

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Charakterizace a funkce Faktoru C z klíštěte

Ixodes ricinus

Diplomová práce

Bc. David Hartmann

Školitel: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Lenka Grunclová, Ph.D

České Budějovice 2013

Hartmann D., (2013): Charakterizace a funkce faktoru C z klíštěte *Ixodes ricinus* [Characterization and function of Factor C from the tick *Ixodes ricinus*. Mgr. Thesis, in Czech] – 47 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Factor C is a multi-domain serine protease which recognizes Gram-negative bacteria via binding to lipopolysaccharides and triggers hemolymph clotting cascade in the horseshoe crab. A closely related molecule was also found to be present in the genome of the tick *Ixodes scapularis*. In this work, the full sequence of Factor C ortholog from *Ixodes ricinus* (IrFC) was determined. IrFC is mainly expressed in tick hemocytes and the heavy chain of the activated molecules is present in tick hemolymph as confirmed by Western blotting with antibodies raised against recombinant fragments of IrFC. The function of the IrFC in tick innate immunity was assessed using its silencing by RNA interference.

Práce byla financována z grantu GAČR P506/10/2136 a GAČR 13-11043S (řešitel P. Kopáček)

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracoval 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 svého 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 své kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 13. 12. 2013

.....

Bc. David Hartmann

Poděkování

Na prvním místě chci poděkovat panu Petru Kopáčkovi za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat Lence Grunclové zejména za uvedení do metodiky a její ochotu mi kdykoli pomoci. Velký dík patří i všem ostatním členům laboratoře za pomoc i za příjemnou pracovní atmosféru.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>).....	1
1.2 Imunita bezobratlých.....	1
1.3 Faktor C.....	4
1.4 Imunita klíšťat.....	5
2. Cíle práce	7
3. Materiál a metody	8
3.1 Seznam použitých chemikálií, primerů, kitů a software.....	8
3.2 Sběr klíšťat.....	12
3.3 Pitvání tkání, izolace RNA, příprava cDNA.....	12
3.4 Získání kompletní sekvence IrFC.....	12
3.4.1 5' RACE.....	13
3.4.2 3' RACE.....	14
3.4.3 Zbývající sekvence.....	15
3.5 Exprese rekombinantního fragmentu IrFC pro přípravu protilátek.....	15
3.5.1 Amplifikace.....	15
3.5.2 Ligace, transformace.....	15
3.5.3 Exprese.....	16
3.5.4 Izolace fragmentu IrFC z bakteriální kultury a purifikace.....	16
3.5.5 Refolding.....	17
3.6 Příprava králíčích polyklonálních protilátek.....	17
3.7 Tkáňový expresní profil IrFC.....	17
3.7.1 Kvantitativní real-time PCR.....	18
3.7.2 SDS PAGE a Western blotting.....	18
3.8 RNAi umlčení IrFC.....	19
3.8.1 Syntéza dsRNA.....	19
3.8.2 Injikace dsRNA do dospělých samic.....	22
3.8.3 Ověření snížení exprese IrFC.....	22
4. Výsledky	23
4.1 Získání kompletní sekvence IrFC.....	23
4.2 Tkáňový expresní IrFC na úrovni mRNA.....	27
4.3 Exprese rekombinantního fragmentu rFC1 pro přípravu protilátek.....	28
4.3.1 Tkáňový expresní profil IrFC pomocí protilátek proti rFC1.....	30
4.4 Snížení exprese IrFC pomocí RNAi.....	31
4.4.1 Syntéza dsRNA.....	31
4.4.2 Ověření snížení exprese IrFC po RNA interferenci.....	33
4.4.3 Exprese rekombinantního fragmentu rFC2 pro přípravu protilátek.....	35
5. Diskuze	39
6. Závěr	44
7. Použitá literatura	45

1. Úvod

1.1 Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

Klíšťata jsou významní krevsající ektoparazité obratlovců. Svým hostitelům mohou způsobovat vážné krevní ztráty, ale zásadní problém představují zejména jako vektorů širokého spektra patogenů. Klíšťata přenášejí viry, bakterie i prvoky (Jongejan a Uilenberg, 2004).

V České republice se vyskytuje zejména klíště obecné *Ixodes ricinus*. Systematicky ho řadíme do kmene *Arthropoda* (členovci), třídy *Arachnida* (pavoukovci), řádu *Acar*i (roztoči), podřádu *Ixodida* (Klíšťatovci) a čeledi *Ixodidae* (klíšťatovití) (Nava a kol., 2009). Celkem je již známo více než 900 druhů klíšťat (Barker a Murell, 2004).

Klíště obecné má tříhostitelský cyklus, kdy každé ze 3 vývojových stádií saje na jiném hostiteli. Vývoj každého vývojového stádia trvá přibližně jeden rok. Larvy a nymfy sají na drobných hlodavcích, ptácích a ještěrkách. Hostiteli nymf mohou být i větší obratlovci. V dospělosti již sají pouze samice, obvykle na větší lesní zvěři. Člověka mohou napadat všechna tato vývojová stádia (Volf a kol., 2007).

1.2 Imunita bezobratlých

Bezobratlí nedisponují specifickou (získanou) imunitou, ale vyvinula se u nich nespecifická (přirozená) imunita, která rozeznává antigeny běžně se vyskytující na povrchu invadujících buněk (tzv. PAMPs – pathogen-associated molecular patterns), jako lipopolysacharid gram-negativních bakterií, peptidoglykan z gram-positivních bakterií nebo β -1-3-D-glukan přítomný např. v buněčných stěnách kvasinek (Begum a kol., 2000).

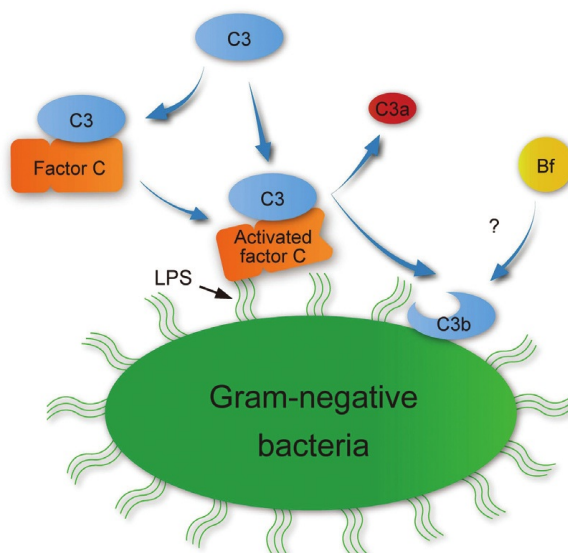
Proti invadujícím patogenům se u bezobratlých uplatňuje zejména produkce antimikrobiálních peptidů zprostředkovaná toll-like receptory (Lemaitre a kol., 1996; Imler a Hoffmann, 2000), koagulace hemolymfy (Iwanaga a kol., 1978), komplementový systém aktivovaný lektinem (Fujita, 2002) a fagocytóza. Tyto obranné mechanismy se uplatňují i u savců (Aderem a Ulevitch, 2000).

Jedním z hlavních modelových organismů pro studium imunitního systému bezobratlých jsou ostrorepi, kteří jsou zároveň fylogeneticky nejpříbuznějším druhem klíšťat v rámci podkmene *Chelicerata* (klepítkatci) (Kopáček a kol., 2010).

U ostrorepů se nachází v plazmě obranné molekuly, např. hemocyanin a lektiny (Iwanaga a kol., 1998). Velmi důležitá jsou také granula, která jsou přítomna v 99 % hemocytů tzv. amoebocyty (Toh a kol. 1991). Rozlišujeme granula velká (large granules) a těžká (dense granules). Velká granula obsahují proenzymy serinových proteáz, jako je faktor C, faktor G a faktor B, proclotting enzym, koagulogen, inhibitory serinových proteáz a lektiny. V těžkých granulech nacházíme antimikrobiální peptidy (Iwanaga a kol., 1998).

Komplement

V ostrorepech byly nalezeny komponenty naznačující přítomnost komplementového systému, který iniciuje fagocytózu invadujících mikroorganismů. Jedná se o α_2 -macroglobulin (Iwaki a kol., 1996) a homolog C3 z komplementového systému savců. U ostrorepa *Tachypleus tridentatus* je označován jako TtC3 a s C3 savců sdílí stejnou doménovou strukturu (Ariki a kol., 2008). Jak ilustruje obrázek 1, Faktor C vyhledá LPS na povrchu gram-negativní bakterie a vytvoří komplex s TtC3. Takto aktivovaný faktor C přemění TtC3 na TtC3b, který zůstane uložen na povrchu bakterie.

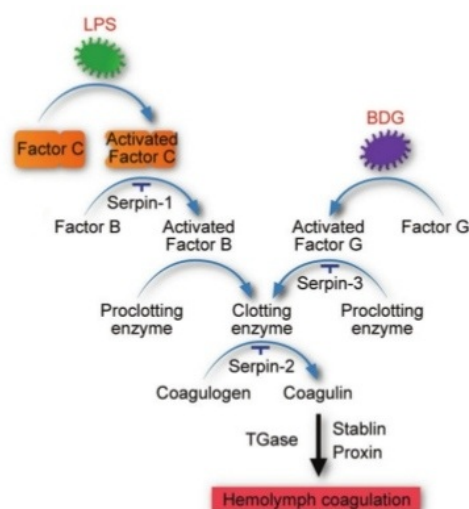


Obr. 1: Aktivace komplementového systému ostrorepa
Převzato z Kawabata, 2010.

Koagulace hemolymfy

Koagulační kaskáda ostrorepů je aktivována faktorem C, mutidoménovou serinovou proteázou přítomnou na povrchu hemocytů. Tato proteáza je aktivována vazbou na lipopolysacharidy (LPS) (Ariki a kol., 2004), které se vyskytují ve vnější membráně gram-negativních bakterií. Aktivovaný faktor C způsobí exocytózu granul z hemocytů skrze signální dráhu spřaženou s G proteiny, při které se uvolní další obranné molekuly - koagulační faktory, lektiny, antimikrobiální peptidy a substrát pro transglutaminázu stabilin a proxin. Aktivovaný faktor C také aktivuje další koagulační faktor - faktor B. Úkolem aktivovaného faktoru B je změnit proclotting enzym na funkční clotting enzym, který provádí proteolytické štěpení koagulogenu za vzniku koagulinu, který spontánně vytváří nerozpustný polymer. Ten je stabilizován po prokřížení enzymem transglutaminázou (Kawabata, 2009).

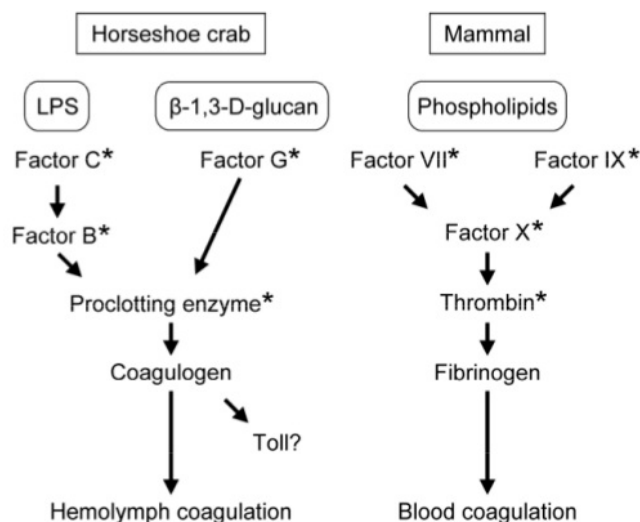
Koagulační kaskáda může být aktivována i alternativní dráhou - faktorem G po stimulaci β -1-3-D-glukanem (Ariki a kol., 2004). Schéma koagulační kaskády ostrorepa ukazuje obrázek 2.



Obr. 2: Koagulační kaskáda ostrorepa

Převzato a upraveno z Kawabata, 2010.

Na obrázku 3 je znázorněna funkční analogie mezi koagulací hemolymfy ostrorepa a srážením krve savců. U ostrorepa je koagulace omezená na povrch invadujícího mikroba, obdobně jako srážení krve je lokalizováno na fosfolipidovém povrchu cévy v místě zranění. I dále v kaskádě serinových proteáz je vidět podobnost, která by mohla značit společný evoluční původ těchto dvou procesů, ale jsou zde i podstatné rozdíly - např. koagulogen nemá žádnou strukturní podobnost ani jiný vztah k savčímu fibrinogenu (Bergner a kol., 1996).



Obr. 3: Porovnání proteolytické kaskády koagulace hemolymfy ostrorepa a krve savců
 Proenzymy serinových proteáz jsou označeny hvězdičkou.
 Převzato a upraveno z Kawabata a kol., 2009.

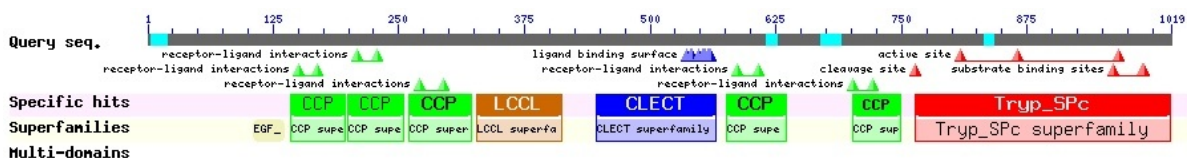
LAL test (*Limulus Amebocyte Lysate Assay*)

Extrémně vysoké senzitivity lyzátu z amoebocytů ostrorepa se využívá k velmi citlivé detekci LPS (Levin a Bang, 1968), používané v lékařské diagnostice k průkazu pyrogenních endotoxinů. Koagulační kaskáda v lyzátu z amoebocytů ostrorepa je spuštěna faktorem C po přidání vzorku obsahujícím LPS. Výsledkem je vznik sraženiny plazmového koagulinu. Nevýhodou této metody je možnost falešně pozitivních výsledků, kdy reakce může být vyvolána také přítomností β -1-3-D-glukanu (Roslansky a Novitsky, 1991). To je způsobeno iniciací reakce faktorem G, který je v lyzátu rovněž přítomen. Těmito falešně pozitivními výsledky netrpí novější verze této metody, ve které je použit rekombinantní faktor C (rFC). Faktor G pak není vůbec přítomen a výsledky jsou také zatíženy nižší variabilitou než při klasické LAL (Alwis a Milton, 2006).

