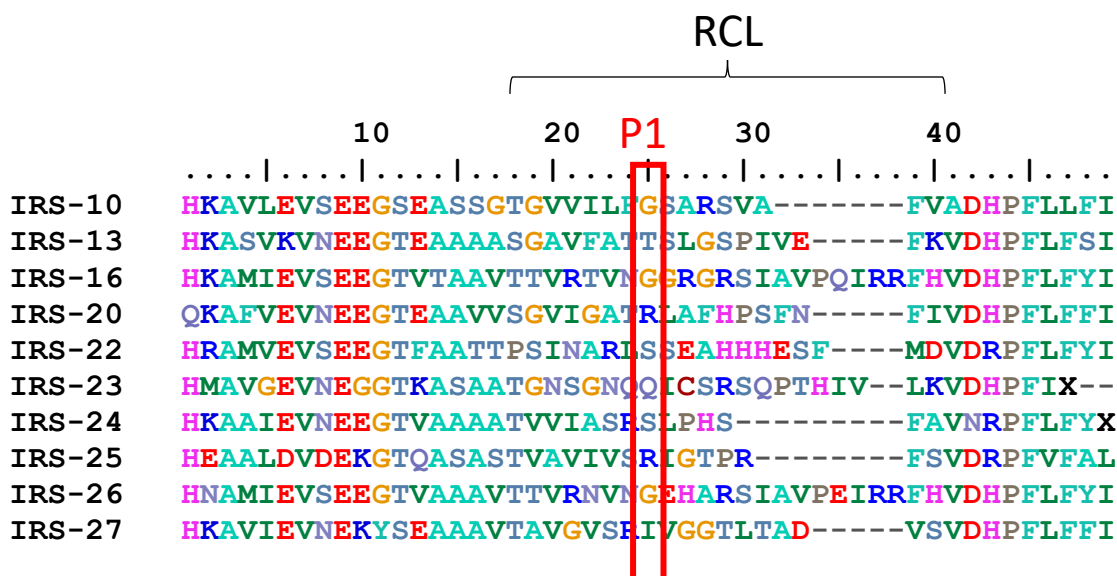
IRS-10: D0 vs. D1 \*\*  $p < 0,01$ ; D1 vs. D2 \*\*  $p < 0,01$ ; D1 vs. D3/4 \*\*  $p < 0,01$ .

IRS-20: D0 vs. D1 \*\*\*  $p < 0,001$ ; D1 vs. D2 \*\*\*  $p < 0,001$ ; D1 vs. D3/4 \*\*\*  $p < 0,001$ .

IRS-22: D0 vs. D1 \*\*\*  $p < 0,001$ ; D1 vs. D2 \*\*\*  $p < 0,001$ ; D1 vs. D3/4 \*\*  $p < 0,01$ .

## 6.2 Příprava dsRNA pro IRS-10, IRS-20 a IRS-22

IRS-10, -20 a -22 se mezi sebou liší v RCL smyčce, což je úsek o cca 20 aminokyselinách, jenž se shoduje s aminokyselinami v aktivním centru cílové peptidázy, čímž určuje selektivitu serpinů. Proto byly pro další experimenty vybrány právě tyto geny.



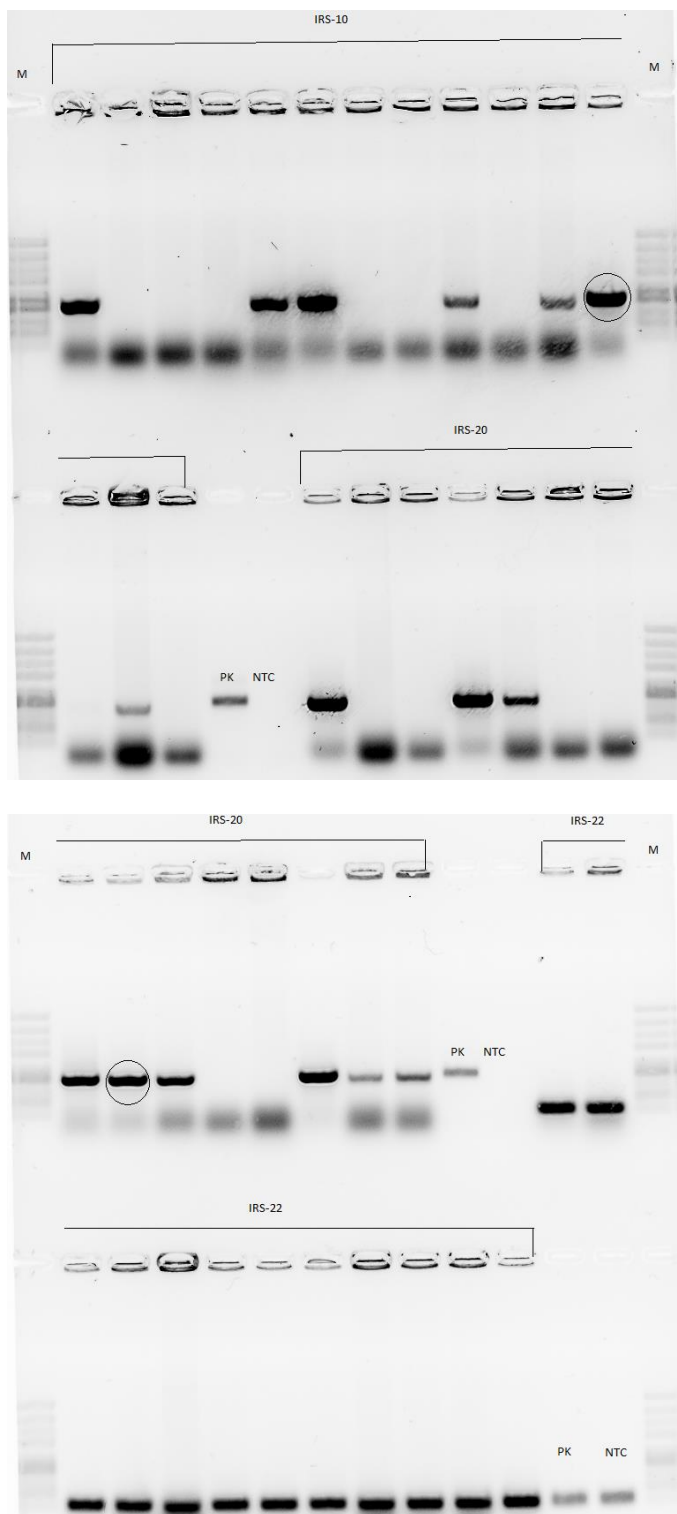
Obr. 6: RCL alignment serpinových genů. P1 cleavage site v RCL smyčce.

### 6.2.1 Transformace plasmidu do *E. coli*

PCR produkt pro každý gen, připravený standardní PCR se specifickými primery, byl zaligován do připraveného plasmidu pLL10. Poté následovala transformace tohoto plasmidu do *E. coli* TOP10 (ThermoFisher Scientific) a koloniová PCR za použití genově specifických primerů.

Úspěšnost transformace byla provedena kontrolní elektroforézou pro selekci pozitivních a negativních kolonií.

Po nezdařilé koloniové PCR pro serpin IRS-22, kdy opakovaně nevycházely negativní kontroly, byla příprava dsRNA pro tento gen prozatím ukončena.

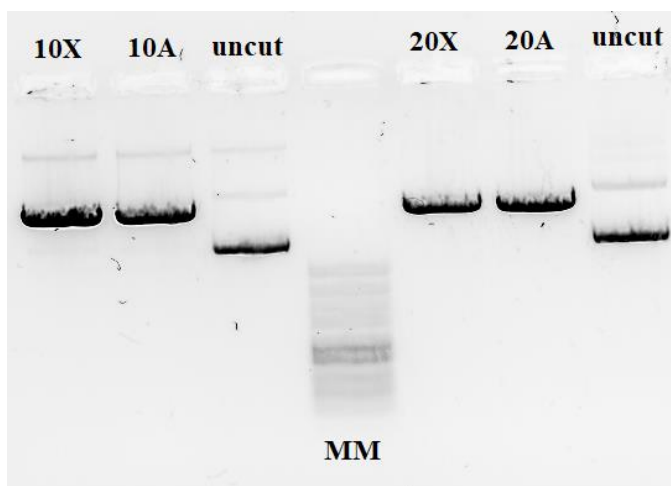


**Obr. 7: Koloniová PCR za použití genově specifických primerů (transformace).**

Marker (M) o velikosti 200 - 1500 bp. Elektroforetická separace plasmidové DNA testovaných kolonií. Na jeden gen odpovídá 15 křížků/kolonií. Kroužkem jsou označeny ty pozitivní kolonie, jež byly vybrány pro další kroky. PK - cDNA jednodenních nymf. NTC - negativní kontrola.

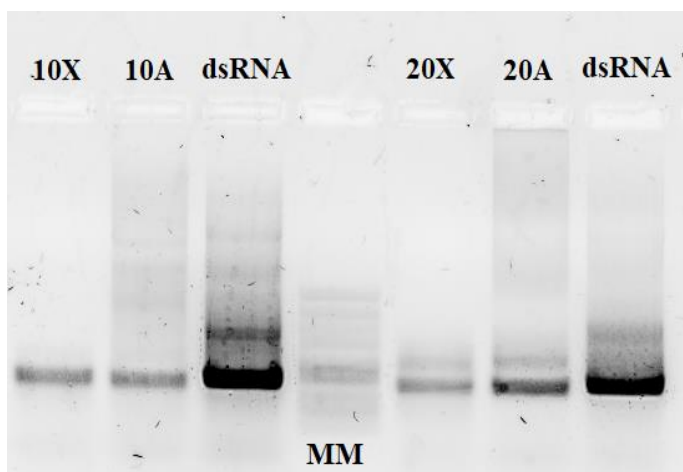
## 6.2.2 Purifikace linerizovaného plasmidu a hybridizace IRS-10 a IRS-20

Po ověření úspěšného vložení inzertu do plasmidu (provedeno společností SEQme) byl tento plasmid použit k restrikci a následné purifikaci. Kontrolní elektroforézou byla ověřena úspěšnost restrikce.



**Obr. 8: Ověření plasmidu po restrikci pro gen IRS-10 a IRS-20.** Molekulový marker o velikosti 200 - 1500 bp. 10X, 20X - plasmid štěpený XbaI, 10A, 20A - plasmid štěpený ApaI. Pro kontrolu použit neštěpený plasmid (uncut).

Poté následovala syntéza ssRNA, její purifikace (kapitola 4.3.6) a hybridizace čili syntéza dvouvláknové RNA pro IRS-10 a IRS-20. Gelovou elektroforézou byla rovněž ověřena úspěšnost hybridizace.