1.3 Faktor C

Faktor C byl detailně popsán u ostrorepů. U ostrorepa *Tachypleus tridentatus* se jedná o protein složený z 994 aminokyselin o molekulové hmotnosti 109 648 Da. Nachází se v nich 5 opakujících se sekvencí o délce asi 60 aminokyselin, tzv. Sushi (nebo také CCP - complement control protein) domény, které byly nalezeny také v savčích proteinech zapojených do komplementového systému (Muta a kol., 1991). Dále LCCL doména, C lektinová doména, trypsinová doména a na N-terminálním konci

oblast bohatá na cysteiny, která je zodpovědná za vazbu faktoru C na LPS. Nejvíce se na této vazbě podílí tripeptid Arg–Trp–Arg (Koshiba a kol., 2007). Rovněž byla identifikována místa, kde se po aktivaci faktor C štěpí za vzniku těžkého řetězce, A řetězce a B řetězce (Muta a kol., 1991). Doménovou strukturu ukazuje obrázek 4.



Obr. 4: Doménová struktura faktoru C ostrorepa *Tachypleus tridentatus*

Převzato z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

1.4 Imunita klíšťat

Stejně jako ostatní bezobratlí, klíšťata disponují pouze přirozenou imunitou. Hemocyty v hemolymfě klíšťat se účastní jak buněčné, tak humorální odpovědi. Rozlišujeme tři hlavní typy hemocytů: plazmatocyty, granulocyty I a granulocyty II (Borovičková a Hypša, 2005). Plazmatocyty a granulocyty I jsou schopny fagocytovat cizorodé částice a mikroby (Loosová a kol., 2001). Všechny tři typy hemocytů se mohou podílet na enkapsulaci, při které jsou větší invadující částice zneškodněny obklopením několika vrstvami buněk (Eggenberger a kol., 1990), a nodulaci, kdy vznikají fagocytární agregáty s invadujícím patogenem (Ceraul a kol., 2002).

K evolučně nejstarším molekulám imunitního systému klíštěte patří TEPs (thioester-containing proteins). Zdá se, že klíště *Ixodes scapularis* obsahuje všechny tři známé hlavní skupiny těchto proteinů: α_2 -macroglobuliny - univerzální inhibitory proteáz, součásti komplementu podobné C3, C4, a C5 a hmyzí TEPs (Burešová a kol., 2011).

TEPs se vyskytují v neaktivní formě. Jejich aktivace je provedena proteolytickým štěpením, které má za následek výraznou konformační změnu vedoucí k vystavení domén, které obsahují thioesterické vazby. Ty se pak kovalentně vážou na povrch mikrobů a usnadňují jejich fagocytózu nebo zneškodňují jejich proteázy pomocí α_2 -macroglobulinů (Kopáček a kol., 2012).

Humorální imunita je pravděpodobně úzce spojena s buněčnou imunitou, konkrétně s primitivním komplementovým systémem. Naznačuje to experiment provedený na klíštěti *Ixodes ricinus*, který ukázal, že po umlčení genu pro α_2 -macroglobulin mají klíštěcí hemocyty sníženou schopnost fagocytózy gram-negativních bakterií (Burešová a kol., 2009). Později bylo v genomu klíštěte

zjištěno celkem devět proteinů náležících do rodiny α_2 -macroglobulinů. Umlčení dvou z nich (A₂M1 a A₂M2) pomocí RNA interference způsobovalo statisticky významné snížení fagocytózy gram-negativních bakterií (Burešová a kol., 2011).

V klíštěti byly identifikovány také homologní molekuly primitivního komplementového systému dříve nalezené u ostrorepů. I jejich přítomnost značí, že klíšťaťata pravděpodobně disponují primitivním komplementovým systémem (shrnutí v Kopáček a kol., 2012)

Zatím se nepodařilo jednoznačně prokázat, zda hemolymfa klíšťaťat je schopná koagulace a melanizace, i když podobný jev již byl zaznamenán např. u klíštěte *Dermacentor variabilis* (Eggenberger a kol., 1990). V genomu klíštěte *Ixodes scapularis* se také podařilo identifikovat enzym transglutaminázu, který hraje úlohu právě v koagulační kaskádě obratlovců i bezobratlých. Kromě toho se v genomu klíštěte *Ixodes scapularis* nachází i gen označený jako „Limulus clotting factor C“, jehož částečná sekvence a doménová architektura naznačuje blízkou příbuznost k výše popsanému faktoru C ostrorepa.

2. Cíle práce

- Na základě dostupné částečné sekvence faktoru C z genomu klíštěte *Ixodes scapularis* identifikovat ortholog faktoru C z klíštěte *I. ricinus* (IrFC) a určit jeho úplnou sekvenci.
- Stanovit tkáňový expresní profil IrFC pomocí kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR).
- Exprimovat rekombinantní fragment IrFC v bakteriálním systému a připravit specifické protilátky imunizací králíka.
- Pomocí metody Western blottingu zjistit přítomnost IrFC ve tkáních klíštěte.
- Připravit dsRNA fragmentu IrFC a pokusit se odhadnout jeho funkci pomocí metody RNA interference (RNAi).

3. Materiál a metody

3.1 Seznam použitých chemikálií, primerů, kitů a software

Tab. 1: PCR, agarózová gelová elektroforéza

Polymeráza	Taq Purple pol. (Top-Bio s. r. o.)
dNTPs mix	dNTPs (MBI Fermentas) 2,5 mM každý
PCR H ₂ O	filtrovaná, destilovaná, autoklávaná voda
6x Loading Dye	10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% bromfenolová modř, 0,03% xylencyanol, 60 mM EDTA, 60% glycerol (MBI Fermentas)
EtBr	Ethidium bromide 10 mg/ml v H ₂ O (Sigma-Aldrich)
50x TAE pufr	2 M Tris-acetát, 50 mM EDTA, pH 8,0
50x TBE pufr	0,89 M Tris, 0,89 M kyselina boritá, 20 mM Na ₂ EDTA
Agarózový gel	pro DNA elektroforézu 1% agaróza v 1x TAE pufru pro RNA elektroforézu 1% agaróza v 1x TBE pufru
DNA marker	GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (MBI Fermentas)
RNA marker	High Range RNA Ladder (MBI Fermentas)

Tab. 2: Média a chemikálie pro kultivaci bakterií

LB médium	1% trypton, 0,5% kvasnicový extrakt, 0,5% NaCl; pH 7,0
SOC médium	2% trypton, 0,5% kvasnicový extrakt, 2,5 mM KCl, 0,05% NaCl, 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glukóza, pH 7,0
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranozid (zásobní roztok 0,5 M)
Ampicilin	Ampicilin (zásobní roztok 50 mg/ml)

Tab. 3: Příprava rekombinantního fragmentu IrFC a příprava protilátek

Resuspendační pufr	20 mM Tris-HCl; pH 8,0
Izolační pufr	20 mM Tris-HCl, 2 M močovina, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol, 2% Triton X-100; pH 8,0
Solubilizační pufr	6 M guanidin-hydrochlorid, 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazol, 1 mM merkptoetanol; pH 8,0
Purifikační pufr A	8 M močovina, 50 mM Tris, 0,5 M NaCl; pH 7,8
Purifikační pufr B	8 M močovina, 50 mM Tris, 0,5 M NaCl, 0,5 M imidazol; pH 7,8
Refoldační pufr 1	4 M močovina, 50 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 20% glycerol, 2 mM merkptoetanol
Refoldační pufr 2	2 M močovina, 50 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 20% glycerol, 2 mM merkptoetanol
Refoldační pufr 3	1 M močovina, 50 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 20% glycerol, 2 mM merkptoetanol
Refoldační pufr 4	150 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10% glycerol
50 mM Na-acetátový pufr	0,286% kyselina octová; pH 4,0

Tab. 4: Syntéza dsRNA

Proteináza K	20 µg proteináza K, 150 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM CaCl ₂
DEPC H ₂ O	Dietylpyrokarbonát 2 000x ředěný v destilované H ₂ O, odstátý, autoklávovaný
Phenol chloroform	Phenol : chloroform : Isoamyl Alcohol 25 : 24 : 1 (Sigma)
Apal	FastDigest™ Apal (Biolabs)
Xbal	FastDigest™ Xbal (Biolabs)
10x pufr Tango	10x Buffer Tango (Thermo Scientific)
T4 ligáza	T4DNA Ligase (Promega)
Pufr 2x	2x Rapid Ligation Buffer (Promega)

Tab. 5: SDS-PAGE a Western blotting

10x ELFO pufr	250 mM Tris, 1,92 mM glycin, 1% SDS,
Blotovací pufr	20% metanol, 25 mM Tris, 150 mM glycin, 0,4% SDS
10x PBS	8% NaCl, 0,2% KH ₂ PO ₄ , 2,9% Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O, 0,2% KCl (w/v)
PBS-T	0,05% Tween® 20 (Sigma-Aldrich) v 1x PBS
Coomassie	0,05% Coomassie® Brilliant Blue R 250 (Serva) 50% methanol, 10% kyselina octová
Odbarvovací roztok	25% methanol, 10% kyselina octová
LMW	Amersham™ LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis (GE Healthcare)
Vzorkový redukující pufr	0,75 M Tris-HCl (pH 6,8), 5% SDS, 50% glycerol, 0,5% dithiotreitol, 0,25% bromfenolová modř
Substrátový roztok	0,035% w/v 3,3'-diaminobenzidin (Sigma) v 100 mM Tris-HCl, pH 8,0
Protilátka Anti-Rabbit	Anti-Rabbit IgG (whole molecule)-Peroxidase (Sigma-Aldrich)
Protilátka Anti-His	Monoclonal Anti-polyHistidine antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich)
Protilátka Anti-Mouse	Anti-Mouse IgG (whole molecule)-Peroxidase (Sigma-Aldrich)

Tab. 6: Primery

Použití	Název	Sekvence (5' → 3')
Příprava rFC1	AbCFac2012S	caccTCAGAGAGGGAGGTTAC
	AbCFac2012AS	tcaGAGAGAGAAGCAGGAG
Příprava rFC2	AbCFac2013S	caccACGTCCGGCTACAATATGG
	AbCFac2013AS	tcaGGCACTGGAATTATGCAC
RNAi	CfacRNAiSApal	ttggcccTCACGGTGGACGATTCTCA
	CfacRNAiASXbal	tttctagaAAGCTCCGGTTGTTCTCA
Sekvenace	M13 forward	TGTAAAACGACGGCCAGT
	M13 reverse	CAGGAAACAGCTATGACC
	T7 forward	TAATACGACTCACTATAGGG

	T7 reverse	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
	CFac1S	G TTCCTGCGCATCTACCAA
	CFac1AS	CCGGCGGCCTGAAGATG
	CFac2S	GTGGTGGGGACGCATCAG
	CFac2ASc	CTCCTGCTTCTCTCTCTCAACG
	CFac3S	CATATGGCGTGGACTTGAGGAGC
	CFac3AS	GACCCGGAGGCAGCACCACACT
	CFac4S	GCGGGCTGGTGCGGCTGCA
	CFac4AS	CGTGCTGGTCGTCCTTGTCGTTCT
	CFac5S	GCGGCCCACTGCGTCACCTA
	CFac5AS	TGAATCCATCGCCTCTCCGTCGTAA
	CFac3raceGSP	GCGAGGCCGTGCTACCCG
	CFac3raceNested	CAGCGGCGACTCCGGCGG
	CFac5raceGSP1	TCGTGCCGTTGTGGTGGAT
	CFac5raceGSP2	AGGAGCCGTCGTTCTGG
	CFac5raceNested	GGCAGTTGTAGTGGATGATCT

Tab. 7: Komerční kity

Použití	Název	Výrobce
Izolace DNA z gelu	Agarose Gel DNA Extraction Kit	Roche
Izolace plazmidové DNA	High Pure Plasmid Isolation Kit	Roche
Sekvence	TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen
5' RACE	5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0	Invitrogen
3' RACE	3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends	Invitrogen
Expresce rekombinantního proteinu	Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits	Invitrogen
Příprava dsRNA	MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit	Ambion
Izolace RNA	Total RNA isolation NucleoSpin® RNAII	Macherey-Nagel
Příprava cDNA	Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche
Purifikace DNA po restrikci	GenElute™ PCR Clean-Up Kit	Sigma

Tab. 8: Software a databáze

ApE - a Plasmid Editor v2.0.44	Skládání sekvencí, navrhování primerů
Carestream Molecular Imaging Software Standard Edition v. 5.0.7.22	Focení gelů a úprava fotografií
GIMP 2.6.12	Dodatečná úprava fotografií (ořez, kontrast, popis)
SignalP 4.1 Server - Center for biological sequence analysis, Technical University of Denmark DTU	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
NCBI - National Center for Biotechnology Information, U. S. National Library of Medicine	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
VectorBase	www.vectorbase.org

3.2 Sběr klíšťat

Dospělé samice klíštěte *Ixodes ricinus* byly sbírány vlajkováním v lese mezi Českými Budějovicemi a obcí Branišov a v lese mezi městem Zliv a Mydlovarským rybníkem.

3.3 Pitvání tkání, izolace RNA, příprava cDNA

Nejprve byla mikropipetou odebrána hemolymfa unikající z prvního páru končetin po jejich zkrácení a přiměřeným stlačením klíštěte entomologickou pinzetou.

Pro izolaci ostatních tkání (střevo, slinné žlázy, vaječníky, trachea) bylo klíště připevněno na Petriho misce naplněné parafínem Paraplast® (Sigma) a pod binolupou pitváno. Tkáně byly promyty v PBS v DEPC H₂O. Tkáně určené pro izolaci RNA byly vloženy do 300 µl RA1 pufru z kitu Total RNA isolation NucleoSpin® RNAII (Macherey-Nagel). Tkáně určené pro SDS PAGE a Western blotting byly vloženy do čisté mikrozkušavky na ledu a ihned použity nebo zmrazeny při teplotě -80 °C.

RNA byla z tkání izolována kitem Total RNA isolation NucleoSpin® RNAII (Macherey-Nagel).

Syntéza cDNA probíhala z mRNA pomocí kitu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche).