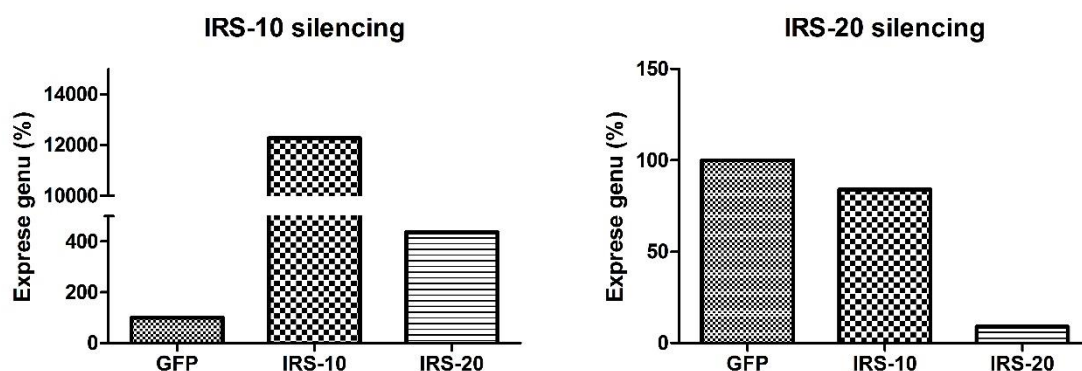


**Obr. 9: Kontrola přípravy dsRNA pro umlčení IRS-10 a IRS-20.** Molekulový marker velikosti 200 - 1500 bp. 10X, 20X - ssRNA po restrikci plasmidu enzymem XbaI. 10A, 20A - ssRNA po restrikci plasmidu enzymem ApaI. dsRNA - hybrid.

## 6.3 Studium úlohy vybraných serpinů při sání nymf *I. ricinus* pomocí RNAi

### 6.3.1 Ověření silencingu

Před samotným pokusem *in vivo* bylo nutné ověřit, zda připravená dsRNA pro daný gen způsobí vypnutí genu. Jako negativní kontrola byla použita GFP, aby všechny nymfy prodělaly stejný proces (kapitola 4.4.1). Silencing genu byl ověřen pomocí qPCR se specifickými primery.



Obr. 10: Ověření silencingu pro geny IRS-10 a IRS-20.

GFP (kontrolní skupina) odpovídala 100 % exprese. V případě IRS-10 silencingu nedošlo k umlčení exprese daného genu, ale naopak k over-expressi. U genu IRS-20 byla exprese snížena na 8,9 %, přičemž exprese genu IRS-10 byla téměř nezměněná (~ 84 %).

### 6.3.2 Vliv serpinů na fitness klíšťat

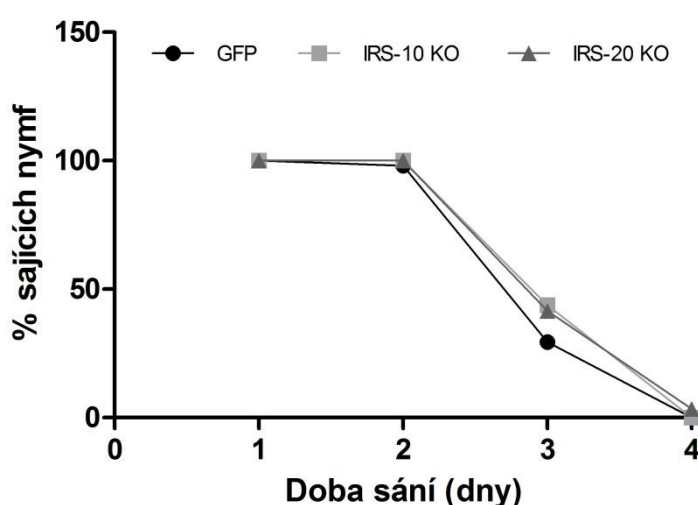
Po otestování silencingu daných genů byla provedena RNAi *in vivo* (kapitola 4.4.2.2). Třetí den od nasazení nymf na myši probíhaly kontroly nymf v daných časových intervalech. Byly zapisovány počty přisátých/nepřisátých/mrtvých/odpadlých nymf. V tabulce III je zaznamenána úspěšnost sání nymf vyjádřena jako poměr plně nasátých vůči všem nasazeným nymfám pro každou skupinu (GFP, IRS-10, IRS-20). U nymf s knock-outovanými geny v porovnání s kontrolními nymfami bylo zaznamenáno mírné snížení, především u nymf s IRS-10 KO (88,9 %).

**Tab. II: Úspěšnost sání nymf (%).**

Skupina	I. (červen)	II. (listopad)	celkem
GFP	24/25 (96.0 %)	30/30 (100 %)	54/55 (98.2 %)
IRS-10 KO	20/25 (80 %)	28/29 (96.6 %)	48/54 (88.9 %)
IRS-20 KO	24/25 (96.0 %)	29/30 (96.7 %)	53/55 (96.4 %)

\*Plně nasáté nymfy/nasazené nymfy.

Rovněž byl zaznamenáván čas, kdy byly odpadlé nymfy sbírány. Na obr. 10 je zachyceno procento ještě sajících nymf v daném čase z celkového počtu plně nasátých nymf. Mrtvé a/nebo nepřisáté nymfy byly z vyhodnocování vyřazeny.



**Obr. 11: Doba sání nymf v průběhu *in vivo* pokusu.**

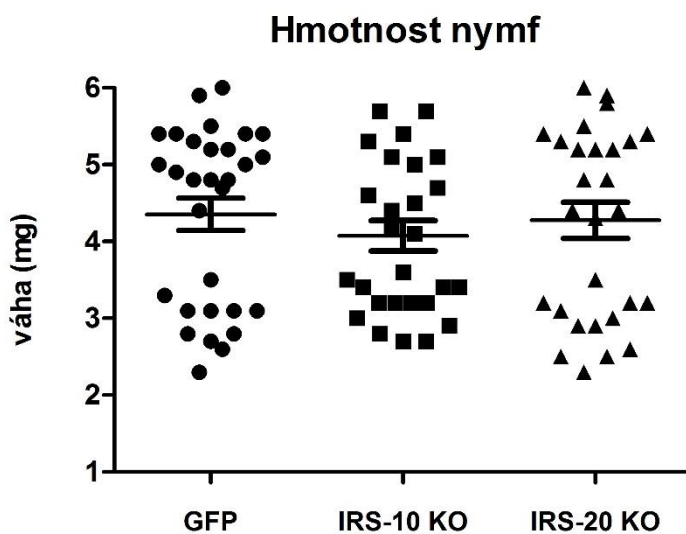
První dva dny sály prakticky všechny nymfy, naprostá většina odpadla třetí nebo čtvrtý den po nasazení, což odpovídá standardnímu průběhu sání nymf *I. ricinus* na myši. Zatímco u GFP třetí den sálo již pouze 27,5 %, u KO ve stejnou dobu sálo více než 40 % nymf, konkrétně u IRS-10 KO nymf 42,5 %, u IRS-20 KO 41 %. Nicméně porovnání mezi geny neukázalo signifikantní rozdíly, které by byly možné statisticky prokázat.

Plně nasáté nymfy byly po zvážení uloženy do chovu a po 3 měsících byla vyhodnocena úspěšnost metamorfózy do stádia dospělé. Rovněž byl zaznamenán poměr pohlaví v jednotlivých skupinách (viz tabulka III).

**Tab. III: Metamorfóza nymf do stádia dospělé (%).**

Skupina	životaschopný samec	životaschopná samice	proměna
GFP	21	30	94,40 %
IRS-10 KO	22	18	83,00 %
IRS-20 KO	20	26	86,80 %

Zatímco u kontrolních nymf se převléklo 94,40 %, u nymf s knock-outovanými geny bylo zaznamenáno mírné snížení. U nymf IRS-10 KO metamorfovalo 83,00 % u nymf IRS-20 KO 86,8 %. Průměrná hmotnost odpadlých nymf v GFP skupině byla 4,35 mg. Nymfy s IRS-10 KO průměrně vážily kolem 4 mg, kdežto nymfy s IRS-20 KO přibližně 4,28 mg. Statisticky zde nebyl prokázán významný rozdíl. Obecně ovšem platí, že samice vyvinuté z nymf *I. ricinus* jsou přirozeně větší než samci.



**Obr. 12: Hmotnost odpadlých nymf.**

### 6.3.3 Vliv serpinů na přenos borelií *B. afzelii*

Dva týdny od nasazení nymf na myši byl pokus ukončen pitvou myši a odběrem čtyř orgánů – ucho, srdce, močový měchýř a kloub-kotník, z nichž byla následně izolována DNA. V této DNA byla pomocí qPCR detekována přítomnost borelií (flagelin). U pozitivních vzorků byla provedena ještě qPCR pro myši  $\beta$ -aktin. Výsledek byl vyjádřen jako počet borelií na  $10^5$  myších genomů.

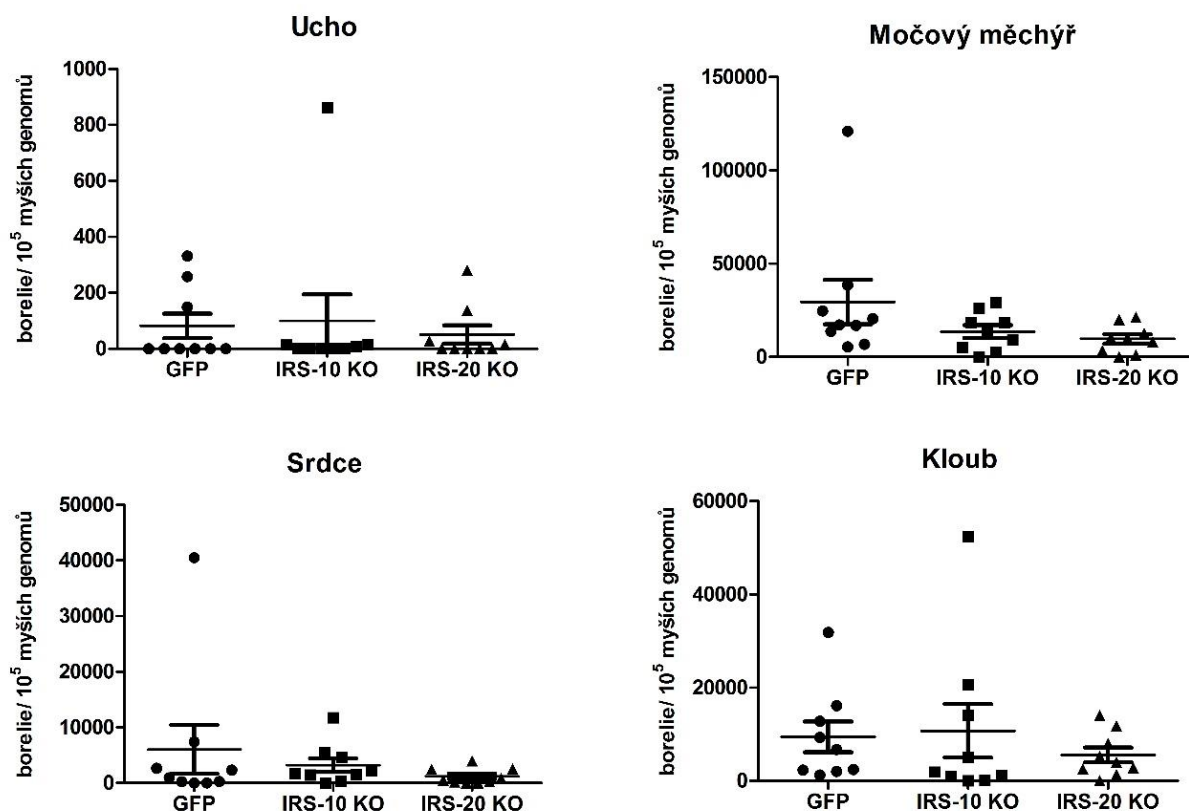
Absolutní kvantifikace vycházela z následujícího přepočtu: 1 pg DNA  $\approx$  978 Mb, myši genom  $\approx$  2,5 Gb, boreliový genom  $\approx$  1,5 Mb. Oba provedené pokusy probíhaly za stejných podmínek qPCR.