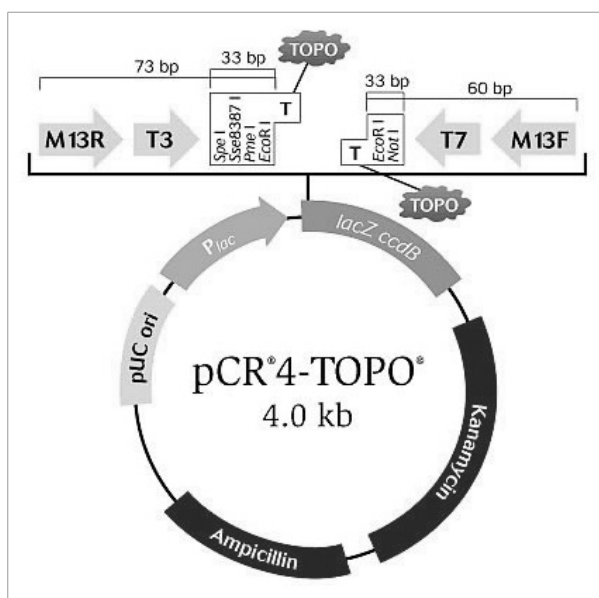
3.4 Získání kompletní sekvence IrFC

Jako základ sloužila sekvence genu ISCW002489 anotovaná jako Limulus clotting factor C klíštěte *Ixodes scapularis* v databázi VectorBase (<https://www.vectorbase.org>). Pro zjištění přesné sekvence orthologu faktoru C u klíštěte *Ixodes ricinus* byla použita cDNA připravená reversní transkripcí z totální RNA izolované ze slinných žláz klíštěte. Metoda 5' RACE byla použita pro zjištění sekvence na 5' konci, 3' RACE pro zjištění sekvence na 3' konci a klasická PCR pro amplifikace fragmentů z vnitřní části kódující sekvence.

Amplifikovaná DNA byla vždy elektroforeticky rozdělena v 1% agarózovém gelu a izolována pomocí Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche). DNA pak byla zaligována podle protokolu TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen) do vektoru pCR™4-TOPO® vector (Invitrogen) (Obr. 5), který byl transformován do One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) metodou „heat shock“. Buňky byly kultivovány na Petriho miskách s LB médiem s ampicilinem (50 µg/ml).

Vybrané kolonie byly kultivovány v tekutém LB médiu s ampicilinem přes noc při 37 °C a další den z nich byla izolována plazmidová DNA pomocí High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche).

Sekvence byla provedena na sekvenátoru Applied Biosystems ABI PRISM 3130xl v Laboratoři genomiky na Ústavu molekulární biologie rostlin biologického centra AVČR. Výsledky byly zpracovány pomocí programu ApE.



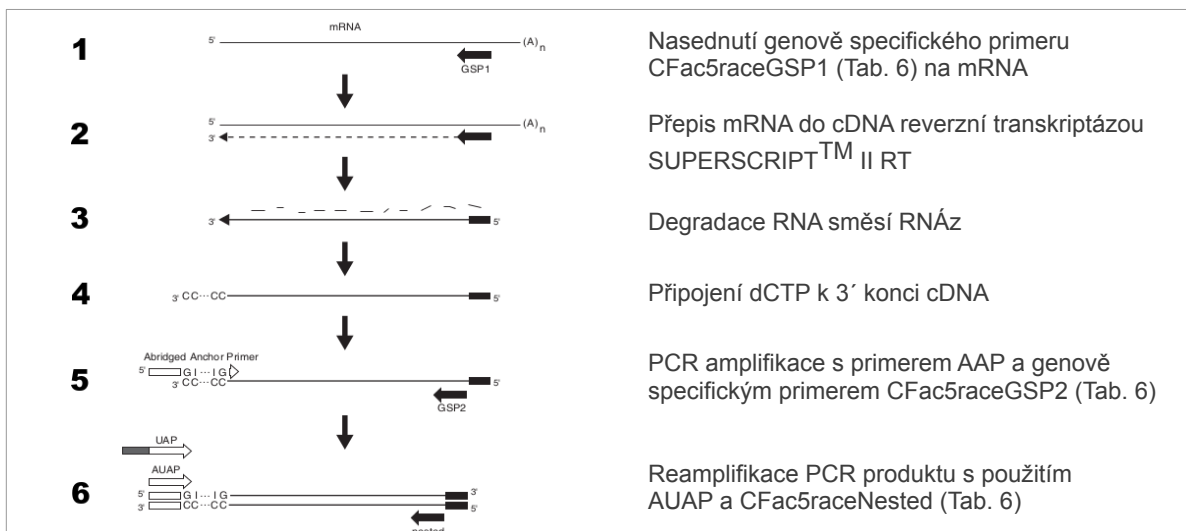
Obr. 5: pCR[®]4-TOPO[®] vector

Tento vektor umožňuje jedнокrokovou pozitivní selekci, kdy transformované buňky získají rezistenci k antibiotikům a zároveň obsahuje letální gen *ccdB*, jehož produkt transformovanou buňku zabije, pokud nebyl přerušen zaklonovaným inzertem.

Převzato a upraveno z <http://www.protocol-online.org>.

3.4.1 5' RACE

Pro zjištění sekvence na 5' konci bylo postupováno podle protokolu 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen). Byla použita RNA izolovaná z deseti polovin slinných žláz 6 dní sajících klíšťat. Postup amplifikace ukazuje obrázek 6. Genově specifické primery byly navrženy podle sekvence faktoru C z klíštěte *Ixodes scapularis* a jsou uvedeny v tabulce 6.



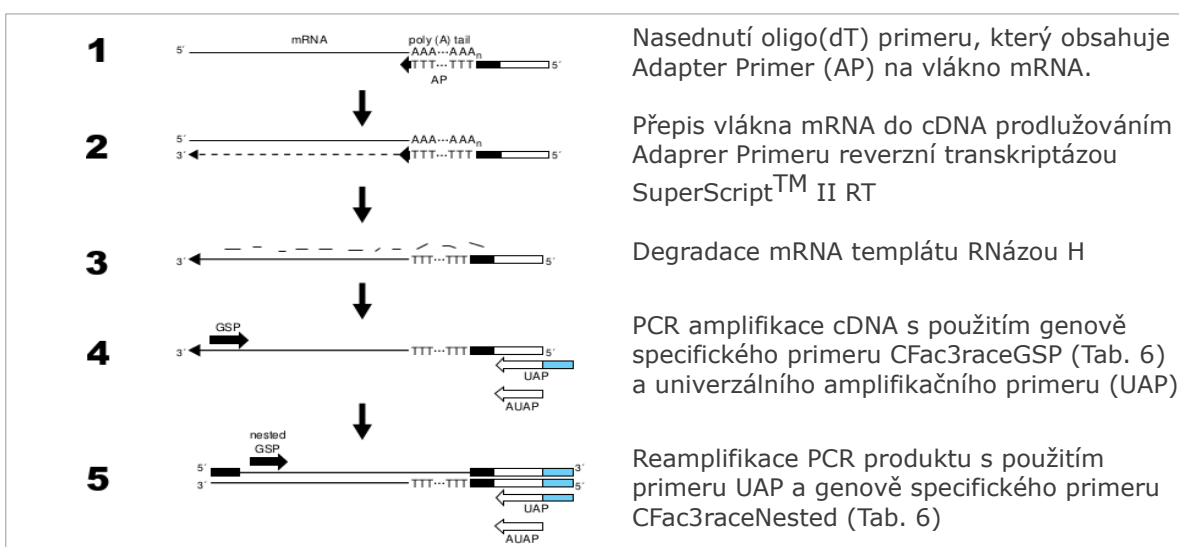
Obr. 6: Postup při metodě 5' RACE

Převzato a upraveno z protokolu 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0 (Invitrogen).

3.4.2 3' RACE

Pro zjištění sekvence na 3' konci bylo postupováno podle protokolu 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen). Jako templát byla použita RNA izolovaná z deseti polovin slinných žláz 6 dní sajících klíšťat. Postup při amplifikaci ukazuje obrázek 7.

Genově specifické primery byly navrženy podle sekvence faktoru C z klíštěte *Ixodes scapularis* a jsou uvedeny v tabulce 6.



Obr. 7: Postup při metodě 3' RACE

Převzato a upraveno z protokolu 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen).

3.4.3 Zbývající sekvence

Vnitřní část kódující sekvence byla rozdělena na 5 částečně se překrývajících úseků o délce zhruba 550 bází, které byly amplifikovány pomocí PCR s primery navrženými podle sekvence faktoru C z klíštěte *Ixodes scapularis* (Tab. 6). Jednotlivé úseky byly sekvenovány a v programu ApE spojeny do souvislé sekvence.

3.5 Exprese rekombinantního fragmentu IrFC pro přípravu protilátek

Byly exprimovány dva různé fragmenty IrFC pro přípravu dvou různých polyklonálních králičích protilátek proti faktoru C z klíštěte *Ixodes ricinus*.

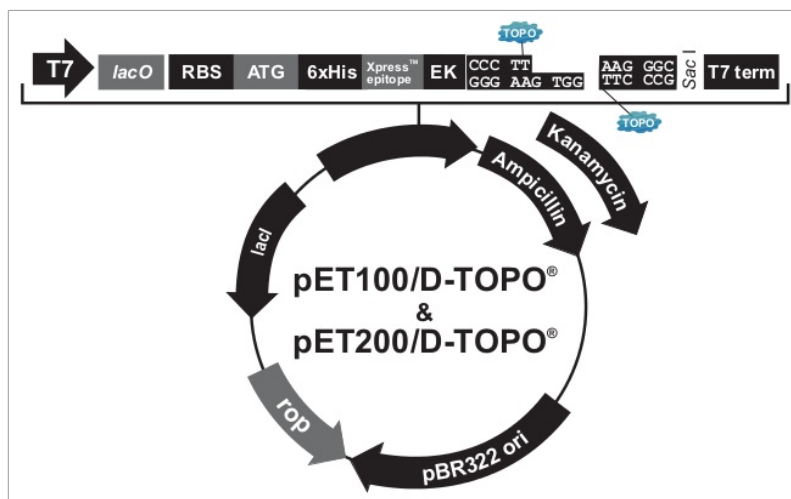
3.5.1 Amplifikace

První rekombinantní fragment IrFC (rFC1) byl amplifikován z cDNA ze slinných žláz pomocí primerů AbCFac2012S a AbCFac2012AS, druhý (rFC2) z cDNA z hemolymfy pomocí primerů AbCFac2013S a AbCFac2013AS. PCR reakce měla 35 cyklů, teplota pro nasedání primerů byla v prvním případě 63 °C, v druhém 58 °C.

Po amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí byla provedena elektroforéza v 1% agarózovém gelu a DNA požadované velikosti byla z gelu izolována pomocí Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche).

3.5.2 Ligace, transformace

PCR produkt izolovaný z gelu byl podle protokolu Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits (Invitrogen) ligován do expresního vektoru pET100/D-TOPO® (Invitrogen) (Obr. 8). Tento expresní vektor obsahuje za start kodonem His-tag (sekvenci 6 histidinů), který umožňuje vzniklý fúzní protein purifikovat pomocí chelatační chromatografie na základě afinity Co²⁺ iontů k His-tagu. Vzniklý konstrukt byl transformován do buněk One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) metodou „heat shock“. Ty byly kultivovány na Petriho miskách s LB médiem s ampicilinem (50 µg/ml) přes noc při teplotě 37 °C. Pozitivní klony byly zjištěny podle velikosti PCR produktu s T7 forward a T7 reverse primery a templátem z náhodně vybraných bakteriálních kolonií. Pozitivní kolonie byly kultivovány v tekutém LB médiu s ampicilinem a jejich plazmidová DNA byla izolována pomocí High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Část plazmidu s inzertem byla sekvenována s použitím primerů T7 forward a T7 reverse.



Obr. 8: Expresní vektor pET100/D-TOPO®

Převzato z protokolu Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits (Invitrogen).

3.5.3 Expres

Vektor pET100/D-TOPO® se zaligovaným správným inzertem (ověřeným sekvenací) byl transformován do buněk BL21 Star™(DE3) One Shot® *E. coli* (Invitrogen) metodou „heat shock“. Buňky byly kultivovány v 10 ml LB média s ampicilinem přes noc při teplotě 37 °C.

Další den byla kultura přenesena do 400 ml LB média s ampicilinem a kultivována při 37 °C. Po dvou hodinách byla indukována exprese inzertu přidáním IPTG (finální koncentrace 0,5 mM). Po 6 hodinách byly bakterie z LB média odděleny centrifugací (5 min., 3 470 g) a zmrazeny.

3.5.4 Izolace fragmentu IrFC z bakteriální kultury a purifikace

Bakteriální pelet byl resuspendován v resuspendačním pufru (Tab. 3), sonikován a centrifugován (10 min., 10 040 g, 4 °C). Supernatant obsahuje rozpustné proteiny. Pelet byl 2x resuspendován v izolačním pufru obsahující detergent Triton X-100 (Tab. 3), sonikován a centrifugován. V supernatantu jsou membránové proteiny. Pelet tvořený málo rozpustnými inkluzními tělísky byl resuspendován v solubilizačním pufru obsahující silné chaotropní činidlo – 6 M guanidin-hydrochlorid (Tab. 3) přes noc na magnetickém míchadle ve 4 °C. Další den byla provedena centrifugace (15 min., 16 570 g) a supernatant obsahující rozpuštěné proteiny inkluzních tělísek byl přefiltrován přes filtr 0,22 µm.

Jednotlivé frakce byly po dialýze proti vodě analyzovány elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) a Western blottingem s primární protilátkou Anti-His (viz kap. 3.7.2).

Frakce s největším množstvím rekombinantního proteinu byla purifikována chelatační chromatografií využívající afinity Co^{2+} iontů na koloně Hi-Trap™ IMAC FF (GE Healthcare) k His-tagu na rekombinantním proteinu. Purifikace probíhala v purifikačním pufru (Tab. 3) a rekombinantní protein byl eluován zvyšující se koncentrací purifikačního pufru B s imidazolem (Tab. 3) na přístroji ÄKTA FPLC (GE Healthcare). Množství rekombinantního proteinu bylo vyhodnocováno spektrofotometricky a frakce s jeho nejvyšším obsahem byly analyzovány elektroforézou v polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE) a Western blottingem s primární protilátkou Anti-His.

3.5.5 Refolding

Pro získání správné terciární struktury a odstranění močoviny byl protein dialyzován v dialyzačním střívku Visking® dialysis tubing 16 mm (Serva) postupně proti refoldačním pufrům 1; 2; 3 a 4 (Tab. 3). V každém z těchto pufrů po dobu 12 hodin.

3.6 Příprava králičích polyklonálních protilátek

Vzniklý precipitát fragmentu rekombinantního proteinu IrFC byl rozsuspendován v 500 μl TBS, bylo přidáno 500 μl nekompletního Freundova adjuvans. Takto byl použit ke 4 imunizacím králíka v intervalech po 14 dnech.