Pokud byl boreliemi napaden alespoň jeden orgán, byla tato myš považována za infikovanou. Jedna myš s vypnutým genem IRS-10 i IRS-20 nebyla boreliemi vůbec nakažena (viz tabulka IV).

**Tab. IV: Počet infikovaných myší.**

Skupina	I. (červen)	II. (listopad)	celkem
GFP	5/5	4/4	9/9
IRS-10 KO	4/5	4/4	8/9
IRS20-KO	4/5	4/4	8/9





**Obr. 13:** Přenos borelií *B. afzelii* na  $10^5$  myších genomů pro každý orgán po vypnutí specifického genu.

U nymf s umlčeným genem IRS-20 byla zaznamenána nižší přítomnost borelií v porovnání s GFP skupinou, konkrétně v močovém měchýři a srdci. V močovém měchýři bylo zjištěno v průměru 29 428 borelií/ $10^5$  myších genomů, ovšem u myši, na nichž sály nymfy s knock-outovaným genem, bylo zaznamenáno průměrně 9 667 borelií/ $10^5$  myších genomů. Patně větší rozdíl byl zaregistrován v srdci, kde u kontrolních nymf bylo přeneseno 6 037 borelií/ $10^5$  myších genomů, ale u nymf s IRS-20 KO to bylo přibližně 1 198 borelií/ $10^5$  myších genomů. Neplatí to ovšem pro ucho a kloub.

U nymf s IRS-10 KO, ačkoliv se jednalo spíše o over-expresi daného genu, byl zachycen podobný trend. V močovém měchýři bylo oproti kontrolní skupině nymf přítomno průměrně 13 618 borelií/ $10^5$  myších genomů, a zrovna tak v srdci byl zachycen větší rozdíl oproti GFP skupině, kde bylo zjištěna přítomnost 3 218 borelií/ $10^5$  myších genomů. Rovněž to ale nelze tvrdit pro ucho a kloub. Zmíněné rozdíly u obou knock-outovaných genech však nejsou statisticky průkazné.

## 7 Diskuze

Klíšťata jsou nejčastějšími krevsajícími ektoparazity, jež napadají nejen různé druhy zvířat, ale i člověka. Pro svého hostitele představují velkou hrozbu, neboť jsou vektory mnoha patogenů, jež se do hostitele přenášejí ve slinách klíštěte během sání. Obrana proti klíštěti je proto z lékařského i veterinárního hlediska velmi důležitá (Willadsen et al., 1999).

Serpiny, patřící mezi významné inhibitory serinových protéz, jsou zajímavé nejen svou strukturou (Silverman et al., 2001), ale i schopností inhibice cílových peptidáz tzv. sebevražedným mechanismem (Huntington et al., 2000). Serpiny jsou hojně studovány pro jejich funkce v biologických procesech, jako je koagulace krve, fibrinolýza, programovaná buněčná smrt nebo zánět (Irving et al., 2000). Analýza sekvence různých genomů přispěla k objevu velkých rodin serpinů u mnohobuněčných i jednobuněčných organismů. Objevení velkého množství serpinových transkriptů u klíšťat lze považovat za nepřímý důkaz, že i klíšťata jsou schopna kódovat velké rodiny serpinů. Mulenga et al. (2009) tento fakt potvrdil osekvenováním genomu klíštěte *Ixodes scapularis*, v němž byla objevena rodina 45 serpinů. V porovnání s lidským genomem, který kóduje 36 prozatím známých serpinů (Law et al., 2006), se jedná o velmi rozmanitou část genomu, ačkoliv biologická funkce většiny serpinů v *I. scapularis* není objasněna.

U lidí a ostatních obratlovců byly probádány tzv. neutrofilové extracelulární pasti (NETs), což jsou sítě vláken sloužících imunitnímu systému k zachycení patogena. SerpinB1, exprimovaný makrofágy a neutrofily, je schopen omezit aktivitu NETs. Farley et al. (2012) ve své studii prokázal, že tento serpin inhibuje neutrofilní elastázu, katepsin G a proteinázu 3 uplatňujících se v eliminaci intracelulárních patogenů. U jiného serpinu, například  $\alpha$ 1-antitrypsinu, bylo zjištěno, že podporuje plicní tkáň v obraně proti infekci *Pseudomonas aeruginosa* u myšího hostitele (Jiang et al., 2013). Titíž autoři dále demonstrovali, že  $\alpha$ 1-antitrypsin redukuje bakteriální infekci v plicích potlačením degradace proteinu v hostiteli zprostředkované neutrofilní elastázou. Serpiny jsou pro své funkce v posledních letech studovány i v evropském klíštěti *Ixodes ricinus*, kdy je cílem analyzovat exprese těchto genů v průběhu sání a zaměřit se na ty serpiny, které mohou hrát důležitou roli během sání klíšťat a přenosu patogenů. Funkční analýza serpinů by neměla být podceňována, neboť jejich probádáním lze přispět k pochopení jejich farmakologického využití, například pro přípravu rekombinantních proteinů pro vývoj vakcín. Využití serpinů pro protiklíštěcí vakcíny představuje jedno z řešení, jelikož zástupci těchto inhibitorů hrají

klíčovou roli v regulaci metabolismu členovců a v regulaci hemostázy hostitele. Imamura et al. (2005) publikoval práci, v níž použil serpin z klíštěte *Haemaphysalis longicornis* jako vakcinační protein. Tento serpin byl označen jako *Haemaphysalis longicornis* serpin-2 (HLS2). RT-PCR analýzou bylo zjištěno, že HLS2 mRNA transkript je exprimován v hemolymfě sajících klíšťat a nikoliv ve slinách. Působením rekombinantního HLS2 byla prokázána prodloužená doba koagulace a inhibice aktivity trombinu. U králíků, kteří byli tímto proteinem vakcinováni, byla získána protektivní imunita proti klíštěti. Studie prokázala 44,6% úmrtnost nymf a 43% úmrtnost dospělých klíšťat. Sugino et al. (2003) ve své práci rovněž použil serpin z klíštěte *Haemaphysalis longicornis*, ovšem tentokrát se jednalo o HLS1. Transkripce mRNA genu HLS1 byla zjištěna pouze ve střevě klíšťat sajících 24-48 h po nasazení. Vakcinace králíků rHLS1 proteinem exprimovaným v *E. coli* měla za následek 43,9% a 11,2% úmrtnost nymf a dospělců, kteří byly krmeni na těchto imunizovaných králících. Jinými serpiny použitých k vakcinaci dobytka byly RAS-1 a RAS-2 z klíštěte *R. appendiculatus*. Vakcinace dobytka směsicí těchto serpinů vedla u nymf k výraznému snížení ve schopnosti sát a došlo k 28% a 43% navýšení v úmrtnosti samic a samců dospělých klíšťat (Imamura et al., 2006). Podobných výsledků bylo dosaženo po vakcinaci směsicí serpinů RAS-3/-4 spolu s 36-kDa imunodominantním proteinem RIM36 (Imamura et al., 2008).

Jednou z možností, jak otestovat funkci daného proteinu, je jeho knock-outování neboli vypnutí, což se následně sleduje změnami fenotypu. RNA interference patří mezi metody, kterou lze významně snížit expresi vybraného proteinu nejen v klíštěti.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo stanovit expresní profily IRS10-IRS-27 u různě sajících nymf klíštěte *Ixodes ricinus* a poté připravit dsRNA, pomocí níž se vypne exprese vybraných serpinů v klíštěti a následně sledovat vliv RNAi na fitness klíšťat a na přenos borelií do myšního hostitele.

#### *Stanovení exprese IRS10-IRS-27*

Expresní profily dosud analyzovaných serpinů u nymf *I. ricinus* lze rozdělit do 3 skupin. První skupinou jsou serpiny, které dosahují nejvyšší exprese genu první den po sání (kupříkladu IRS-1, -4 -8, -9, -14). Druhou skupinou jsou serpiny, jejichž exprese postupně roste v čase a maximální exprese genu dosáhnou až plně nasáté nymfy (např. IRS-2, -5). A třetí skupina zahrnuje serpiny s nevyhraněným profilem, (IRS-3, -7, -15, -18) (osobní sdělení dr. Langhansové, nepublikovaná data). Jinak tomu nebylo ani u mých analyzovaných inhibitorů serinových proteáz. Téměř všechny serpiny vykazovaly nejvyšší exprese v prvním

dni po přisátí. Pro IRS-10, -20 a -22 bylo toto zvýšení signifikantní v porovnání s nenasátými nymfami i nymfami sající 2 nebo 3-4 dny. To samé platí pro serpin IRS-23 a IRS-26, u nichž byla rovněž prokázána významnost v prvním dni sání oproti nenasátým nymfám. Výjimkou byl gen IRS-13, u něhož bylo nejvyšší exprese dosaženo až v posledních dnech sání, zatímco v prvním a druhém dni nebyla detekovaná žádná exprese tohoto genu. Serpinových genů s tímto typem expresního profilu je prozatím nejméně.

#### *Příprava dsRNA pro IRS10-22*

Na základě výsledků exprese inhibitorů serinových proteáz byly vybrány tři geny pro výrobu dvouvláknové RNA. Jednalo se o geny IRS-10, -20 a -22. Jak bylo již zmíněno v literární části, důležitou oblastí, jež je zodpovědná za interakci s cílovými proteázami, se nazývá RCL (reactive center loop). Tato smyčka tvoří pružný úsek o 17-20 aminokyselinách, které se shodují s aminokyselinami v aktivním centru cílové peptidázy. Tím je zajištěna selektivita serpinů (Silverman et al., 2001). Z těchto důvodů byly vybrány tyto tři geny (IRS-10, -20, -22), neboť se mezi sebou liší v RCL smyčce.

Během přípravy dsRNA daných genů byly jednotlivé kroky průběžně ověřovány a/nebo kontrolovány gelovou elektroforézou. Úspěšnost transformace plasmidu do *E. coli* byla ověřena elektroforézou pro selekci pozitivních a negativních kolonií. Z dané bakteriální suspenze byl poté izolován plasmid. Společností SEQme s univerzálními primery M13 byla provedena kontrolní sekvenace dle Sangera, kterou bylo potvrzeno, že došlo k úspěšnému vložení inzertu do plasmidu. Díky gelové elektroforéze byla ověřena i úspěšnost hybridizované dsRNA pro IRS-10 a IRS-20 (viz kapitola 6.2.2).

Pro serpin IRS-22 byl experiment v průběhu transformace dočasně pozastaven. Při koloniové PCR opakovaně nevycházely negativní kontroly. Je možné, že došlo buď ke kontaminaci vzorku při jeho manipulaci, nebo byla kontaminovaná negativní kontrola (PCR voda). Je třeba dbát vyšší opatrnosti při práci a vyvarovat se „cross kontaminaci“, čili připravit si jako první negativní kontrolu, aby se zabránilo případné kontaminaci bakteriemi.

#### *Ověření silencingu*

Připravená dsRNA genu IRS-10 a IRS-20 byla nymfám klíštěte *Ixodes ricinus* aplikována mikroinjekcí, což je jedna z nejčastěji používaných metod (de la Fuente et al., 2007). Jednoznačně se podařilo umlčet gen IRS-20. Exprese genu u nymf sajících 1 den, což byla doba, kdy bylo dosaženo nejvyšší exprese tohoto genu (viz kapitola 6.1), byla

snížena na 8,9 % v porovnání s kontrolními nymfami (GFP ~ 100 %). Exprese genu IRS-10 s primery pro gen IRS-20 nebyla významně změněna (84 %), což potvrzuje fakt, že umlčení IRS-20 je genově specifické. Nicméně injekcí dsRNA pro gen IRS-10 nedošlo k silencingu genu, nýbrž k jeho over-expresi se specifickými primery pro IRS-10, i s těmi nespecifickými pro IRS-20. V předchozích studiích bylo zjištěno, že geny IRS-10, -11 a -12 mají velice podobné složení aminokyselin v RCL oblasti, což by mohlo mít za následek jejich vzájemnou spolupráci, a tím vzájemné ovlivňování (nepublikovaná data dr. Chmelaře). Injekcí IRS-10 dsRNA tedy mohlo teoreticky dojít k silencingu IRS-10, ovšem zároveň zvýšení exprese IRS-11 a/nebo IRS-12, což mohlo právě být zachyceno real-time PCR (za předpokladu, že použité primery pro IRS-10 amplifikují i sekvence IRS-11 a/nebo IRS-12).

Pro zhodnocení vlivu serpinové over-exprese nebo mislokalizace serpinu v organismu bylo vyvinuto mnoho transgenních myší, rovněž byly identifikovány dva typy přirozených mutací (Serpina10 a -i2). Použitím myších modelů byly průběžně zkoumány funkce lidských serpinů. Doposud bylo vybráno 23 lidských serpinů pro studie za využití myší (Silverman et al., 2010). Ovšem studování cílových genů má dvě nevýhody. První nevýhodou je skutečnost, že exprese genu nemusí mít stejnou tkáňovou distribuci nebo shodnou funkci mezi orthology (myš x člověk). Například protein C inhibitor (SERPINA5) je u lidí exprimován v cévách a seminální tekutině, kdežto v myších reprodukčních orgánech je přítomnost tohoto inhibitoru omezena (Gianotten et al., 2004). Druhou nevýhodou je, že myši vlastní více paralogů serpinů (např. SERPINA1, -A3, -B1, -B6 a -B9), ale nemají žádné ortology serpinů v lidském genomu, např. SERPINA2, -4 nebo -A11. Zrovna tak funkce jednoho lidského serpinu může být zastoupena několika serpiny u myší nebo naopak (Silverman et Lomas, 2007). Fenotyp knock-outovaného genu je rovněž možné chybně interpretovat, pokud cílový či zkoumaný gen je chybný. Ortologní serpiny vykazují velmi často onu podobnou sekvenci v RCL smyčce (např. existuje podobnost mezi myším Serpina6a a lidským SERPINA6), čímž inhibují stejnou cílovou peptidázu nebo mohou demonstrovat podobnost expresního profilu ve tkáni (Kaiserman et al., 2002; Sun et al., 1997). V našem případě nejde přímo o zkoumání funkce genu mezi dvěma odlišnými druhy, ale je tím možné demonstrovat, že může docházet k over-expresi i v jednom druhu a ovlivnit či pozměnit výslednou expresi genu druhého, toho zkoumaného.

### *Vliv serpinů na fitness klíšťat a na přenos borelií B. afzelii do myšího hostitele*

RNA interference, jinými slovy umlčování genů, se používá pro zkoumání funkcí mnoha různých genů a to nejen v klíšťatech, ale i u dalších eukaryotních organismů. Funkční analýzy byly provedeny u klíšťat rodů *Amblyomma*, *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) (de la Fuente et al., 2007). Obecně při RNAi *in vivo* experimentech je hodnocena doba přežití injikovaných klíšťat, schopnost sání a schopnost kladení vajíček, což slouží k analýze efektu genového silencingu v oblasti krmení a reprodukce (de la Fuente et al., 2007). RNAi byla poprvé vyzkoušena u samic klíštěte *Amblyomma americanum*, kterým byla mikroinjekčně aplikována dsRNA genu HBP (histamin vázající protein), čímž se podařilo snížit tvorbu HBP transkriptů (Aljamali et al., 2002). Je známo, že infekce klíštěte patogenem vede ke změnám v transkriptomu. Odlišná exprese genů byla zaznamenána například v ováriích klíštěte *D. variabilis* nakažených rickettsiovou infekcí (Mulenga et al., 2003) nebo ve slinných žlázách klíštěte *R. appendiculatus* infikovaných parazitem *Theileria parva* (Nene et al., 2004). Byly i charakterizovány proteiny, jež jsou klíčové v infekci a v přenosu spirochét *B. burgdorferi*. Jedním takovým proteinem je povrchový protein C, tzv. OspC, jehož přítomnost je vyžadována pro přenos borelií u klíštěte *Ixodes scapularis* (Pal et al., 2004b). Pal et al. (2004) identifikovali i další povrchový protein, a to OspA jako bakteriální ligand pro TROSPA geny a demonstrovali, že snížením exprese TROSPA genů prostřednictvím RNA interference dochází k významnému snížení adherence dané bakterie na střevní epitel klíštěte *I. scapularis*, což snižuje přítomnost borelií u tohoto klíštěte (viz dále).

V této diplomové práci byly nymfy klíštěte *Ixodes ricinus* rovněž injikovány dsRNA daných genů pomocí mikroinjekce. Cílem bylo zhodnotit vliv aplikované dsRNA na fitness klíšťat, respektive na jejich schopnost sát, hmotnost, metamorfózu a schopnost přežití po injikaci této dsRNA. Pro zkoumání vlivu dsRNA na přenos borelií do myšího hostitele byly použity nymfy nakažené *B. afzelii*.

Samotnou aplikaci dsRNA přežily téměř všechny nymfy. Ovšem u nymf s knock-outovanými geny byla zaznamenána nižší schopnost sání, konkrétně IRS-10 KO 88,9 % a IRS-20 KO 96,4 %. Snížená schopnost sání byla u klíšťat zjištěna již při silencingu proteinu Salp14 (Narasimhan et al., 2004) nebo inhibicí homologu synaptobrevinu a nSec1 u klíštěte *A. americanum* (Karim et al., 2004). Umlčením serpinových genů z klíštěte *Rhipicephalus haemaphysaloides*, RHS-1 a RHS-2, se také zjistilo, že negativně ovlivňují schopnost klíšťat se přisát, čímž snižují i budoucí schopnost metamorfózy do dalšího stádia

(Yu et al., 2013). V porovnání s kontrolními nymfami byla rovněž zjištěna odlišnost v době sání, kdy třetí den po nasazení sálo ještě přes 40 % nymf s KO geny, zatímco u GFP nymf sálo už pouze 27,5 %. Lze tedy říci, že silencing těchto dvou genů má vliv na schopnost a dobu sání u nymf klíštěte *I. ricinus*. Po 2-3 měsících bylo zkontrolováno, zda došlo u nasátých nymf k přeměně do stádia dospělce. I v tomto případě byla zjištěna snížená schopnost metamorfózy. U nymf s umlčeným genem IRS-10 metamorfovalo jen 83 %, u nymf s IRS-20 KO byla metamorfóza o trochu úspěšnější (86,8 %). Nicméně v porovnání s kontrolní skupinou, kdy byla metamorfóza úspěšná z 94,4 %, je zřejmé, že i zde silencing IRS10/20 ovlivňuje schopnost proměny do dalšího vývojového stádia. Ovšem nebyl prokázán významný rozdíl v hmotnosti kontrolních nymf (4,35 mg) a nymf s knock-outovanými geny (IRS-10 KO ~ 4 mg, IRS-20 KO ~ 4,28 mg).

Některé studie se zabývaly funkcí subolesinu, u kterého byl prokázán vliv na úbytek hmotnosti klíšťat, na schopnost samic klást vajíčka a celkově ovlivňoval vitalitu jedinců, pokud byla snížena koncentrace mRNA tohoto proteinu díky RNAi (de la Fuente et al., 2006a; 2006b; Nijhof et al., 2007). Silencingem genu pro ferritin 2, jež je významný pro vstřebávání železa během sání, došlo rovněž k problémům při sání nymf klíštěte *I. ricinus* (Hajdušek et al., 2009). Pokud nymfy nejsou schopny sát, dochází ke snížení hmotnosti a schopnosti proměnit se do dospělce. Geny IRS-10 a IRS-20 mají sice vliv na schopnost sání, ukázala se rovněž i snížená schopnost metamorfózy, ale ve hmotnosti odpadlých nymf nebyl prokázán významný rozdíl.

Nymfy nakažené *B. afzelii* sály na myších po dobu 3-4 dnů. Během této doby mohlo dojít k přenosu borelií do myši prostřednictvím SAT efektu. Po dvou týdnech byly myši usmrceny a byly jim odebrány orgány, konkrétně ucho, srdce, močových měchýřů a kloub. Pokud byl alespoň jeden z těchto orgánů napaden boreliemi, byla tato myš považována za infikovanou. Zajímavé je, že u obou testovaných genů jedna myš nebyla infikována vůbec. U nymf s IRS-10 i u nymf s IRS-20 KO geny bylo zjištěno snížené množství borelií v srdci a močovém měchýři, což ale neplatilo pro ucho a kloub. Ovšem kvůli vysoké variabilitě v rámci skupiny ony zmíněné rozdíly nejsou statisticky významné. Doposud bylo zjištěno, že např. skupina proteinů ISAC má signifikantní vliv na přenos borelií (*B. burgdorferi*) v trávicí soustavě klíštěte (Soares et al., 2005), neboť snížením exprese těchto proteinů došlo ke snížení počtu borelií během přenosu. Snížením exprese mRNA TROSPA genů rovněž došlo ke sníženému počtu bakterií v klíštěti (Pal et al., 2004). U klíštěte rodu *Ixodes* byla zkoumána v přenosu borelií role proteinu Salp15,

u něhož se ukázala přítomnost komplementárních vazebných domén k povrchovým proteinům *B. burgdorferi* (Hojgaard et al., 2009).

V naší práci bylo zjištěno, že geny IRS-10, -16, -20, -22, -23, -24, -25, -26 a -27 jsou charakteristické stejným expresním profilem, kde je maximální exprese genu dosaženo v prvním dni po přisátí. Výjimku tvoří IRS-13, jež se řadí mezi serpiny, u nichž je nejvyšší exprese genu až v posledních dnech sání. Podařilo se dosáhnout silencingu genu IRS-20, ovšem pro gen IRS-10 se jednoznačně nejednalo o umlčení genu, ale pravděpodobně o over-expresi, jež mohla být způsobena přítomností jiných serpinových genů (IRS-11-IRS-12) snažících se kompenzovat možné potlačení exprese mRNA pro IRS-10, což mělo za následek expresi genu dosahující více jak 100 % vůči kontrole. Oba geny ovšem vykazují podobné účinky na přenos borelií *B. afzelii*. Zatímco v srdci a v močovém měchýři došlo k mírnému snížení v počtu borelií, pro ucho a kloub to neplatí. Avšak kvůli vysoké variabilitě a odchýlkám v rámci skupiny nelze tento pokles považovat za průkazný.