Čtrnáct dní po poslední imunizaci byla odebrána krev, která se nechala stát 2 hodiny v pokojové teplotě a ve 4 °C přes noc. Další den bylo odděleno sérum centrifugací (15 min., 870 g, 4 °C).

Imunoglobulinová frakce byla z imunního séra izolována srážením kyselinou kaprylovou. Sérum bylo smícháno s 50 mM Na-acetátovým pufrém v poměru 1 : 2. Za míchání na magnetickém míchadle bylo přidáváno celkem 25 μl kyseliny kaprylové na každý mililitr tohoto roztoku po menších dávkách v intervalech cca 5 minut. Sérum bylo sráženo po dobu 90 minut v pokojové teplotě. Následovala centrifugace (10 min., 3 470 g), přečištění supernatantu přes filtrační papír a dialýza proti 2 litrům 5 mM Na_2HPO_4 přes noc ve 4 °C.

3.7 Tkáňový expresní profil IrFC

Pro stanovení tkáňového expresního profilu IrFC na úrovni mRNA byla využita metoda kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR), na úrovni proteinů SDS-PAGE a Western blotting.

3.7.1 Kvantitativní real-time PCR

cDNA z jednotlivých tkání (střevo, slinné žlázy, vaječníky, hemolymfa, tracheje, malphigické trubice a zbytek) byla amplifikována na přístroji LightCycler® 480 System (Roche) pomocí genově specifických primerů Cfac5S a Cfac5AS a reakčního mixtu LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche). Byly použity biologické (templát je cDNA z různých klíšťat) a technické triplikáty (nezávislé reakce se stejným templátem). Relativní exprese IrFC byla stanovena pomocí referenčních „housekeeping“ genů - aktin, feritin 1 a elongační faktor 2 (Šíma a kol., nepublikováno).

3.7.2 SDS PAGE a Western blotting

Tkáně izolované z osmi dospělých 6 dní sajících samic byly promyty v PBS a homogenizovány ve vzorkovém redukujícím pufru (slinné žlázy a vaječníky ve 200 μ l, střevo v 800 μ l a hemolymfa byla ředěna 20x). Následovala denaturace (cca 7 minut, 100 °C). Po denuraci byly všechny vzorky kromě hemolymfy centrifugovány (5 min., 16 570 g) a supernatant byl odebrán do čisté mikrokumavky.

S těmito vzorky byla provedena vertikální polyakrylamidová gelová elektroforéza v gradientovém gelu 5-17,5 % nebo NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel (Novex® by life technologies™). Na gel bylo obvykle nanášeno po 20 μ l vzorků; střeva 10 μ l. Elektroforéza probíhala při konstantním napětí 200 V. Jako marker byl použit proteinový standard Amersham™ LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare).

Po elektroforéze následoval Western blotting. Byla použita PVDF membrána (Millipore), která byla aktivována metanolem. Po aktivaci byla stejně jako gel, blotovací papíry a ručníky promyta v blotovacím pufru. Byl sestaven blotovací sendvič: ručník - 2 blotovací papíry - gel - membrána - 2 blotovací papíry - ručník. Proteiny byly přenášeny z gelu na membránu při konstantním proudu 150 mA po dobu asi 100 minut.

Část membrány pak byla barvena v coomassie a následně odbarvována odbarvovacím roztokem (Tab. 5), druhá část byla blokována v 2% sušeném mléce v PBS-T po dobu cca 1 hodiny, následovala inkubace v roztoku primární protilátky a PBS-T (obvykle 1 : 100) ve 4 °C přes noc. Membrána byla další den promyta 3x 5 minut v PBS-T, následovala inkubace v roztoku sekundární protilátky a PBS-T.

V případě použití primární protilátky vytvořené králíkem byla jako sekundární protilátka použita Anti-Rabbit (ředěná 1 : 2 000), v případě použití primární protilátky Anti-His byla jako sekundární použita Anti-Mouse (ředěná 1 : 500).

Po cca 90 minutách byla membrána promyta 3x 5 minut v PBS-T. Obarvení bylo provedeno pomocí substrátového roztoku po přidání 100 µl 30% peroxidu vodíku. Reakce byla zastavena propláchnutím membrány v destilované vodě.

3.8 RNAi umlčení IrFC

Pro umlčení IrFC byl použit úsek vyznačený na obrázku 11 a 13, který byl zaklonován do plazmidu pLL10. Tento plazmid obsahuje dva T7 promotory v opačné orientaci, což umožňuje transkribovat inzert v obou směrech a připravit tak sense a antisense ssRNA (Levashina a kol., 2001).

3.8.1 Syntéza dsRNA

Amplifikace DNA pro syntézu dsRNA

Část genu IrFC o délce 286 bp byla amplifikovaná pomocí PCR z cDNA ze slinných žláz s primery CfacRNAiS_{Apal} a CfacRNAiS_{Xbal} (Tab. 6). Primery byly navrženy podle sekvence IrFC, byly k nim přidány převisy obsahující cílová místa pro restrikční enzymy Apal a Xbal a bylo ověřeno, že se tato cílová místa nenachází uvnitř amplifikované sekvence. Byla provedena gelová elektroforéza v 1% agarózovém gelu, PCR produkt byl vyříznut a izolován pomocí Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche).

Restrikce vektoru a PCR produktu

Pro vytvoření kohezivních konců byla provedena restrikce PCR produktu a plazmidu pLL10 restrikčními enzymy Apal a Xbal po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Tabulka 9 ukazuje složení restrikční reakce pro plazmid pLL10, tabulka 10 pro PCR produkt.

Tab. 9: Složení restrikční reakce pro plazmid pLL10

	[µl]
10x pufr Tango	3
Apal	1
Xbal	1
plazmid pLL10	3
voda	23

Tab. 10: Složení restrikční reakce pro PCR produkt

	[µl]
10x pufr Tango	3
Apal	1
Xbal	1
PCR produkt	20
voda	6

Purifikace, ligace a transformace

Po přečištění pomocí GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma) byly linearizovaný plazmid pLL10 i štěpený PCR produkt ligovány po dobu 16 hodin při teplotě 16 °C (Tab. 11).

Tab. 11: Složení ligační směsi

	[μ l]
Pufr 2x	5
Linearizovaný plazmid pLL10	2
PCR produkt	2
T4 ligáza	1

Vzniklý konstrukt byl transformován do buněk One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) metodou „heat shock“. Ty pak byly kultivovány na Petriho miskách s LB médiem s ampicilinem (50 μ g/ml) přes noc při 37 °C. Pro zjištění pozitivních klonů byla DNA štěpena restričními enzymy Apal a Xbal a analyzována elektroforeticky. U pozitivních transformantů se z plazmidu vyštěpil inzert.

Plazmidové DNA s inzertem byla sekvenovány s použitím primerů M13 forward a M13 reverse.

Restrikce plazmidu pLL10 s inzertem

Plazmid se správným inzertem (ověřeno sekvenací) byl linearizován štěpením ve dvou oddělených restričních reakcích enzymy Apal a Xbal po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Složení restričních reakcí ukazuje tabulka 12.

Tab. 12: Složení restriční reakce

	[μ l]
10 μ g plazmidu pLL10	30
10x pufr Tango	5
Enzym Apal nebo Xbal	1
Voda	14

Purifikace linearizovaného plazmidu

K plazmidu bylo přidáno 25 μ l proteinázy K a 3,75 μ l 10% SDS. Následovala inkubace při 50 °C po dobu 30 minut. Bylo přidáno 80 μ l phenol chloroformu. Směs byla promíchána na vortexu a 5 minut centrifugována na stolní centrifuze při maximálních otáčkách. Byla odebrána vodní fáze (asi 80 μ l) a k ní přidáno 80 μ l chloroformu. Směs byla promíchána na vortexu a 5 minut centrifugována na stolní centrifuze při maximálních otáčkách. Opět byla odebrána vodní fáze (asi 80 μ l) a k ní bylo přidáno 56 μ l isopropanolu. Směs byla promíchána na vortexu, následovala inkubace 15 minut v -20 °C a centrifugace (30 min., 31 270 g, 4 °C). Pelet byl promyt 80%-ním etanolem

o teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následovala centrifugace (15 min., 31 270 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po odebrání etanolu byl pelet vysušen a rozpuštěn v DEPC vodě. Spektrofotometricky bylo ověřeno, že koncentrace DNA je vyšší než $120\text{ }\mu\text{g/ml}$.

Syntéza ssRNA

Pro syntézu ssRNA byl použit MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit (Ambion). Při pokojové teplotě byly připraveny celkem dvě reakce pro syntézu dvou komplementárních vláken RNA. Složení reakcí ukazuje tabulka 13. Syntéza probíhala při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ přes noc.

Tab. 13: Složení reakcí pro syntézu ssRNA pomocí MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit (Ambion)

ATP Solution	2 μl
CTP Solution	2 μl
GTP Solution	2 μl
UTP Solution	2 μl
10x Reaction Buffer	2 μl
Enzyme Mix	2 μl
Linearizovaný plazmid pLL10 s inzertem	1 μg
Nuclease-free Water	doplnit do 20 μl

Purifikace ssRNA

Pro purifikaci RNA byl použit MEGAscript® T7 High Yield Transcription Kit (Ambion). Do směsi po syntéze RNA byl přidán 1 μl DNÁzy a směs byla inkubována 15 minut při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Potom bylo přidáno 115 μl vody a 15 μl octanu amonného (vše součástí kitu). Po promíchání bylo přidáno 150 μl phenol chloroformu, pak byla směs promíchána na vortexu a centrifugována na stolní centrifuze 5 minut při maximálních otáčkách.

Byla odebrána vodní fáze (asi 150 μl) a k ní přidáno 150 μl chloroformu. Směs byla promíchána na vortexu a 5 minut centrifugována na stolní centrifuze při maximálních otáčkách. Opět byla odebrána vodní fáze (asi 150 μl) a k ní bylo přidáno 110 μl isopropanolu. Směs byla promíchána a ponechána 30 minut v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následovala centrifugace (30 min., 22 060 g). Supernatant byl odebrán, pelet vysušen a bylo přidáno 10 μl DEPC vody. Spektrofotometricky bylo zkontrolováno, že koncentrace RNA je vyšší než $3\text{ }000\text{ }\mu\text{g/ml}$.

Hybridizace

Komplementární vlákna RNA byla naředěna na koncentraci 3 000 µg/ml a smíchána v mikrozkuhavce v poměru 1 : 1. Ta byla umístěna do skleněného odměrného válce o objemu 2 l, který byl obalen hliníkovou fólií a naplněn vařící vodou. Inkubace probíhala přes noc (více než 8 hodin).

Příprava dsRNA byla zkontrolována elektroforeticky. Na gel byl nanesen neštěpený plazmid, plazmid štěpený restrikčním enzymem ApaI, plazmid štěpený restrikčním enzymem XbaI, obě vlákna ssRNA a dsRNA. Do vzorků byl přidán Ambion loading dye.

3.8.2 Injikace dsRNA do dospělých samic

Injikace dsRNA byla prováděna pod binolupou mikromanipulátorem Narishige se skleněnou kapilárou. Do každá dospělé samice bylo injikováno asi 0,5 µl dsRNA IrFC. Jako kontrolní skupina sloužila klíšťata injikovaná stejným množstvím dsRNA GFP rutinně připravovaná pro tyto účely podle stejného protokolu.

Po celý další den byla klíšťata ponechána ve vlhkém prostředí a další den následovalo sání na morčeti po dobu 6 dnů.

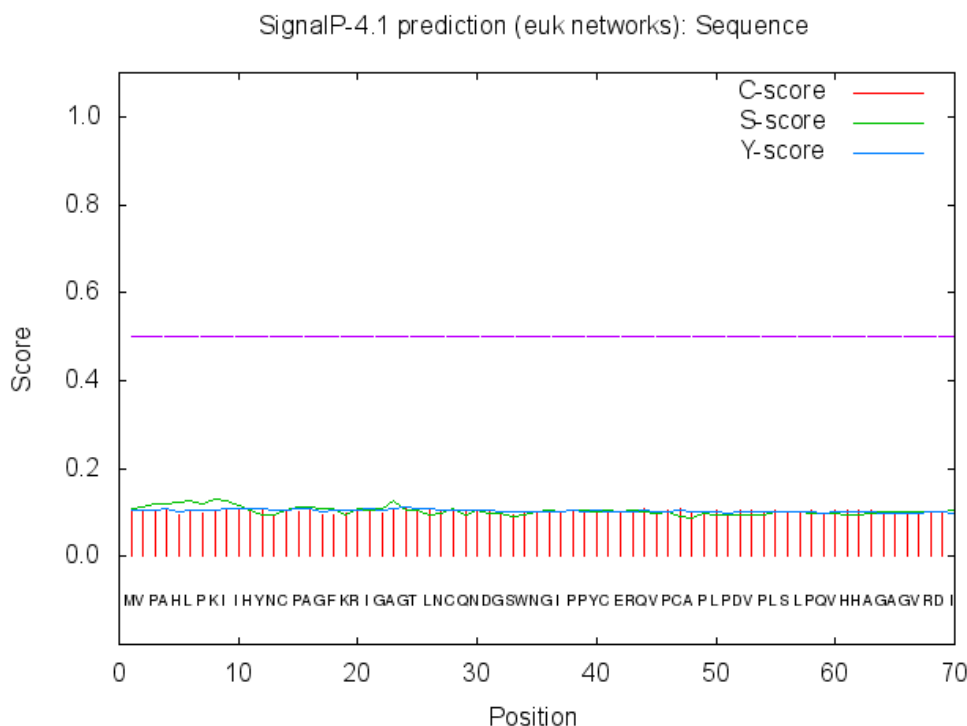
3.8.3 Ověření snížení exprese IrFC

Pro ověření snížení exprese IrFC byla z klíšťat odebrána hemolymfa, izolovány vaječníky, slinné žlázy a střevo. Z těchto tkání byla izolována RNA a provedena qRT-PCR. Byly provedeny technické triplikáty. Relativní exprese IrFC byla stanovena pomocí referenčního „housekeeping“ genu aktinu. Hemolymfa byla použita pro další experimenty (Western blotting, fagocytózy *in vitro*).

4. Výsledky

4.1 Získání kompletní sekvence IrFC

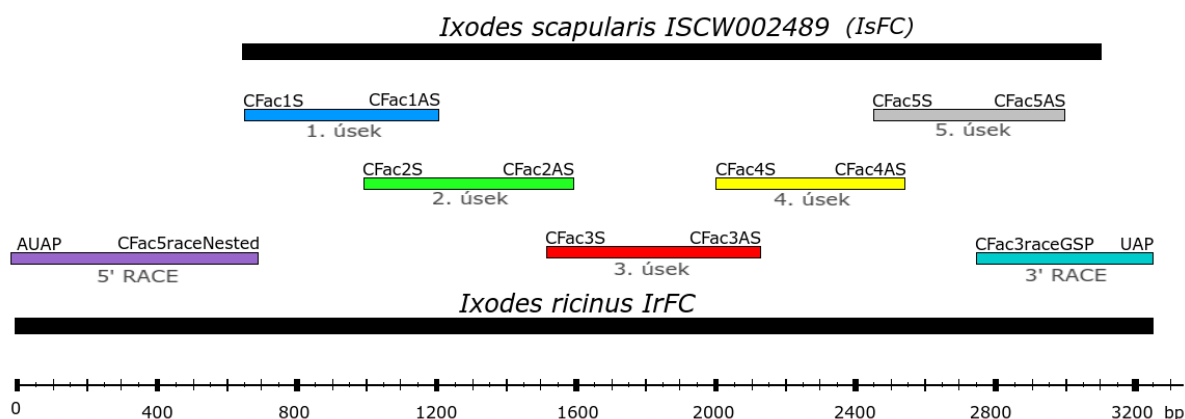
Byla provedena predikce signálního peptidu u genu *ISCW002489* z klíštěte *Ixodes scapularis* (dále jen IsFC). Výsledek ukazuje obrázek 9. Nepřítomnost signálního peptidu na začátku kódující sekvence naznačovala, že se pravděpodobně nejedná o skutečný N-terminální konec, protože jeho ortholog z ostrorepa signální sekvenci má.



Obr. 9: Predikce signálního peptidu genu *ISCW002489* z klíštěte *Ixodes scapularis*
Převzato z <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> (Petersen a kol., 2011).

Proto byla provedena 5' RACE pro zjištění sekvence IrFC na 5' konci. Pro zjištění chybějící sekvence za stop kodonem byla použita 3' RACE. Zbylá sekvence byla rozdělena na 5 částečně se překrývajících úseků, které byly sekvenovány samostatně. Všechny genově specifické primery byly navrženy podle sekvence IsFC z klíštěte *Ixodes scapularis* a jsou uvedeny v tabulce 6.

Schéma postupné sekvenace, jednotlivé úseky a použité primery ukazuje obrázek 10.



Obr. 10: Schéma postupné sekvenace IrFC

Celá sekvenca IrFC má veľkosť 3 250 bp a kóduje 966 aminokyselín o celkovej molekulovej hmotnosti 104 718 Da. Celou nukleotidovou sekvenciou ukazuje obrázok 11.

1	GAC	GAT	TAT	TGT	GAG	CGG	GTC	GTG	TAA	TCG	CCT	TTT	CGG	GGA	ATC	TCC	GTA	51
52	AAG	TGA	CAC	CGG	CAG	ATG	CAA	CGA	CCA	GTT	AAG	GGT	CCT	CTC	TCT	TTC	ACT	102
103	GTC	CCT	CGC	GTG	TAG	CTT	GAG	CTT	TCG	AAC	GTG	CGC	GCA	GGC	TGT	TCG	CGA	153
154	ACG	ACG	GAC	AGC	CCA	AAG	ACA	CTA	CCA	TCT	TTC	AAC	ATG	TGC	ACG	TCG	GCT	204
205	ACA	ATA	TGG	TGC	CTG	CTG	TCG	CTG	ATG	CTG	CTT	GAC	ATT	ACG	AGT	ACC	ATA	255
256	GAC	ATA	AAG	GGA	TTC	TGC	CAC	AAC	GAG	TCG	CAT	GAC	TGC	GAG	TGT	GGC	TCC	306
307	AGC	GGC	GAG	ATG	ATA	AAC	GTG	AGA	GTT	TCT	GGG	TGC	aGC	TAC	GTC	AAA	CGC	357
358	TTT	GGA	TTC	CGG	TGT	CGG	CCC	TGC	GAG	GGC	CAC	AAG	AGA	GAG	AAT	ACC	TGC	408
409	CCA	AAC	TAC	GCG	CTC	TGC	AAG	ACC	TGT	GCT	CAG	GGC	CTG	GAG	GCC	TGC	GAG	459
460	ACC	TGT	CCC	TGG	GGG	AGG	TAC	GGC	CGC	TGG	TGC	ACT	TCG	ACT	TGT	TCC	TGC	510
511	CAG	AAC	GGC	GCC	AAC	TGC	GAC	AAG	GAC	ACG	GGC	GAG	TGC	CGG	TGT	CTG	CCG	561
562	GGT	TTC	TCG	GGC	ACC	TAC	TGC	GAA	CTC	AGA	GAC	GGC	TGC	GAG	CCA	CCA	GCG	612
613	CAC	CCT	GAG	GGC	ATC	TTA	GTA	GTC	ACC	ATG	GTT	CCT	GCG	CAT	CTA	CCA	AAG	663
664	ATC	ATC	CAC	TAC	AAC	TGC	CAG	ATC	ATC	CAC	TAC	AAC	TGC	CCC	GCG	GGC	TTT	714
715	AAG	AGG	ATC	GGC	GCC	GGT	ACC	ATC	AAC	TGC	CAG	AAC	GAC	GGC	TCC	TGG	AAC	765
766	GGC	ATT	CCG	CCT	TAC	TGC	GAG	AGA	CAA	GTC	CCG	TGT	GCA	CCA	CTG	CCG	GAC	816
817	GTC	CCG	CGC	AGT	TTG	CCG	CAG	GTG	CAT	AAT	TCC	AGT	GCC	GGA	GTT	CGG	GAC	867
868	ATC	CAC	CAC	AAC	GGC	ACG	ATC	GTG	AAC	TAC	GCG	TGC	GCG	TCC	GGA	TAC	GAA	918
919	CTC	GTT	GGC	GCA	AAG	TCC	CTG	GAA	TGC	CGC	CAG	GAC	GGC	ACA	TGG	TCC	GCC	969
970	GAT	GTC	CCT	CTC	TGT	CTC	CAT	GTT	TCA	GAG	AGG	GAG	GTT	ACC	TGC	TCC	ACC	1020
1021	AAA	GCC	AAC	CAG	ATC	TTG	GAC	GAG	TAT	ATG	GAC	ACA	CCA	GTC	AGG	GTC	CGC	1071
1072	TGT	CCT	CCG	GGC	TGC	GGA	CTG	GTT	CCG	GGT	CCC	GTG	GTG	GGG	ACG	CAT	CAG	1122
1123	TAC	CAC	ATG	GTG	TCG	GCG	CTG	TGC	CGC	TCC	GCC	GTG	CAC	GCC	GGT	CGC	GTG	1173
1174	AAC	AAC	GCC	GGC	GGT	GCC	GTC	CAT	CTT	CAG	GCC	GCC	GGC	GCC	TAC	GCG	GAC	1224
1225	TTC	CTG	CCG	TCC	ACG	GCA	CAT	GGC	GTC	TCC	TCT	GCC	AAC	TTT	TCC	AAC	CTG	1275
1276	GGT	ACC	AGT	TTC	AAG	TTT	GTC	ACG	GTG	GAC	GAT	TCT	CAG	TGG	CGG	ATA	CCC	1326
1327	GAA	GAA	GGC	TGT	CCC	CAA	ACA	TGG	ATG	GAC	GCT	GGA	AGT	GCT	TGC	CTT	TAC	1377
1378	GCT	GCT	CAG	AGG	AGC	CGA	CCC	TAC	GAC	GCT	AGT	CGC	AAC	CTC	TGC	AGA	AAC	1428
1429	TTT	GGC	GCT	GAG	GTT	CCC	GCC	ACC	CGC	GAC	GAC	GAC	AAT	GCC	ACG	ATG	ACC	1479
1480	CTG	CTC	TCG	GAA	TTC	CTC	GGA	GCC	AAG	GGT	ATC	GGT	GCC	ACC	TGG	CTC	TCA	1530
1531	GAC	CGC	GCA	TTC	CAG	TCA	TAC	AGC	GTG	GAC	TTG	AGG	AAC	AAC	CGG	AGC	TTG	1581

```

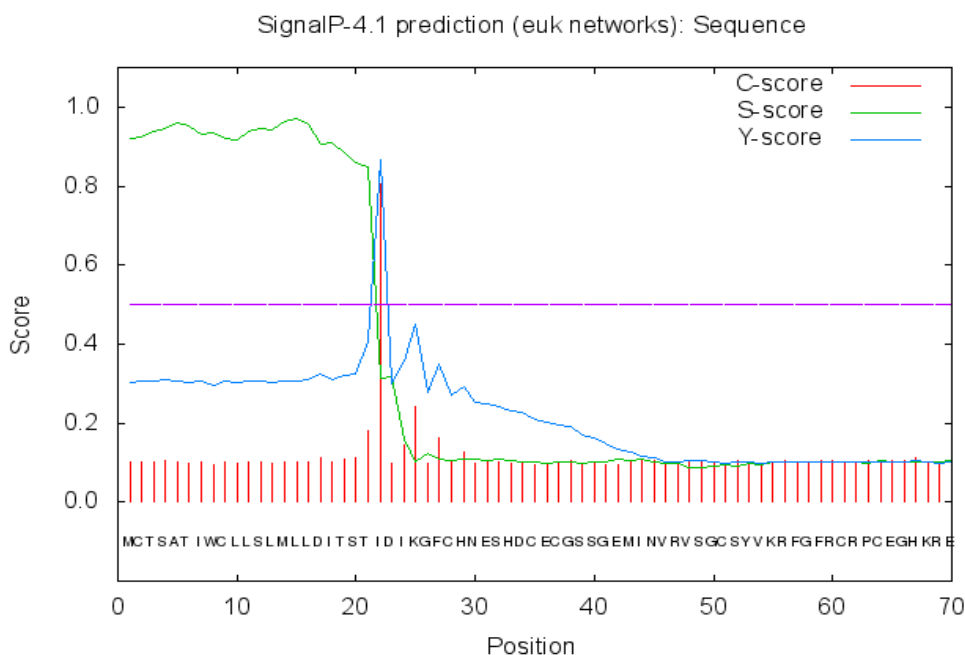
1582 GCG TCG GAT GGC TCC TGC TTC TCT CTC AAC GCC CAG GAT ACC AAA AAT CCC 1632
1633 CAG ATG GTC ATG CAG CCT TGC TCA CAA AGC CTG CCC GTT GTC TGC TCG GCG 1683
1684 CTC AAG ACC TTG AAG CTT GTT CAG TGC GAA GAT CCT GGT TCC ATC AAA GAC 1734
1735 GGT TCG GCC CTT GTC GAG AAG TCA GGG TCT TAC GGC AGT TTC CTG GAG GGC 1785
1786 AGC AGG ATC GTG TAC TCC TGC AAA GAA CTC CGC TAC CTG AGT GGG CAG GCG 1836
1837 ACC ATC ACC TGC ACT TCA AAT GGG ACA TGG AGC GCC GAG AAG CCC CGT TGC 1887
1888 ATC CCC GTG GTC ACG TGC GAG GAA CCG GGC CTT CCG GAC CAT GGC ACC ATT 1938
1939 CGG GTC CTG CCT CCC ATT CGC GGT GGC GAT CCA AGG AGA GGC CCA GTC AGA 1989
1990 GGA AAA AGC CGG GCG GGC AGC GGG CTG GTG CGG CTG CAG CGA CCG CTG AGC 2040
2041 CTG AGC TCG ACA ATG TAC GAC AAT GCG GAC GGC GAG GAG CAA GGC GCT TCG 2091
2092 AGT GTG GTG CTG CCT CCG GGC CAC TAC CGC GTC GGC TCC CGG GCG GAG TAC 2142
2143 GGC TGC CTG CCC CAG TAC GAG ATG ACG GGC TCG TCC GTG CGC CGG TGC CTC 2193
2194 TCC TCG GGC GAG TGG AGC GGC GTA CCC ACC ACA TGC ATT CCG GTG TGC GGC 2244
2245 CGA TCG GAT TCG CCC AGA AGC CCG CTC ATT TGG AAC GGT AAC GCA TCC GAC 2295
2296 CTG GGC CAA TGG CCG TGG CAA GCT GCC ATC AGC GTC CGG AAC GCG GGA AGC 2346
2347 GAC GAC GAC GCC AAG GAG GAC GCC AAG GAG GAC GCC AAG AAG GAC GAG TGG 2397
2398 GTG CTC AAC TGT GGC GGC AGT CTT CTC TCC GAA AGC TGG GTG CTG ACC GCG 2448
2449 GCC CAC TGT GTC ACA TAC GAG TCT TCG CGC ACG GTC ATC CCA AGG GAC ATT 2499
2500 CTG CGG GTG GCC ATG GGA AAG CAC TAC CGG CAG AAC GAC AAG GAC GAC CAG 2550
2551 CAC GTT CAA GTC AGA CAG GTA CGG GAG ATA CAC GTG AAC TTC GAC TAC GAT 2601
2602 CCC AAC TCG TTC GAG AAT GAC ATC GCG CTG CTG CAG CTG GAG GAG CCG GTC 2652
2653 GAA CTG AGC CCC AGA GTT CGT CCC GTG TGC CTG CCG TCG GAC CGC TCG GCC 2703
2704 CGG GTC CAT CTA CAG GAA GGC GCG CTG GGC GTG GTG ACC GGG TGG GGC CTG 2754
2755 ACA GAG ACT GGC GAG TAC GCA GGA GTC CTG AGC GAG GCC GTG CTA CCC GTG 2805
2806 GTT CAG AAC GAG AAA TGC CAG AAG GCG TAC GAG ACG GCG GGC GTC CCG CTC 2856
2857 ACC ATC AGC GAG GCC ATG TTC TGC GCT GGA CAT GCC AAC GGG ACG TCG GAT 2907
2908 GCC TGC AGC GGC GAC TCC GGC GGA CCC ATG GTC TTC GTC GAC GAT ACC GTT 2958
2959 ACG ACG GAG AGG CGA TGG ATT CTG GAA GGC GTA GTC AGC TGG GGC AGT CCC 3009
3010 ACG GGG TGT GCC GTG GCC AAC CAG TAC GGA GGG TTC ACC AGG GTC CAC TCT 3060
3061 TTC CTC AAC TGG ATA CGC CAG TTC GTC TGA GCT CAT CTC TCG CTG TGT CTT 3111
3112 TCC AGC TCC GCA CCT CCG GCG AAG GAA TTT CGA TAA CAT CGG GTT GGT GCC 3162
3163 GTG TTT TGG CTG CGA CTG CCT AGA ATG CAC CAT ATC ATT AAA ATC TTC AAA 3213
3214 CGA CAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA 3246

```

Obr. 11: Nukleotidová sekvence IrFC

Start a stop kodon jsou označeny černě, primery pro amplifikaci 1. úseku modře, 2. úseku zeleně, 3. úseku červeně, 4. úseku žlutě a 5. úsek šedě. Genově specifické primery použité pro 5' RACE jsou označeny purpurově a pro 3' RACE tyrkysově. Tučné písmo značí úsek použitý pro RNAi (viz dále).