I když není umlčením genů IRS-10 i IRS-20 významný rozdíl ve hmotnosti nymf, je patrný mírný negativní vliv na schopnost sání, dobu sání i metamorfózu do stádia dospělce, což naznačuje, že dané serpiny (IRS-10, -20) teoreticky mohou mít vliv na fitness klíšťat.

V budoucnu by bylo dobré udělat vícenásobné knock-outy, čímž by se umlčelo více genů najednou, a dosáhlo by se tak výraznější změny ve fitness klíšťat. Je pravděpodobné, že u takového knock-outu by se ukázal opravdu silný fenotyp, respektive statisticky významný rozdíl v hmotnosti nymf, schopnosti sání, době sání nebo v metamorfóze do stádia dospělce.



## 8 Shrnutí

- Byla vypracována literární rešerše současných poznatků o serpínech krevsajících členovců a jejich potenciálním využití v humánní medicíně.
- Byla připravena cDNA z různě nasátých nymf klíštěte *Ixodes ricinus* (nenasáté nymfy, nymfy sající 1 den, nymfy sající 2 dny, nymfy sající 3-4 dny).
- Pomocí kvantitativní real-time PCR byly stanoveny expresní profily serpinů IRS-10, -13, -16, -20, -22, -23, -24, -25, -26, a -27 v průběhu sání nymf.
- Byla připravena dsRNA pro IRS-10 a IRS-20.
- Byl studován vliv serpinů IRS-10 a IRS-20 při sání nymf pomocí RNA interference.
  - Zbytková exprese IRS-20 po injekci dsRNA činila 8,9 %. Byl zaznamenán mírný pokles v metamorfóze do stádia dospělce a mírné snížení v úspěšnosti sání, totéž bylo zjištěno i u hmotnosti nasátých nymf. Rovněž byla zjištěna delší doba sání vůči kontrolní skupině. Bohužel nebylo možné prokázat tyto rozdíly jako statisticky významné.
  - Injekce dsRNA pro IRS-10 vedla naopak k několikanásobnému zvýšení exprese IRS-10. Oproti IRS-20 KO zde byl zaznamenán ještě mírnější pokles v úspěšnosti sání, ve hmotnosti nymf, a zrovna tak i delší doba sání. Schopnost metamorfózy u těchto nymf byla taktéž snížena. Ovšem ani v tomto případě nebyly prokázány signifikantní rozdíly.
  - Pro oba geny byla zaznamenána nižší přítomnost borelií v porovnání s GFP skupinou, a to v močovém měchýři a srdci. Neplatí to však pro ucho a kloub. Nicméně ani zde nebyl prokázán statisticky významný rozdíl z důvodů vysoké variability v rámci skupiny.

## 9 Seznam použitých zkratk

aPTT	aktivovaný částečný tromboplastinový čas
BP	binding protein
BPTI	bovine pancreatic trypsin inhibitor
CRT	kalreticulin
DICER	endoribonukleáza katalyzující hydrolytické štěpení RNA
DCs	dendritické buňky
DNA (cDNA)	deoxyribonukleová kyselina (komplementární DNA)
EDTA	kyselina ethylen-diamintetraoctová
GFP	reportérový gen pro vizualizaci exprese proteinů (green fluorescent protein)
HBP	protein vázající histamin
HRF	faktor uvolňující histamin
HLS-1/-2	serpin z klíštěte <i>Haemaphysalis longicornis</i>
IL	interleukin
INF	interferon
Ir-CPI	<i>Ixodes ricinus</i> contact phase inhibitor
IRS-2	<i>Ixodes ricinus</i> serpin 2
Iris	imunosupresor v <i>Ixodes ricinus</i>
IVC	individually ventilated cages (oddělené klecové systémy)
IxscS-1E1	serpin 1E1 z klíštěte <i>Ixodes scapularis</i>
KO	knock-out („vypnutý“ gen)
miRNA	micro RNA (jednovláknové řetězce nekódující RNA podílejících se na regulaci genové exprese)
mRNA	mediátorová RNA
MIP2	macrophage inflammatory protein 2 (makrofágový zánětlivý protein)
MCP-1	monocytární chemotaktický protein 1
NET	neutrofilová extracelulární past
nSec1	hydrolytický protein z klíštěte <i>Amblyomma americanum</i>
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PGE <sub>2</sub>	prostaglandin E <sub>2</sub>
PLCy1	fosfolipáza C $\gamma$ 1

RAS	serpin z klíštěte <i>R. appendiculatus</i>
RCL	reactive center loop (smyčka reaktivního centra)
RISC	RNA-induced silencing complex
RHS-1/-2	serpin z klíštěte <i>Rhipicephalus haemaphysaloides</i>
RNA (dsRNA)	ribonukleová kyselina (dvouvláknová RNA)
RNAi	RNA interference
RmS	serpin z klíštěte <i>Rhipicephalus microplus</i>
RT	pokožková teplota
RT-PCR	PCR spojená s reverzní transkripcí (pro amplifikaci mRNA)
SAT	saliva activated/assisted transmission (slinami aktivovaný přenos)
SERPIN	serin protease inhibitor (inhibitor serinových proteáz)
SGE	salivary gland extract (extrakt ze slinných žláz)
SialoL	sialostatin L
siRNA	short interfering RNA (RNA uplatňující se v procesu interference)
SPF	specific pathogen free
STAT	signal transducer and activator of transcription
TFPI	tissue factor pathway inhibitors
tHFR	tick histamine release factor
TLR	toll-like receptor
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor
TRIZOL	reagencie pro izolaci DNA/RNA/proteinu
TROSPA	tick receptor for OspA
qPCR	kvantitativní real-time PCR

## 10 Seznam literatury

- Aulak, K. S., Pemberton, P. A., Rosen, F. S., Carrell, R. W., Lachmann, P. J., & Harrison, R. A.** (1988). Dysfunctional C1-inhibitor (At), isolated from a type II hereditary-angio-oedema plasma, contains a P1 'reactive centre'(Arg444→ His) mutation. *Biochemical Journal*, 253(2), 615-618.
- Beaufays, J., Adam, B., Menten-Dedoyart, C., Fievez, L., Grosjean, A., Decrem, Y., & Vanhaeverbeek, M.** (2008). Ir-LBP, an *Ixodes ricinus* tick salivary LTB4-binding lipocalin, interferes with host neutrophil function. *PloS one*, 3(12), e3987.
- Binnington, K. C., & Kemp, D. H.** (1980). Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission. In *Advances in Parasitology* (Vol. 18, pp. 315-339). Academic Press.
- Black, W. C., & Piesman, J.** (1994). Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(21), 10034-10038.
- Blisnick, A. A., Foulon, T., & Bonnet, S. I.** (2017). Serine Protease Inhibitors in Ticks: An overview of their role in tick biology and tick-borne pathogen transmission. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 199.
- Bowman, A. S., & Sauer, J. R.** (2004). Tick salivary glands: function, physiology and future. *Parasitology*, 129(S1), S67-S81.
- Brown, W. M., & Dziegielewska, K. M.** (1997). Friends and relations of the cystatin superfamily - new members and their evolution. *Protein science*, 6(1), 5-12.
- Bruce, D., Perry, D. J., Borg, J. Y., Carrell, R. W., & Wardell, M. R.** (1994). Thromboembolic disease due to thermolabile conformational changes of antithrombin Rouen-VI (187 Asn--> Asp). *The Journal of clinical investigation*, 94(6), 2265-2274.
- Cabrita, L. D., & Bottomley, S. P.** (2004). How do proteins avoid becoming too stable? Biophysical studies into metastable proteins. *European Biophysics Journal*, 33(2), 83-88.
- Calvo, E., Dao, A., Pham, V. M., & Ribeiro, J. M.** (2007). An insight into the sialome of *Anopheles funestus* reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. *Insect biochemistry and molecular biology*, 37(2), 164-175.

- Calvo, E., Mizurini, D. M., Sá-Nunes, A., Ribeiro, J. M., Andersen, J. F., Mans, B. J., & Francischetti, I. M.** (2011). Alboserpin, a factor Xa inhibitor from the mosquito vector of yellow fever, binds heparin and membrane phospholipids and exhibits antithrombotic activity. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M111.
- Carrell, R. W., & Lomas, D. A.** (1997). Conformational disease. *The Lancet*, 350(9071), 134-138.
- Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G., & Cogoni, C.** (2000). Transcription: Gene silencing in worms and fungi. *Nature*, 404(6775), 245.
- Cerutti, H., & Casas-Mollano, J. A.** (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Current genetics*, 50(2), 81-99.
- Chmelar, J., Oliveira, C. J., Rezacova, P., Francischetti, I. M., Kovarova, Z., Pejler, G., & Kotsyfakis, M.** (2011). A tick salivary protein targets cathepsin G and chymase and inhibits host inflammation and platelet aggregation. *Blood*, 117(2), 736-744.
- Chmelar, J., Calvo, E., Pedra, J. H., Francischetti, I. M., & Kotsyfakis, M.** (2012). Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of proteomics*, 75(13), 3842-3854.
- Chmelar, J., Anderson, J. M., Mu, J., Jochim, R. C., Valenzuela, J. G., & Kopecky, J.** (2008). Insight into the sialome of the castor bean tick, *Ixodes ricinus*. *BMC genomics*, 9(1), 233.
- Chmelar, J., Kotal, J., Karim, S., Kopacek, P., Francischetti, I. M., Pedra, J. H., & Kotsyfakis, M.** (2016). Sialomes and mialomes: a systems-biology view of tick tissues and tick host interactions. *Trends in parasitology*, 32(3), 242-254.
- Coleman, S., DrÄhn, B., Petersen, G., Stolorov, J., & Kraus, K.** (1995). A *Drosophila* male accessory gland protein that is a member of the serpin superfamily of proteinase inhibitors is transferred to females during mating. *Insect biochemistry and molecular biology*, 25(2), 203-207.
- Dai, J., Wang, P., Adusumilli, S., Booth, C. J., Narasimhan, S., Anguita, J., & Fikrig, E.** (2009). Antibodies against a tick protein, Salp15, protect mice from the Lyme disease agent. *Cell host & microbe*, 6(5), 482-492.
- Dai, J., Narasimhan, S., Zhang, L., Liu, L., Wang, P., & Fikrig, E.** (2010). Tick histamine release factor is critical for *Ixodes scapularis* engorgement and transmission of the lyme disease agent. *PLoS pathogens*, 6(11), e1001205.