Nukleotidová sekvence byla přeložena do sekvence aminokyselin a byl predikován signální peptid (Obr. 12). Výslednou sekvenci ukazuje obrázek 13.



Obr. 12: Predikce signálního peptidu IrFC

Převzato z <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> (Petersen a kol., 2011).

1	MCTSATIWC LL S L M L L D I T S T I D I K G F C H N E S H D C E C G S S G E M I N V R V S G C S Y V K R F G F R C R P C E G H	67
68	KRENTCPNYALCKTCAQGLEACETCPWGRYGRWCTSTCSCQNGANCDKDTGECRCLPGFSGTYCELR	134
135	DGCEPPAHPEGILVVTMVP AHL PKI I H Y N C Q I I H Y N C P A G F K R I G A G T I N C Q N D G S W N G I P P Y C E R Q	201
202	VP CAPLPDVPRSLPQVHNSSAGVRDIHNGTIVNYACASGYELVGAKSLECRQDGTWSADVPLCLHV	268
269	SEREVTCSSTKANQILDEYMDTPVVRVRCPPGCGLVPGVVGTHQYHMVSALCRSAVHAGRVNAGGAV	335
336	HLQAAGAYADFLPSTAHGVSSANFNSNLGTSFKFVTVDSSQWRIPEEGCPQTMWDAGSACLYAAQRSR	402
403	PYDASRNLCRNFGAEVPATRDDD NATMTLLSEFLGAKGIGATWLS DRAFQSYSVDLRNRS LASDGS	469
470	CFSLNAQDTKNPQVMQPCSQSLPVVCSALKTLKLVQCEDPGSIKDGSA LVEKSGSYGSFLEGSRIY	536
537	YSCKELRYLSGQATITCTSNGTWSAEKPRCIPVVTCEEPLPDHGTIRVLPPIRGGDPRRGVVRGKS	603
604	RAGSGLVRLQRPLSLSSSTMYDNADGEEQGAS SVVLP PPGHYRVGSRAEYGC L P Q Y E M T G S S V R R C L S S	670
671	GEWSGVPTTICIPVCGRSDSPRSPITWNGNASDLGQWPWQAAISVRNAGSDDDAKEDAKEDAKKDEWV	737
738	LNCGGSLLESWVLTAAHCVTYESSRTVIPRDLRVAMGKHYRQNDKDDQHVVQVRQVREIHVNFYD	804
805	PNSFENDIALLQLEEPVELSPRVRPVCLPSDRSARVHLQEGALGVVTGWGLTETGEYAGV LSEAVLE	871
872	VVQNEKQKAYETAGVPLTISEAMFCAGHANGTSDACSGDSGGPMVFVDDTVTTRRWILEGVVSWG	938
939	SPTGCAVANQYGGFTRVHSFLNWIRQFV	966

Obr. 13: Aminokyselinová sekvence IrFC s vyznačenými konzervovanými doménami

Šedou barvou je označen signální peptid, žlutě Sushi (CCP) domény, zeleně LCCL doména a červeně Trypsinová doména. Tučné písmo značí úsek použitý pro RNAi, žlutým písmem je označena katalytická triáda serinové proteázy (viz dále).

Obrázek 14 porovnává aminokyselinové sekvence IsFC a IrFC. Největší rozdíl se nachází na 5' konci, kde v sekvenci *Ixodes scapularis* chybí 150 aminokyselin a sekvence začíná až od 4. methioninu. Podle absence signálního peptidu na začátku

sekvence IsFC a jeho přítomnosti na začátku sekvence IrFC se dá usuzovat, že sekvence IsFC je v databázi neúplná a těchto zhruba 150 aminokyselin na 5' konci chybí.

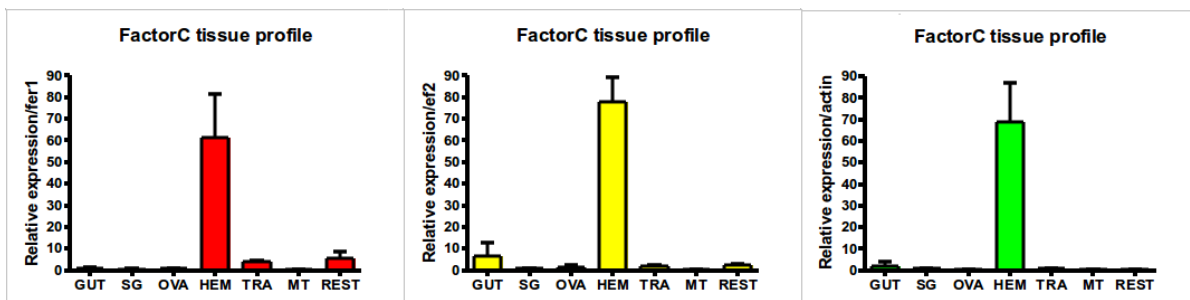
IrFC	1	MCTSATIWCLLSLMLLDITSTIDIKGFCHNESHDCGSSGEMINVRVSGCSYVKRFGRFCRCPCEGHKRE
IsFC	1	-----
IrFC	71	NTCPNYALCKTCAQGLEACETCPWGRYGRWCTSTCSCQNGANCDKDTGECRCLPGFSGTYCELRDGCPEPP
IsFC	1	-----
IrFC	141	AHPEGILVVTM VPAHLPKIIHY NCQIIHY NCPAGFKRIGAGT INCQNDGSWNGIPPYCERQVPCAPLPDV
IsFC	1	----- MVPAHLPKIIHY ----- NCPAGFKRIGAGT INCQNDGSWNGIPPYCERQVPCAPLPDV
IrFC	211	FRSLPQVHNS SAGV RD IHHNGTIVNYACASGYELVGA K SLECRQDGTWSADVPLCLHVSEREVTCSTKAN
IsFC	54	FRSLPQVH HAGV RD IHHNGTIVNYACASGYELVGA K SLECRQDGTWSADVPLCLHVSEREVTCSTKAN
IrFC	281	QILDEY MDTPV RV RCPPGCGLVPGPVV G THQYHMVSALCRSAVHAGRVN N AGGAVHLQAAGAYADFLPST
IsFC	124	QILDEY KDTPV RV RCPPGCGLVPGPVV G THQYHMVSALCRSAVHAGRVN N AGGAVHLQAAGAYADFLPST
IrFC	351	AHGVSSANFSLGTSFKFVTVDDSQWRIP EEG ---CPQ T WMDAGSACLYAAQ RSR SYDASRNLCRN E GAE
IsFC	194	AHGVSSANFSLGTSFKFVTVDDSQWRIP EEG EYCCPQ T WMDAGSACLYAAQ RSR SYDASRNLCRN L GAE
IrFC	418	V P AT R DD N ATM L LSEFLGAK-----GIGATWLS D RAFQSY S VDL R NR S LASDGSC F SLNA
IsFC	264	V P AT R DD N ATM L LSEFLGAKVIRFNDVIVFSEGIGATWLS D REFQSY G VDL R NR N LASND S CT S LNA
IrFC	476	Q DT K NPQ V VMQ P CSQ S LPV V CSAL K TL K LVQ C ED P SGIK D GSAL V EK S GSY G SF L EGSRIVYS C KELRYL
IsFC	334	Q NT K TPQ V VMQ P CSQ S LPV V CSAL K TL K LVQ C ED P SGIK D GSAL V EK S GSY G SF L EGSRIVYS C KELRYL
IrFC	546	SGQATITCTSNGTWSAEKPRCIPVVTCEEPGLPDHGTIRV L PPIRGGD P RRGPV R GKSRAGSGLVRLQRP
IsFC	404	SGQATITCTSNGTWSAEKPRCIPVVTCEEPGLPDHGTIRV L PPIRGGD P RRGPV R G-----GLVRLQRP
IrFC	616	L S LS S TM Y DNAD G EEQ G AS S V L PPG H YRVGSRAEY G CLPQYEMTGSSV R RCLSSG E WSGVPTTCIPVCG
IsFC	468	L S LS S TM Y DNAD S EEQ G AS A V L PPG H YRVGSRAEY G CLPQYEMTGSSV R RCLSSG E WSGVPTTCIPVCG
IrFC	686	RSDSPRSPLI W NGNASDLGQWPQAAISVRN A GSDD D AKE D AKEDAKKDEWVLNCGGSL L SESWVLTAAH
IsFC	538	RSDSPRSPLI W NGNASDLGQWPQAAISVRN V GSDD --- DAKEDAKKDEWVLNCGGSL L SESWVLTAAH
IrFC	756	CVTYESSRTVI P RDILRVAMGKHYRQNDKDDQH V QV R QVRE I HVNFD Y DPNS E ---NDIALLQLEEPVEL
IsFC	604	CVTYESSRTVI P RDILRVAMGKHYRQNDKDDQH V QV R QVRE I SRS P CY T AAQ R TC N DIALLQLEEPVEL
IrFC	824	S P RV R PV C LP S DRSAR V H L Q E CALGV V TGWGLTETGEYAGVLSEAVLPV V QNEK C QAYETAG I PLTISE
IsFC	674	S P RV R H V CL P S V LFRP I NPVS A SQ --- VTGWGLTETGEYAGVLSEAVLPV V QNEK C QAYETAG I PLTISE
IrFC	894	AMFCAGHANGTSDACSGD S GGPMV F VDDT V T T ERRWILEGVVSWGSPTGCAVANQYGGFTRVH S FLNWIR
IsFC	742	AMFCAGHANGTSDACSGD S GGPMV F VDDT V T T ERRWILEGVVSWGSPTGCAVANQYGGFTRVH S FLNWIR
IrFC	964	Q FV
IsFC	812	Q FV

Obr. 14: Porovnání aminokyselinové sekvence IrFC a IsFC

Černé pozadí značí přesnou shodu, šedě jsou označeny aminokyseliny s podobnými vlastnostmi.

4.2 Tkáňový expresní IrFC na úrovni mRNA

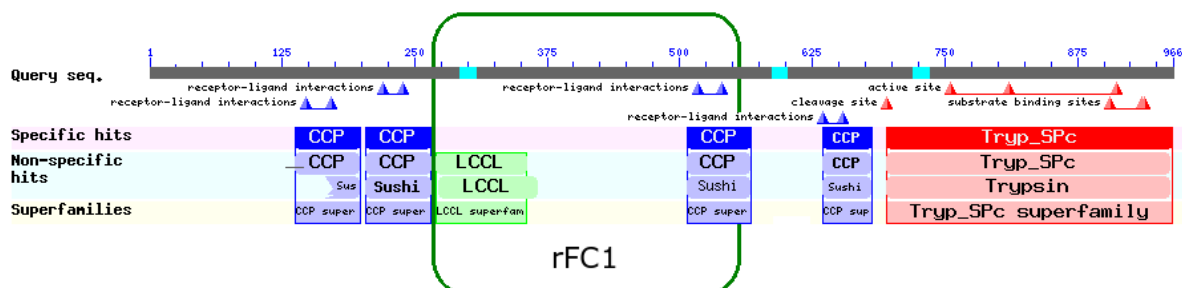
Obrázek 15 graficky znázorňuje relativní expresi IrFC v jednotlivých tkáních klíštěte pomocí 3 referenčních „housekeeping“ genů: feritin 1, elongační faktor 2 a aktin. IrFC se exprimuje téměř výhradně v hemocytech. Chybové úsečky znázorňují standardní chybu průměru ze tří biologických replikátů.



Obr. 15: Grafické znázornění relativní exprese IrFC v jednotlivých tkáních pomocí 3 referenčních „housekeeping“ genů: (zleva) feritin 1, elongační faktor 2 a aktin
 GUT - střevo, SG - slinné žlázy, OVA - vaječníky, HEM - hemocyty, TRA - tracheje, MT - malpighické trubice, REST - zbytek

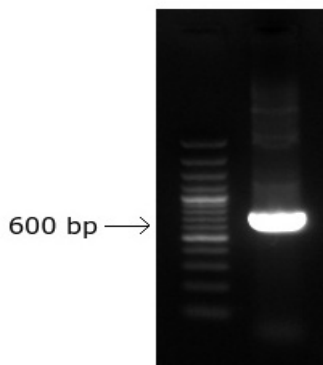
4.3 Expese rekombinantního fragmentu rFC1 pro přípravu protilátek

V bakteriálním systému *E. coli* byl exprimován rekombinantní fragment rFC1 pro přípravu protilátek proti IrFC. Jak ukazuje obrázek 16, rekombinantní fragment rFC1 obsahuje celou LCCL doménu a část Sushi domény. Mezi LCCL a třetí Sushi doménou se pravděpodobně nachází ještě část C-lectinové domény, která nebyla rozeznána predikcí na NCBI (Obr. 35 a 36).



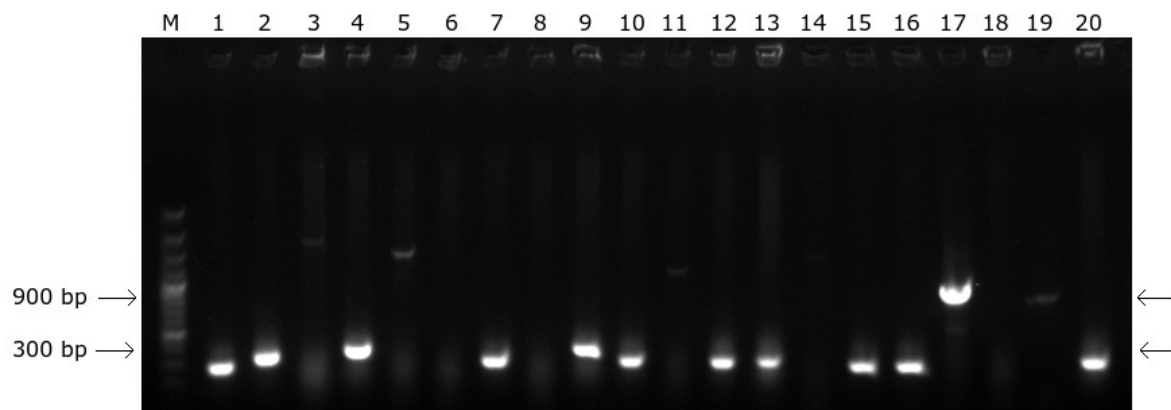
Obr. 16: Pozice rekombinantního fragmentu rFC1 v doménové struktuře IrFC
 Převzato a upraveno z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Příslušný úsek DNA byl amplifikován z cDNA ze slinných žláz, vyříznut z gelu a DNA byla izolována (Obr. 17).



Obr. 17: Amplifikovaný PCR produkt pro přípravu rekombinantního fragmentu rFC1
 Očekávaná velikost produktu je 615 bp.

Izolovaný PCR produkt byl ligován do expresního vektoru a výsledný konstrukt transformován do kompetentních buněk. Pomocí PCR s primery T7 forward a T7 reverse a templátem z vybraných kolonií byl zjištěn jeden pozitivní klon (Obr. 18).



Obr. 18: Ověření transformace konstruktů s fragmentem rFC1 pro přípravu protilátek
Požadovaná velikost PCR produktu (část vektoru + inzert) je asi 900 bp, produkt o velikosti cca 300 bp mají klony bez inzertu. Odpovídající velikost měl klon č. 17.

Sekvenací bylo ověřeno, že pozitivní klon obsahuje správnou sekvenci (Obr. 19). Vektor z tohoto pozitivního klonu byl pak transformován do expresních buněk.

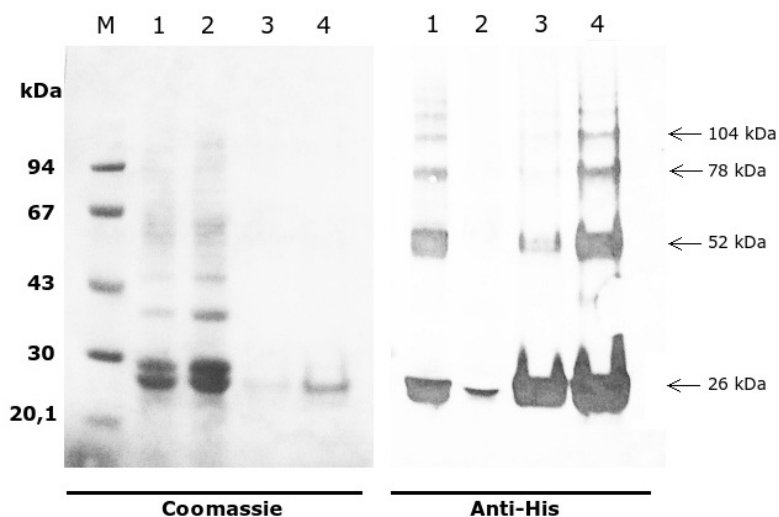
1	ATC	CGG	GGT	TCT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	GGT	ATG	GCT	AGC	ATG	ACT	GGT	51
1	M	R	G	S	H	H	H	H	H	H	G	M	A	S	M	T	G	17
52	GGA	CAG	CAA	ATG	GGT	CGG	GAT	CTG	TAC	GAC	GAT	GAC	GAT	AAG	GAT	CAT	CCC	102
18	G	Q	Q	M	G	R	D	L	Y	D	D	D	D	K	D	H	P	34
103	TTC	ACC	TCA	GAG	AGG	GAG	GTT	ACC	TGC	TCC	ACC	AAA	GCC	AAC	CAG	ATC	TTG	153
35	F	T	S	E	R	E	V	T	C	S	T	K	A	N	Q	I	L	51
154	GAC	GAG	TAT	ATG	GAC	ACA	CCA	GTC	AGG	GTC	CGC	TGT	CCT	CCG	GGC	TGC	GGA	204
52	D	E	Y	M	D	T	P	V	R	V	R	C	P	P	G	C	G	68
205	CTG	GTT	CCG	GGT	CCC	GTG	GTG	GGG	ACG	CAT	CAG	TAC	CAC	ATG	GTG	TCG	GCG	255
69	L	V	P	G	P	V	V	G	T	H	Q	Y	H	M	V	S	A	85
256	CTG	TGC	CGC	TCC	GCC	GTG	CAC	GCC	GGT	CGC	GTG	AAC	AAC	GCC	GGC	GGT	GCC	306
86	L	C	R	S	A	V	H	A	G	R	V	N	N	A	G	G	A	102
307	GTC	CAT	CTT	CAG	GCC	GCC	GGC	GCC	TAC	GCG	GAC	TTC	CTG	CCG	TCC	ACG	GCA	357
103	V	H	L	Q	A	A	G	A	Y	A	D	F	L	P	S	T	A	119
358	CAT	GGC	GTC	TCC	TCT	GCC	AAC	TTT	TCC	AAC	CTG	GGT	ACC	AGT	TTC	AAG	TTT	408
120	H	G	V	S	S	A	N	F	S	N	L	G	T	S	F	K	F	136
409	GTC	ACG	GTG	GAC	GAT	TCT	CAG	TGG	CGG	ATA	CCC	GAA	GAA	GGC	TGT	CCC	CAA	459
137	V	T	V	D	D	S	Q	W	R	I	P	E	E	G	C	P	Q	153
460	ACA	TGG	ATG	GAC	GCT	GGA	AGT	GCT	TGC	CTT	TAC	GCT	GCT	CAG	AGG	AGC	CGA	510
154	T	W	M	D	A	G	S	A	C	L	Y	A	A	Q	R	S	R	170
511	CCC	TAC	GAC	GCT	AGT	CGC	AAC	CTC	TGC	AGA	AAC	TTT	GGC	GCT	GAG	GTT	CCC	561
171	P	Y	D	A	S	R	N	L	C	R	N	F	G	A	E	V	P	187
562	GCC	ACC	CGC	GAC	GAC	GAC	AAT	GCC	ACG	ATG	ACC	CTG	CTC	TCG	GAA	TTC	CTC	612
188	A	T	R	D	D	D	N	A	T	M	T	L	L	S	E	F	L	204
613	GGA	GCC	AAG	GGT	ATC	GGT	GCC	ACC	TGG	CTC	TCA	GAC	CGC	GCA	TTC	CAG	TCA	663
205	G	A	K	G	I	G	A	T	W	L	S	D	R	A	F	Q	S	221

664	TAC	AGC	GTG	GAC	TTG	AGG	AAC	AAC	CGG	AGC	TTG	GCG	TCG	GAT	GGC	TCC	TGC	714
222	Y	S	V	D	L	R	N	N	R	S	L	A	S	D	G	S	C	238
715	TTC	TCT	CTC	TGA														726
239	F	S	L	*														242

Obr. 19: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence konstruktů pro expresi rekombinantního fragmentu rFC1

Šedým pozadím je vyznačena sekvence *rFC2*, černým start kodón a tučným písmem His-tag.

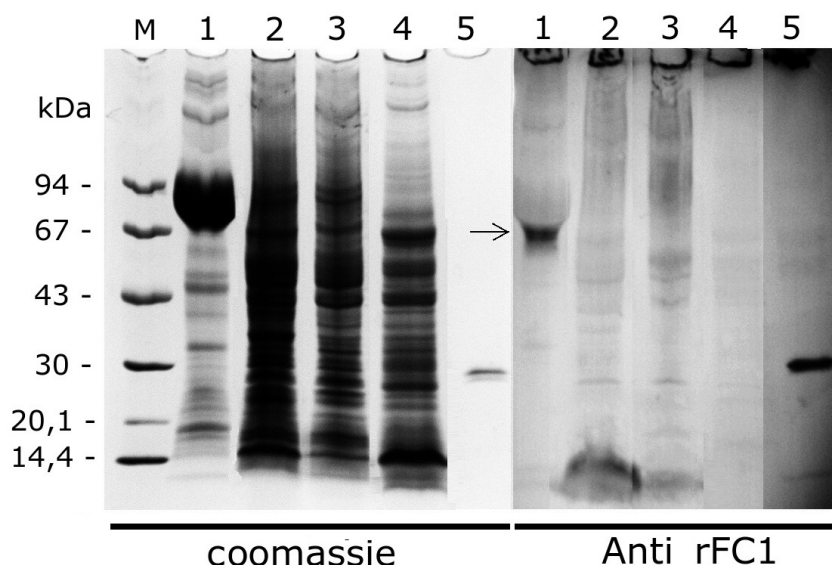
Rekombinantní fragment rFC1 byl izolován z inkluzních tělísek. Přečištěný protein byl analyzován elektroforézou v polyakrylamidovém gelu a Western blottingem s primární protilátkou proti His-tagu (Obr. 20). Vypočítaná velikost fragmentu rFC1 je 26 kDa. Další fragmenty viditelné Western blottingem v přečištěné frakci mají velikost o násobku 26 kDa a zjevně se jedná o oligomery rFC1.



Obr. 20: Detekce rFC1 pomocí SDS-PAGE (vlevo) a Western blottingu (vpravo)
M - LMW, 1 - rozpuštěná inkluzní tělíčka, 2 - nezachycená frakce, 3 - přečištěná frakce 1, 4 - přečištěná frakce 2

4.3.1 Tkáňový expresní profil IrFC pomocí protilátek proti rFC1

Protilátky připravené imunizací králíka rekombinantním fragmentem rFC1 byly použity pro Western blotting pro zjištění přítomnosti IrFC v jednotlivých tkáních klíštěte (hemolymfa, slinné žlázy, vaječníky a střevo). Kromě tkání klíštěte byl analyzován také vzorek rekombinantního proteinu rFC1 jako kontrola funkce protilátek. Výsledek ukazuje obrázek 21.



Obr. 21: SDS-PAGE (vlevo) a Western blotting analýza (vpravo) exprese IrFC v homogenátech tkání klíštěte a ověření vazby na rekombinantní antigen

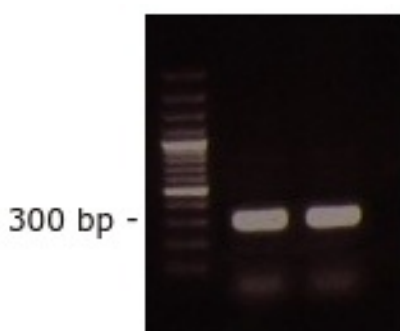
M - LMW, 1 - hemolymfa, 2 - slinné žlázy, 3 - vaječníky, 4 - střevo, 5 - rekombinantní protein rFC1

Funkčnost protilátek byla potvrzena specifickou reakcí s rekombinantním proteinem rFC1. Ve tkáních klíštěte byla nejsilnější reakce v hemolymfě v oblasti hemolipoproteinů o molekulové hmotnosti cca 70 kDa, což velikostně odpovídá těžkému řetězci IrFC. Ověřit identifikaci tohoto proteinu jsem se pokusil pomocí snížení jeho exprese metodou RNAi.

4.4 Snížení exprese IrFC pomocí RNAi

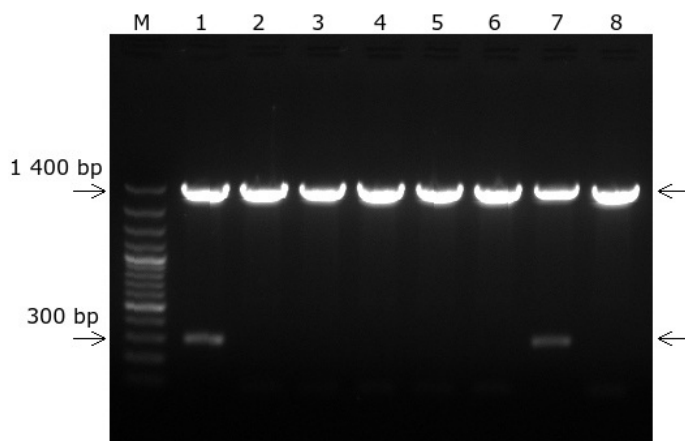
4.4.1 Syntéza dsRNA

Část genu IrFC (na obrázku 11 a 13 označeno tučně) byla amplifikována pomocí PCR. Po elektroforéze v 1% agarózovém gelu byla amplifikovaná DNA z gelu izolována (Obr. 22).



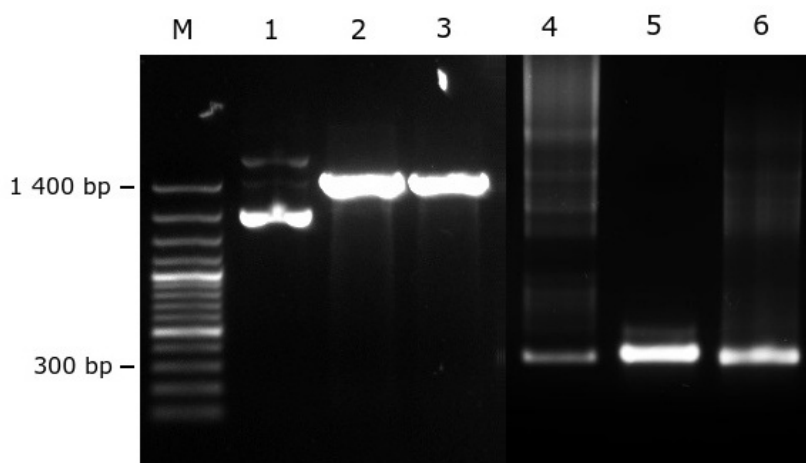
Obr. 22: Amplifikace části genu IrFC pro syntézu dsRNA
Očekávaná velikost produktu je cca 300 bp.

PCR produkt a vektor byly štěpeny restrikcími enzymy Apal a Xbal, přečištěny a ligovány. Vzniklý konstrukt byl transformován do kompetentních buněk. Úspěšnost transformace byla zjišťována u 8 kolonií, jejichž plazmidová DNA byla znovu štěpena enzymy Apal a Xbal a analyzována elektroforeticky. Výsledek ukazuje obrázek 23.



Obr. 23: Elektroforetická analýza plazmidu pLL10 štěpeného enzymy Apal a Xbal
 Fragменты o velikosti cca 1 400 bp odpovídají samotnému linearizovanému plazmidu, фрагменты DNA o velikosti cca 300 bp u vzorků č. 1 a 7 odpovídají inzertu IrFC vyštěpenému z plazmidu.