- Das R., Bhattachary-Chatterjee, M., Baral, R. N., Chatterjee, S. K., Zeytin, H., Chakraborty, M., & Foon, K. A.** (2000). Counterpoint. Cancer vaccines: single-epitope anti-idiotypic vaccine versus multiple-epitope antigen vaccine. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 49(3), 133-141.
- Davis, R. L., Shrimpton, A. E., Holohan, P. D., Bradshaw, C., Feiglin, D., Collins, G. H., & Krasnewich, D.** (1999). Familial dementia caused by polymerization of mutant neuroserpin. *Nature*, 401(6751), 376.
- Decrem, Y., Rath, G., Blasioli, V., Cauchie, P., Robert, S., Beaufays, J., & Vanhamme, L.** (2009). Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis. *Journal of Experimental Medicine*, 206(11), 2381-2395.
- de la Fuente, J., Almazán, C., Blouin, E. F., Naranjo, V., & Kocan, K. M.** (2005). RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitology research*, 96(3), 137-141.
- de la Fuente, J., Kocan, K. M., Almazán, C., & Blouin, E. F.** (2007). RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks. *Trends in parasitology*, 23(9), 427-433.
- de la Fuente, J., Almazán, C., Naranjo, V., Blouin, E. F., & Kocan, K. M.** (2006). Synergistic effect of silencing the expression of tick protective antigens 4D8 and Rs86 in *Rhipicephalus sanguineus* by RNA interference. *Parasitology research*, 99(2), 108-113.
- de la Fuente, J., Almazán, C., Blouin, E. F., Naranjo, V., & Kocan, K. M.** (2006). Reduction of tick infections with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* by targeting the tick protective antigen subolesin. *Parasitology research*, 100(1), 85-91.
- de la Fuente, J., Maritz-Olivier, C., Naranjo, V., Ayoubi, P., Nijhof, A. M., Almazán, C., & Gortazar, C.** (2008). Evidence of the role of tick subolesin in gene expression. *BMC genomics*, 9(1), 372.
- Dementiev, A., Simonovic, M., Volz, K., & Gettins, P. G.** (2003). Canonical inhibitor-like interactions explain reactivity of  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor Pittsburgh and antithrombin with proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37881-37887.
- Dernburg, A. F., Zalevsky, J., Colaiácovo, M. P., & Villeneuve, A. M.** (2000). Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line. *Genes & Development*, 14(13), 1578-1583

- Elliot, A. J., & Harackiewicz, J. M.** (1996). Approach and avoidance achievement goals and intrinsic motivation: A mediational analysis. *Journal of personality and social psychology*, 70(3), 461.
- Estrada-Peña, A., de La Fuente, J., Ostfeld, R. S., & Cabezas-Cruz, A.** (2015). Interactions between tick and transmitted pathogens evolved to minimise competition through nested and coherent networks. *Scientific reports*, 5, 10361.
- Farley, K., Stolley, J. M., Zhao, P., Cooley, J., & Remold-O'Donnell, E.** (2012). A serpinB1 regulatory mechanism is essential for restricting neutrophil extracellular trap generation. *The Journal of Immunology*, 189(9), 4574-4581.
- Ferreira, C. A. S., Vaz Jr, I. D. S., da Silva, S. S., Haag, K. L., Valenzuela, J. G., & Masuda, A.** (2002). Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) calreticulin. *Experimental Parasitology*, 101(1), 25-34.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *nature*, 391(6669), 806.
- Fire, A. Z., & Mello, C. C.** (2006). The nobel prize in physiology or medicine 2006. URL: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates).
- Francischetti, I. M., Valenzuela, J. G., Andersen, J. F., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M.** (2002). Ixolaris, a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick, *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood*, 99(10), 3602-3612.
- Francischetti, I. M., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M.** (2004). Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thrombosis and haemostasis*, 91(05), 886-898.
- Francischetti, I. M., Pham, V. M., Mans, B. J., Andersen, J. F., Mather, T. N., Lane, R. S., & Ribeiro, J. M.** (2005). The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect biochemistry and molecular biology*, 35(10), 1142-1161.

- Francischetti, I. M., Sa-Nunes, A., Mans, B. J., Santos, I. M., & Ribeiro, J. M.** (2009). The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, *14*, 2051.
- Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J., & Müller, C. E.** (2011). International union of basic and clinical pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors an update. *Pharmacological reviews*, pr-110.
- Garcia, S., Billecocq, A., Crance, J. M., Munderloh, U., Garin, D., & Bouloy, M.** (2005). Nairovirus RNA sequences expressed by a *Semliki Forest* virus replicon induce RNA interference in tick cells. *Journal of virology*, *79*(14), 8942-8947.
- Garg, R., Juncadella, I. J., Ramamoorthi, N., Ananthanarayanan, S. K., Thomas, V., Rincón, M., & Anguita, J.** (2006). Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *The Journal of Immunology*, *177*(10), 6579-6583.
- Gianotten, J., Schimmel, A. W., Van Der Veen, F., Lombardi, M. P., & Meijers, J. C.** (2004). Absence of mutations in the PCI gene in subfertile men. *Molecular human reproduction*, *10*(11), 807-813.
- Gillespie, R. D., Dolan, M. C., Piesman, J., & Titus, R. G.** (2001). Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. *The Journal of Immunology*, *166*(7), 4319-4326.
- Gregorio De E., Tzou, P., & Lemaitre, B.** (2002). How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host pathogen interactions. *Current opinion in microbiology*, *5*(1), 102-110.
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., & Mello, C. C.** (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, *106*(1), 23-34.
- Guo, X., Booth, C. J., Paley, M. A., Wang, X., DePonte, K., Fikrig, E., & Montgomery, R. R.** (2009). Inhibition of neutrophil function by two tick salivary proteins. *Infection and immunity*, *77*(6), 2320-2329.
- Haasnoot, J., & Berkhout, B.** (2006). RNA interference: its use as antiviral therapy. In *RNA Towards Medicine* (pp. 117-150). Springer, Berlin, Heidelberg.



- Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Buresova, V., Franta, Z., Sauman, I., & Grubhoffer, L.** (2009). Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(4), 1033-1038.
- Hajnicka, V., Kocakova, P., Slavikova, M., Slovak, M., Gašperik, J., Fuchsberger, N., & Nuttall, P. A.** (2001). Anti-interleukin 8 activity of tick salivary gland extracts. *Parasite immunology*, *23*(9), 483-489.
- Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D., & Phipps, R. P.** (2002). Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends in immunology*, *23*(3), 144-150.
- Haskó, G., & Cronstein, B. N.** (2013). Regulation of inflammation by adenosine. *Frontiers in immunology*, *4*, 85.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M.** (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, *6*(10), 986-994.
- Heit, C., Jackson, B. C., McAndrews, M., Wright, M. W., Thompson, D. C., Silverman, G. A., & Vasiliou, V.** (2013). Update of the human and mouse SERPIN gene superfamily. *Human genomics*, *7*(1), 22.
- Herrmann, C., & Gern, L.** (2015). Search for blood or water is influenced by *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *Parasites & vectors*, *8*(1), 6.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R.** (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotechnology*, *11*(9), 1026.
- Hojgaard, A., Biketov, S. F., Shtannikov, A. V., Zeidner, N. S., & Piesman, J.** (2009). Molecular identification of Salp15, a key salivary gland protein in the transmission of lyme disease spirochetes, from *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Journal of medical entomology*, *46*(6), 1458-1463.
- Hovius, J. W. R., Ramamoorthi, N., Van't Veer, C., De Groot, K. A., Nijhof, A. M., Jongejan, F., & Fikrig, E.** (2007). Identification of Salp15 homologues in *Ixodes ricinus* ticks. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *7*(3), 296-303.
- Hovius, J. W., Levi, M., & Fikrig, E.** (2008). Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva. *PLoS medicine*, *5*(2), e43.

- Huntington, J. A., Read, R. J., & Carrell, R. W.** (2000). Structure of a serpin protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*, *407*(6806), 923.
- Ibelli, A. M., Kim, T. K., Hill, C. C., Lewis, L. A., Bakshi, M., Miller, S., & Mulenga, A.** (2014). A blood meal-induced *Ixodes scapularis* tick saliva serpin inhibits trypsin and thrombin, and interferes with platelet aggregation and blood clotting. *International journal for parasitology*, *44*(6), 369-379.
- Imamura, S., Junior, I. D. S. V., Sugino, M., Ohashi, K., & Onuma, M.** (2005). A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine*, *23*(10), 1301-1311.
- Imamura, S., Namangala, B., Tajima, T., Tembo, M. E., Yasuda, J., Ohashi, K., & Onuma, M.** (2006). Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vaccine*, *24*(13), 2230-2237.
- Imamura, S., Konnai, S., da Silva Vaz, I. J., Yamada, S., Nakajima, C., Ito, Y., & Ohashi, K.** (2008). Effects of anti-tick cocktail vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. *Japanese Journal of Veterinary Research*, *56*(2), 85-98.
- Irving, J. A., Pike, R. N., Lesk, A. M., & Whisstock, J. C.** (2000). Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome research*, *10*(12), 1845-1864.
- Irving, J. A., Pike, R. N., Dai, W., Brömme, D., Worrall, D. M., Silverman, G. A., & Whisstock, J. C.** (2002). Evidence that serpin architecture intrinsically supports papain-like cysteine protease inhibition: engineering  $\alpha$ 1-antitrypsin to inhibit cathepsin proteases. *Biochemistry*, *41*(15), 4998-5004.
- Irving, J. A., Shushanov, S. S., Pike, R. N., Popova, E. Y., Brömme, D., Coetzer, T. H., & Whisstock, J. C.** (2002). Inhibitory activity of a heterochromatin-associated serpin (MENT) against papain-like cysteine proteinases affects chromatin structure and blocks cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(15), 13192-13201.
- Irving, J. A., Steenbakkers, P. J., Lesk, A. M., Op den Camp, H. J., Pike, R. N., & Whisstock, J. C.** (2002). Serpins in prokaryotes. *Molecular biology and evolution*, *19*(11), 1881-1890.

- Jaenson, T. G., & Lindgren, E.** (2011). The range of *Ixodes ricinus* and the risk of contracting Lyme borreliosis will increase northwards when the vegetation period becomes longer. *Ticks and tick-borne diseases*, 2(1), 44-49.
- Jiang, D., Persinger, R., Wu, Q., Gross, A., & Chu, H. W.** (2013).  $\alpha$ 1-antitrypsin promotes SPLUNC1-mediated lung defense against *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *Respiratory research*, 14(1), 122.
- Jones, L. D., Matthewson, M., & Nuttall, P. A.** (1992). Saliva-activated transmission (SAT) of Thogoto virus: dynamics of SAT factor activity in the salivary glands of *Rhipicephalus appendiculatus*, *Amblyomma variegatum*, and *Boophilus microplus* ticks. *Experimental & applied acarology*, 13(4), 241-248.
- Juncadella, I. J., Garg, R., Ananthnarayanan, S. K., Yengo, C. M., & Anguita, J.** (2007). T-cell signaling pathways inhibited by the tick saliva immunosuppressor, Salp15. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 49(3), 433-438.
- Kaewhom, P., Stich, R. W., Needham, G. R., & Jittapalapong, S.** (2008). Molecular analysis of calreticulin expressed in salivary glands of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* indigenous to Thailand. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1149(1), 53-57.
- Kaiserman, D., Knaggs, S., Scarff, K. L., Gillard, A., Mirza, G., Cadman, M., & Remold-O'Donnell, E.** (2002). Comparison of human chromosome 6p25 with mouse chromosome 13 reveals a greatly expanded ov-serpin gene repertoire in the mouse. *Genomics*, 79(3), 349-362.
- Karim, S., Ramakrishnan, V. G., Tucker, J. S., Essenberg, R. C., & Sauer, J. R.** (2004). *Amblyomma americanum* salivary glands: double-stranded RNA-mediated gene silencing of synaptobrevin homologue and inhibition of PGE<sub>2</sub> stimulated protein secretion. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(4), 407-413.
- Karim, S., Ramakrishnan, V. G., Tucker, J. S., Essenberg, R. C., & Sauer, J. R.** (2004). *Amblyomma americanum* salivary gland homolog of nSec1 is essential for saliva protein secretion. *Biochemical and biophysical research communications*, 324(4), 1256-1263.
- Kazimirova, M., Koh, C. Y., & Kini, R. M.** (2010). Tiny ticks are vast sources of antihaemostatic factors. In *Toxins and Hemostasis* (pp. 113-130). Springer, Dordrecht.

- Kazimirova, M., & Stibraniova, I.** (2013). Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 43.
- Khan, M. S., Singh, P., Azhar, A., Naseem, A., Rashid, Q., Kabir, M. A., & Jairajpuri, M. A.** (2011). Serpin inhibition mechanism: a delicate balance between native metastable state and polymerization. *Journal of amino acids*, 2011.
- Kim, T. K., Tirloni, L., Radulovic, Z., Lewis, L., Bakshi, M., Hill, C., & Mulenga, A.** (2015). Conserved *Amblyomma americanum* tick Serpin19, an inhibitor of blood clotting factors Xa and XIa, trypsin and plasmin, has anti-haemostatic functions. *International journal for parasitology*, 45(9-10), 613-627.
- Klompen, H., Dobson, S. J., & Barker, S. C.** (2002). A new subfamily, *Bothriocrotoninae* n. subfam., for the genus *Bothriocroton* Keirans, King & Sharrad, 1994 status amend. (Ixodida: Ixodidae), and the synonymy of *Aponomma* Neumann, 1899 with *Amblyomma* Koch, 1844. *Systematic Parasitology*, 53(2), 101-107.
- Koh, C. Y., & Kini, R. M.** (2009). Molecular diversity of anticoagulants from haematophagous animals. *Thrombosis and haemostasis*, 102(09), 437-453.
- Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Francischetti, I. M., Mather, T. N., Andersen, J. F., & Ribeiro, J. M.** (2006). Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26298-26307.
- Kotsyfakis, M., Karim, S., Andersen, J. F., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M.** (2007). Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(40), 29256-29263.
- Kotsyfakis, M., Anderson, J. M., Andersen, J. F., Calvo, E., Francischetti, I. M., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M.** (2008). Cutting edge: Immunity against a “silent” salivary antigen of the Lyme vector *Ixodes scapularis* impairs its ability to feed. *The Journal of Immunology*, 181(8), 5209-5212.
- Kotsyfakis, M., Horka, H., Salat, J., & Andersen, J. F.** (2010). The crystal structures of two salivary cystatins from the tick *Ixodes scapularis* and the effect of these inhibitors on the establishment of *Borrelia burgdorferi* infection in a murine model. *Molecular microbiology*, 77(2), 456-470.

- Kotyza J., Krepela E.** (2002): Proteases and antiproteases in health and disease – a review. III. Cysteine proteases and their natural inhibitors. *Biomarkers and Environment* 5(1): 2-17.
- Kycková, K., & Kopecky, J.** (2006). Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*. *Journal of medical entomology*, 43(6), 1208-1214.
- Langhansova, H., Staudt, V., Klein, M., Taube, C., Reuter, S., Dehzad, N., John F. Andersen, Jan Kopecky, Hansjörg Schild, Michalis Kotsyfakis, Markus Hoffmann, Bastian Gerlitzki, Michael Stassen, Tobias Bopp and Edgar Schmitt.** (2012). The tick salivary protein sialostatin L inhibits the Th9-derived production of the asthma-promoting cytokine IL-9 and is effective in the prevention of experimental asthma. *The Journal of Immunology*, 188(6), 2669-2676.
- Langhansova, H., Bopp, T., Schmitt, E., & Kopecky, J.** (2015). Tick saliva increases production of three chemokines including monocyte chemoattractant protein-1, a histamine-releasing cytokine. *Parasite immunology*, 37(2), 92-96.
- Law, R. H., Irving, J. A., Buckle, A. M., Ruzyla, K., Buzza, M., Bashtannyk-Puhlovich, T. A., & Bird, P. I.** (2005). The high resolution crystal structure of the human tumor suppressor maspin reveals a novel conformational switch in the G-helix. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), 22356-22364.
- Law, R. H., Zhang, Q., McGowan, S., Buckle, A. M., Silverman, G. A., Wong, W., & Whisstock, J. C.** (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome biology*, 7(5), 216.
- Leboulle, G., Crippa, M., Decrem, Y., Mejri, N., Brossard, M., Bollen, A., & Godfroid, E.** (2002). Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. *Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 10083-10089.
- Leboulle, G., Rochez, C., Louahed, J., Ruti, B., Brossard, M., Bollen, A., & Godfroid, E.** (2002). Isolation of *Ixodes ricinus* salivary gland mRNA encoding factors induced during blood feeding. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 66(3), 225-233.
- Levashina, E. A., Langley, E., Green, C., Gubb, D., Ashburner, M., Hoffmann, J. A., & Reichhart, J. M.** (1999). Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. *Science*, 285(5435), 1917-1919.

- Levashina, E. A., Moita, L. F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M., & Kafatos, F. C.** (2001). Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell*, *104*(5), 709-718.
- Li, J., Wang, Z., Canagarajah, B., Jiang, H., Kanost, M., & Goldsmith, E. J.** (1999). The structure of active serpin 1K from *Manduca sexta*. *Structure*, *7*(1), 103-109.
- Liao, M., Zhou, J., Gong, H., Boldbaatar, D., Shirafuji, R., Batur, B., & Fujisaki, K.** (2009). Hemalin, a thrombin inhibitor isolated from a midgut cDNA library from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of insect physiology*, *55*(2), 165-174.
- Linden, J., & Cekic, C.** (2012). Regulation of lymphocyte function by adenosine. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *32*(9), 2097-2103.
- Limera, C., Sabbadini, S., Sweet, J. B., & Mezzetti, B.** (2017). New biotechnological tools for the genetic improvement of major woody fruit species. *Frontiers in plant science*, *8*, 1418.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *methods*, *25*(4), 402-408.
- Loebermann, H., Tokuoka, R., Deisenhofer, J., & Huber, R.** (1984). Human  $\alpha$ 1-proteinase inhibitor: crystal structure analysis of two crystal modifications, molecular model and preliminary analysis of the implications for function. *Journal of molecular biology*, *177*(3), 531-557.
- Lomas, D. A., Dyfed, L. E., Finch, J. T., & Carrell, R. W.** (1992). The mechanism of Z  $\alpha$ 1-antitrypsin accumulation in the liver. *Nature*, *357*(6379), 605.
- Machackova, M., Obornik, M., & Kopecky, J.** (2006). Effect of salivary gland extract from *Ixodes ricinus* ticks on the proliferation of *Borrelia burgdorferi sensu stricto* in vivo. *Folia parasitologica*, *53*(2), 153.
- Mans, B. J., De Klerk, D., Pienaar, R., & Latif, A. A.** (2011). *Nuttalliella namaqua*: a living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for the evolution of blood-feeding in ticks. *PloS one*, *6*(8), e23675.
- Maritz-Olivier, C., Stutzer, C., Jongejan, F., Neitz, A. W., & Gaspar, A. R.** (2007). Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. *Trends in parasitology*, *23*(9), 397-407.

- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Peña, A., George, J. C., & Kazimirova, M.** (2013). Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites & vectors*, *6*(1), 1.
- Monteiro, R. Q., Rezaie, A. R., Ribeiro, J. M., & Francischetti, I. M.** (2005). Ixolaris: a factor Xa heparin-binding exosite inhibitor. *Biochemical Journal*, *387*(3), 871-877.
- Moser, F., Irwin, D., Chen, S., & Wilson, D. B.** (2008). Regulation and characterization of *Thermobifida fusca* carbohydrate-binding module proteins E7 and E8. *Biotechnology and bioengineering*, *100*(6), 1066-1077.
- Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., & Rémoué, K.** (2000). *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, *101*(5), 533-542.
- Mueller, J. L., Page, J. L., & Wolfner, M. F.** (2007). An ectopic expression screen reveals the protective and toxic effects of *Drosophila* seminal fluid proteins. *Genetics*, *175*(2), 777-783.
- Mulenga, A., Sugimoto, C., & Onuma, M.** (2000). Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. *Microbes and Infection*, *2*(11), 1353-1361.
- Mulenga, A., Macaluso, K. R., Simser, J. A., & Azad, A. F.** (2003). Dynamics of *Rickettsia* tick interactions: identification and characterization of differentially expressed mRNAs in uninfected and infected *Dermacentor variabilis*. *Insect molecular biology*, *12*(2), 185-193.
- Mulenga, A., & Azad, A. F.** (2005). The molecular and biological analysis of ixodid ticks histamine release factors. *Experimental & applied acarology*, *37*(3-4), 215-229.
- Mulenga, A., Khumthong, R., & Chalaire, K. C.** (2009). *Ixodes scapularis* tick serine proteinase inhibitor (serpin) gene family; annotation and transcriptional analysis. *BMC genomics*, *10*(1), 217.
- Mulenga, A., Kim, T., & Ibelli, A. M. G.** (2013). *Amblyomma americanum* tick saliva serine protease inhibitor 6 is a cross-class inhibitor of serine proteases and papain-like cysteine proteases that delays plasma clotting and inhibits platelet aggregation. *Insect molecular biology*, *22*(3), 306-319.

- Nagata, K.** (1996). Hsp47: a collagen-specific molecular chaperone. *Trends in biochemical sciences*, 21(1), 23-26.
- Napoli, J. L., & Race, K. R.** (1990). Microsomes convert retinol and retinal into retinoic acid and interference in the conversions catalyzed by cytosol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1034(2), 228-232.
- Narasimhan, S., Koski, R. A., Beaulieu, B., Anderson, J. F., Ramamoorthi, N., Kantor, F., & Fikrig, E.** (2002). A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect molecular biology*, 11(6), 641-650.
- Narasimhan, S., Montgomery, R. R., DePonte, K., Tschudi, C., Marcantonio, N., Anderson, J. F., & Fikrig, E.** (2004). Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(5), 1141-1146.
- Narasimhan, S., DePonte, K., Marcantonio, N., Liang, X., Royce, T. E., Nelson, K. F., & Fikrig, E.** (2007). Immunity against *Ixodes scapularis* salivary proteins expressed within 24 hours of attachment thwarts tick feeding and impairs *Borrelia* transmission. *PloS one*, 2(5), e451.
- Nava, S., Mangold, A. J., Mastropaolo, M., Venzal, J. M., Oscherov, E. B., & Guglielmone, A. A.** (2009). *Amblyomma boeroi* n. sp. (Acari: Ixodidae), a parasite of the Chacoan peccary *Catagonus wagneri* (Rusconi) (Artiodactyla: Tayassuidae) in Argentina. *Systematic parasitology*, 73(3), 161.
- Nene, V., Lee, D., Kang'a, S., Skilton, R., Shah, T., de Villiers, E., & Bishop, R.** (2004). Genes transcribed in the salivary glands of female *Rhipicephalus appendiculatus* ticks infected with *Theileria parva*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 34(10), 1117-1128.
- Nicholson, W. L., Masters, E., & Wormser, G. P.** (2009). Preliminary serologic investigation of 'Rickettsia amblyommii' in the aetiology of Southern tick associated rash illness (STARI). *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 235-236.
- Nijhof, A. M., Taoufik, A., De la Fuente, J., Kocan, K. M., De Vries, E., & Jongejan, F.** (2007). Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. *International Journal for Parasitology*, 37(6), 653-662.



- Nuttall, P. A., & Labuda, M.** (2004). Tick host interactions: saliva-activated transmission. *Parasitology*, *129*(S1), S177-S189.
- Obenchain, F. D., Diehl, P. A., Aeschlimann, A.** (1982). Tick reproduction: oogenesis and oviposition. In *Physiology of ticks*(pp. 277-350).
- Oliveira, A. S., Xavier-Filho, J., & Sales, M. P.** (2003). Cysteine proteinases and cystatins. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *46*(1), 91-104.
- Overzier, E., Pfister, K., Herb, I., Mahling, M., Böck Jr, G., & Silaghi, C.** (2013). Detection of tick-borne pathogens in roe deer (*Capreolus capreolus*), in questing ticks (*Ixodes ricinus*), and in ticks infesting roe deer in southern Germany. *Ticks and tick-borne diseases*, *4*(4), 320-328.
- Paesen, G. C., Adams, P. L., Harlos, K., Nuttall, P. A., & Stuart, D. I.** (1999). Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Molecular cell*, *3*(5), 661-671.
- Pak, S. C., Kumar, V., Tsu, C., Luke, C. J., Askew, Y. S., Askew, D. J., & Silverman, G. A.** (2004). Srp-2 is a cross-class inhibitor that participates in post-embryonic development of the nematode *Caenorhabditis elegans*: Initial characterization of the Clade L serpins. *Journal of Biological Chemistry*.
- Pal, U., Li, X., Wang, T., Montgomery, R. R., Ramamoorthi, N., Bao, F., & Telford, S.** (2004). TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell*, *119*(4), 457-468.
- Pal, U., Yang, X., Chen, M., Bockenstedt, L. K., Anderson, J. F., Flavell, R. A., & Fikrig, E.** (2004). OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. *The Journal of clinical investigation*, *113*(2), 220-230.
- Palenikova, J., Lieskovska, J., Langhansova, H., Kotsyfakis, M., Chmelar, J., & Kopecky, J.** (2015). *Ixodes ricinus* salivary serpin IRS-2 affects Th17 differentiation via inhibition of IL-6/STAT-3 signalling pathway. *Infection and immunity*, IAI-03065.
- Pechova, J., Stepanova, G., Kovar, L., & Kopecky, J.** (2002). Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochaetes. *Folia parasitologica*, *49*(2), 153-159.
- Pemberton, P. A., Stein, P. E., Pepys, M. B., Potter, J. M., & Carrell, R. W.** (1988). Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation. *Nature*, *336*(6196), 257.

- Phipps, R. P., Stein, S. H., & Roper, R. L.** (1991). A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunology today*, 12(10), 349-352.
- Prevot, P. P., Adam, B., Boudjeltia, K. Z., Brossard, M., Lins, L., Cauchie, P., & Godfroid, E.** (2006). Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26361-26369.
- Prevot, P. P., Beschin, A., Lins, L., Beaufays, J., Grosjean, A., Bruys, L., & Vanhamme, L.** (2009). Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. *The FEBS journal*, 276(12), 3235-3246.
- Ramachandra, R. N., & Wikel, S. K.** (1992). Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *Journal of medical entomology*, 29(5), 818-826.
- Ramamoorthi, N., Narasimhan, S., Pal, U., Bao, F., Yang, X. F., Fish, D., & Koski, R. A.** (2005). The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. *Nature*, 436(7050), 573.
- Ray, M. K., Datta, B., Chakraborty, A., Chattopadhyay, A., Meza-Keuthen, S., & Gupta, N. K.** (1992). The eukaryotic initiation factor 2 associated 67-kDa polypeptide (p67) plays a critical role in regulation of protein synthesis initiation in animal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(2), 539-543.
- Renard, G., Lara, F. A., De Cardoso, F. C., Miguens, F. C., Dansa-Petretski, M., Termignoni, C., & Masuda, A.** (2002). Expression and immunolocalization of a *Boophilus microplus* cathepsin L-like enzyme. *Insect molecular biology*, 11(4), 325-328.
- Rezaie, A. R.** (1998). Calcium enhances heparin catalysis of the antithrombin-factor Xa reaction by a template mechanism. Evidence that calcium alleviates Gla domain antagonism of heparin binding to factor Xa. *Journal of Biological Chemistry*, 273(27), 16824-16827.
- Ribeiro, J. C.** (1987). *Ixodes dammini*: salivary anti-complement activity. *Experimental parasitology*, 64(3), 347-353.
- Ribeiro, J. C., Weis, J. J., & Telford III, S. R.** (1990). Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. *Experimental parasitology*, 70(4), 382-388.
- Ribeiro, J. M., Endris, T. M., & Endris, R.** (1991). Saliva of the soft tick, *Ornithodoros moubata*, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comparative biochemistry and physiology. A, Comparative physiology*, 100(1), 109-112.

- Rühlmann, A., Kukla, D., Schwager, P., Bartels, K., & Huber, R.** (1973). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor: crystal structure determination and stereochemistry of the contact region. *Journal of molecular biology*, 77(3), 417-436.
- Schick, C., Pemberton, P. A., Shi, G. P., Kamachi, Y., Çataltepe, S., Bartuski, A. J., & Silverman, G. A.** (1998). Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry*, 37(15), 5258-5266.
- Schroeder, H., Daix, V., Gillet, L., Renauld, J. C., & Vanderplassen, A.** (2007). The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species. *Microbes and infection*, 9(2), 247-250.
- Schwaiger, M., Peter, O., & Cassinotti, P.** (2001). Routine diagnosis of *Borrelia burgdorferi* (*sensu lato*) infections using a real-time PCR assay. *Clinical microbiology and infection*, 7(9), 461-469.
- Silverman, G. A., Bird, P. I., Carrell, R. W., Coughlin, P. B., Gettins, P. G., Irving, J. I., & Remold-O'Donnell, E.** (2001). The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins: Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and revised nomenclature. *Journal of Biological Chemistry*.
- Silverman, G. A., & Lomas, D. A.** (2007). *Molecular and cellular aspects of the serpinopathies and disorders in serpin activity*. World Scientific.
- Silverman, G. A., Whisstock, J. C., Bottomley, S. P., Huntington, J. A., Kaiserman, D., Luke, C. J., Pack, S. C., Reichhart, J.-M. & Bird, P. I.** (2010). Serpins flex their muscle I. Putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24299-24305.
- Simo, L., Koci, J., Zitnan, D., & Park, Y.** (2011). Evidence for D1 dopamine receptor activation by a paracrine signal of dopamine in tick salivary glands. *PLoS One*, 6(1), e16158.
- Soares, C. A. G., Lima, C. M. R., Dolan, M. C., Piesman, J., Beard, C. B., & Zeidner, N. S.** (2005). Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the isac gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Insect molecular biology*, 14(4), 443-452.

- Stark, K. R., & James, A. A.** (1995). A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Experimental parasitology*, *81*(3), 321-331.
- Stark, K. R., & James, A. A.** (1998). Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(33), 20802-20809.
- Stein, P., & Chothia, C.** (1991). Serpin tertiary structure transformation. *Journal of molecular biology*, *221*(2), 615-621.
- Stein, P. E., & Carrell, R. W.** (1995). What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease? *Nature Structural and Molecular Biology*, *2*(2), 96.
- Sugino, M., Imamura, S., Mulenga, A., Nakajima, M., Tsuda, A., Ohashi, K., & Onuma, M.** (2003). A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. *Vaccine*, *21*(21-22), 2844-2851.
- Sun, J., Ooms, L., Bird, C. H., Sutton, V. R., Trapani, J. A., & Bird, P. I.** (1997). A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the granzyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9). *Journal of Biological Chemistry*, *272*(24), 15434-15441.
- Tew, D. J., & Bottomley, S. P.** (2001). Intrinsic fluorescence changes and rapid kinetics of proteinase deformation during serpin inhibition. *FEBS letters*, *494*(1-2), 30-33.
- Tirloni, L., Kim, T. K., Coutinho, M. L., Ali, A., Seixas, A., Termignoni, C., & da Silva Vaz Jr, I.** (2016). The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship. *Insect biochemistry and molecular biology*, *71*, 12-28.
- Toyomane, K., Konnai, S., Niwa, A., Githaka, N., Isezaki, M., Yamada, S., & Murata, S.** (2016). Identification and the preliminary in vitro characterization of IRIS homologue from salivary glands of *Ixodes persulcatus* Schulze. *Ticks and tick-borne diseases*, *7*(1), 119-125.
- Tyson, K., Elkins, C., Patterson, H., Fikrig, E., & De Silva, A.** (2007). Biochemical and functional characterization of Salp20, an histamine binding protein tick salivary protein that inhibits the complement pathway. *Insect molecular biology*, *16*(4), 469-479.

- Tyson, K. R., Elkins, C., & De Silva, A. M.** (2008). A novel mechanism of complement inhibition unmasked by a tick salivary protein that binds to properdin. *The Journal of Immunology*, 180(6), 3964-3968.
- Valenzuela, J. G., Charlab, R., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M.** (2000). Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 275(25), 18717-18723
- Vancová, I., Hajnicka, V., Slovak, M., & Nuttall, P. A.** (2010). Anti-chemokine activities of ixodid ticks depend on tick species, developmental stage, and duration of feeding. *Veterinary parasitology*, 167(2-4), 274-278.
- Verma, S., Dixit, R., & Pandey, K. C.** (2016). Cysteine proteases: modes of activation and future prospects as pharmacological targets. *Frontiers in pharmacology*, 7, 107.
- Wang, Y. G., Hassan, M. D., Shariff, M., Zamri, S. M., & Chen, X.** (1999). Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. *Diseases of aquatic organisms*, 39(1), 1-11.
- Whisstock, J. C., Bottomley, S. P., Bird, P. I., Pike, R. N., & Coughlin, P.** (2005). Serpins 2005-fun between the  $\beta$ -sheets. *The FEBS journal*, 272(19), 4868-4873.
- Wikel, S. K.** (1999). Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *International journal for parasitology*, 29(6), 851-859.
- Willadsen, P., & Jongejan, F.** (1999). Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitology today*, 15(7), 258-262.
- Wilske, B., Fingerle, V., & Schulte-Spechtel, U.** (2007). Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 49(1), 13-21.
- Xu, T., Lew-Tabor, A., & Rodriguez-Valle, M.** (2016). Effective inhibition of thrombin by *Rhipicephalus microplus* serpin-15 (RmS-15) obtained in the yeast *Pichia pastoris*. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(1), 180-187.
- Yu, Y., Cao, J., Zhou, Y., Zhang, H., & Zhou, J.** (2013). Isolation and characterization of two novel serpins from the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. *Ticks and tick-borne diseases*, 4(4), 297-303.

- Zeidner, N. S., Schneider, B. S., Nuncio, M. S., Gern, L., & Piesman, J.** (2002). Coinoculation of *Borrelia spp.* with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species specific. *Journal of Parasitology*, 88(6), 1276-1278.
- Zhou, J., Ueda, M., Umemiya, R., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Xuan, X., & Fujisaki, K.** (2006). A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. *Insect biochemistry and molecular biology*, 36(7), 527-535.
- Zou, Z., Anisowicz, A., Hendrix, M. J., Thor, A., Neveu, M., Sheng, S., & Sager, R.** (1994). Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science*, 263(5146), 526-529.
- Zou, Z., & Jiang, H.** (2005). *Manduca sexta* serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP8 cDNA cloning, protein expression, inhibition kinetics, and function elucidation. *Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 14341-14348.