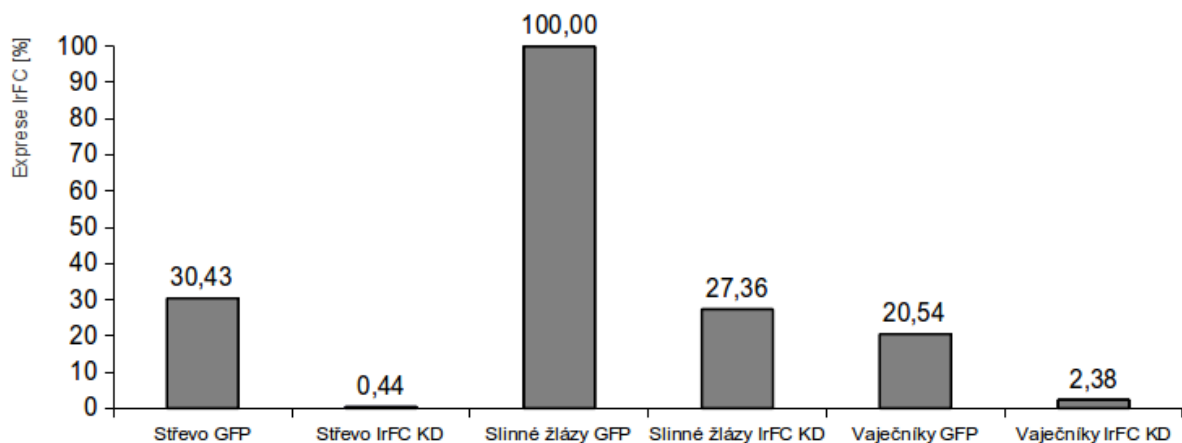
Plazmidová DNA pozitivních kolonií (č. 1 a 7) byla sekvenována. Po ověření správnosti sekvence byl pro syntézu ssRNA použit konstrukt z kolonie č. 7. Výsledek syntézy dsRNA ukazuje obrázek 24.



Obr. 24: Syntéza IrFC dsRNA
 M - GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, 1 - neštěpený plazmid pLL10, 2 - plazmid štěpený Apal, 3 - plazmid štěpený Xbal, 4 - sense ssRNA, 5 - antisense ssRNA, 6 - dsRNA

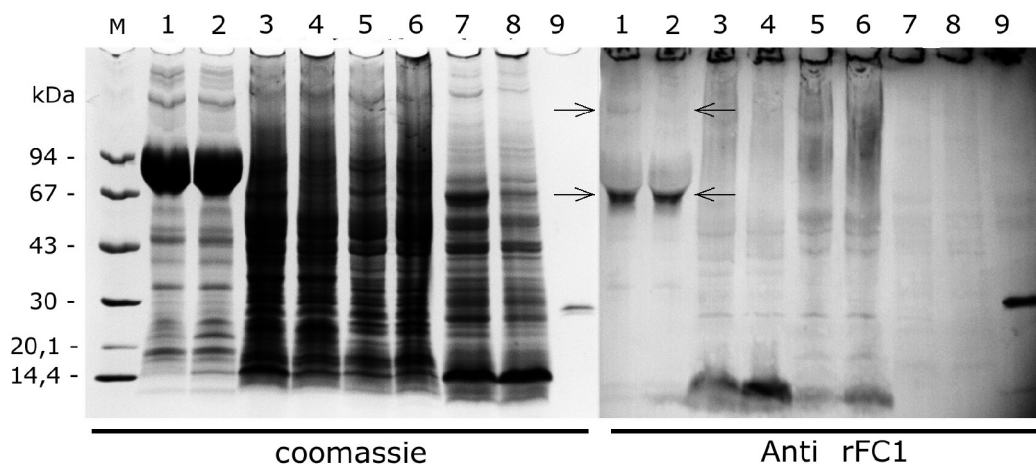
4.4.2 Ověření snížení exprese IrFC po RNA interferenci

Snížení exprese IrFC po RNA interferenci bylo zkoumáno na úrovni mRNA pomocí qRT-PCR a na úrovni proteinů pomocí metody Western blottingu. Pro ověření účinku RNAi byly sledovány hladiny exprese IrFC mRNA ve střevech, slinných žlázách a vaječnících. Hemolymfa (hemocyty) z těchto experimentů byla použita na Western blotting analýzy a související fagocytární eseje (viz diskuze). Výsledky qRT-PCR (Obr. 25) ukázaly, že potlačení exprese IrFC (IrFC KD) bylo úspěšné.

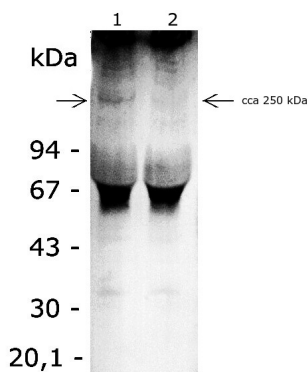


Obr. 25: Graf znázorňující snížení exprese IrFC v jednotlivých tkáních po RNA interferenci
GFP - pozitivní kontrola, IrFC KD - klíšťata se sníženou expresí IrFC

Výsledek Western blottingu je zobrazen na obrázku 26. Fragment v hemolymfě o velikosti cca 70 kDa po RNA interferenci nemizí. Byl ale zjištěn minoritní proužek o velikosti cca 250 kDa, který po RNA interferenci z hemolymfy mizí. Tento proužek, který odpovídá zhruba dvojnásobku teoretické velikosti neaktivovaného IrFC, je lépe viditelný na obrázku 27.



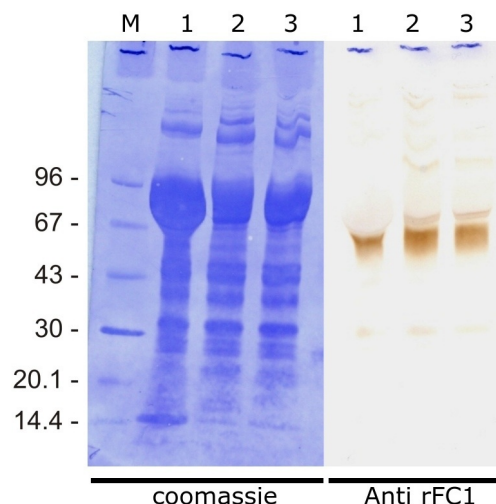
Obr. 26: SDS-PAGE (vlevo) a Western blotting analýza (vpravo) v homogenátech tkání kontrolních klíšťat (GFP) a klíšťat s potlačenou expresí IrFC (IrFC KD)
M - LMW, 1 - hemolymfa GFP, 2 - hemolymfa_IrFC_KD, 3 - slinné žlázy GFP, 4 - slinné žlázy IrFC KD, 5 - vaječníky GFP, 6 - vaječníky IrFC KD, 7 - střevo GFP, 8 - střevo IrFC KD, 9 - rFC1 (kontrola)



Obr. 27: Proteiny hemolymfy po SDS-PAGE a Western blottingu
1 - hemolymfa GFP, 2 - hemolymfa IrFC KD

V hemolymfě se v oblasti okolo cca 70-90 kDa na redukujících SDS-PAGE majoritně nachází HeLp (heme-binding lipoprotein) a další zásobní proteiny jako vitelogeniny (Maya-Monteiro a kol., 2000), které svou přítomností brání řádnému elektroforetickému rozdělení proteinů a komplikují jejich následnou detekci. Proto byl pokus opakován za současného RNAi HeLp pomocí dsRNA připravené v laboratoři Dr. Ondřeje Hajduška.

Byla tedy provedena SDS-PAGE a Western blotting hemolymfy, kde byla jako jedna kontrola použita hemolymfa z klíšťat injikovaných dsRNA GFP, jako druhá kontrola byla použita hemolymfa z klíšťat po injikaci dsRNA HeLp (HeLp KD) a hlavním zkoumaným vzorkem byla hemolymfa z klíšťat, která byla současně injikována dsRNA HeLp a dsRNA IrFC. Výsledek ukazuje obrázek 28.

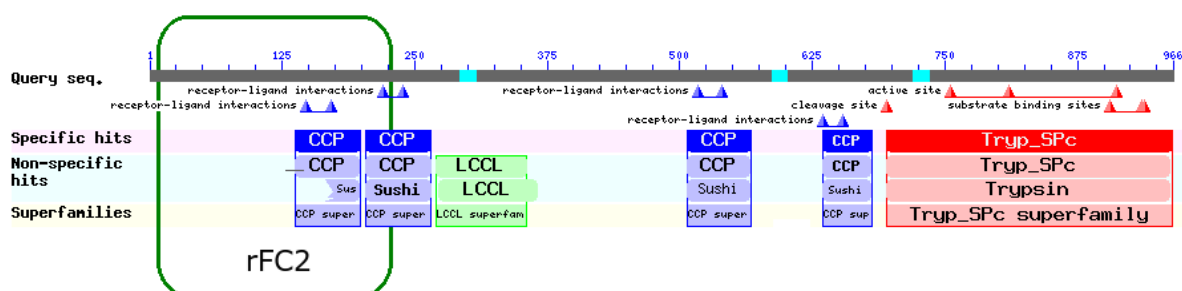


Obr. 28: SDS-PAGE (vlevo) a Western blotting analýza (vpravo) hemolymfy
M - LMW, 1 - GFP, 2 - HeLp KD, 3 - HeLp KD + IrFC KD

Ačkoli se zlepšila elektroforetická separace v oblasti kolem 70 kDa, nebyl na proteinové úrovni pozorován žádný rozdíl 70 kDa fragmentu mezi HeLp KD a HeLp + IrFC KD. Tento výsledek naznačoval, že výrazná reaktivita v oblasti 70 kDa by mohla být artefakt, který s vlastním IrFC nesouvisí. Abych tuto možnost mohl potvrdit či vyvrátit, připravil jsem nový rekombinantní fragment rFC2 z N-terminální oblasti IrFC pro přípravu nových protilátek (Obr. 29). rFC2 se s rFC1 v žádném místě nepřekrývá.

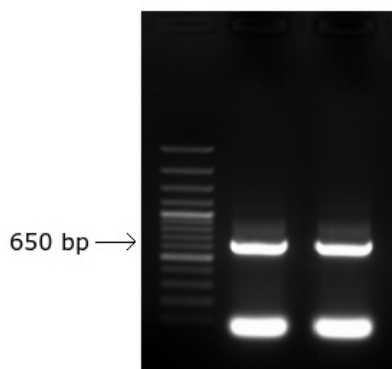
4.4.3 Expese rekombinantního fragmentu rFC2 pro přípravu protilátek

Rekombinantní fragment rFC2 obsahuje první celou a část druhé Sushi domény. Jeho pozici v doménové struktuře IrFC ukazuje obrázek 29.



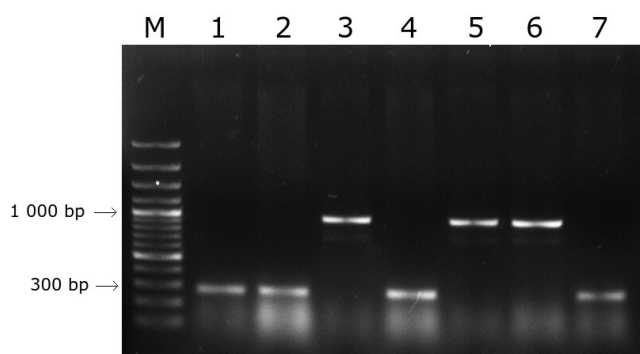
Obr. 29: Pozice rekombinantního fragmentu rFC2 v doménové struktuře IrFC
Převzato a upraveno z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Příslušný úsek DNA byl amplifikován z cDNA ze slinných žláz, vyříznut z gelu a DNA byla izolována (Obr. 30).



Obr. 30: Amplifikovaný PCR produkt pro přípravu rekombinantního fragmentu rFC2
Očekávaná velikost produktu je 669 bp.

Izolovaný PCR produkt byl ligován do expresního vektoru a výsledný konstrukt transformován do kompetentních buněk. Pomocí PCR s primery T7 forward a T7 reverse a templátem z vybraných kolonií byly zjištěny tři pozitivní klony (Obrázek 31).



Obr. 31: Ověření transformace konstruktů s fragmentem rFC2 pro přípravu protilátek
Požadovaná velikost PCR produktu (část vektoru + inzert) je asi 1 000 bp. Odpovídající velikost mají klony č. 3; 5; 6.

Pozitivní klony byly ověřeny sekvenací. Podle výsledků sekvenace byl vybrán klon se správnou sekvencí a ten byl použit pro přípravu rekombinantního proteinu. Výsledky sekvenace vybraného konstruktů ukazuje obrázek 32. Vektor s touto sekvencí byl transformován do expresních buněk.

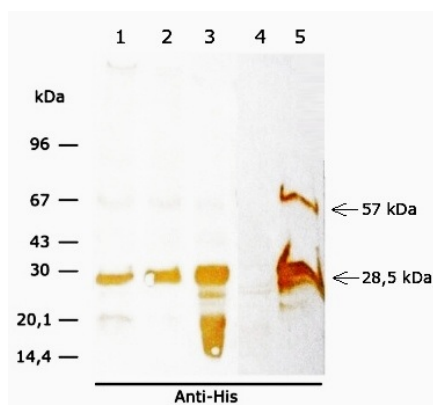
1	ATG	CGG	GGT	TCT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	GGT	ATG	GCT	AGC	ATG	ACT	GGT	51
1	M	R	G	S	H	H	H	H	H	H	G	M	A	S	M	T	G	17
52	GGA	CAG	CAA	ATG	GGT	CGG	GAT	CTG	TAC	GAC	GAT	GAC	GAT	AAG	GAT	CAT	CCC	102
18	G	Q	Q	M	G	R	D	L	Y	D	D	D	D	K	D	H	P	34
103	TTC	ACC	GTG	AGA	GTT	TCT	GGG	TGC	AGC	TAC	GTC	AAA	CGC	TTT	GGA	TTC	CGG	153
35	F	T	V	R	V	S	G	C	S	Y	V	K	R	F	G	F	R	51
154	TGT	CGG	CCC	TGC	GAG	GGC	CAC	AAG	AGA	GAG	AAT	ACC	TGC	CCA	AAC	TAC	GCG	204
52	C	R	P	C	E	G	H	K	R	E	N	T	C	P	N	Y	A	68

205	CTC	TGC	AAG	ACC	TGT	GCT	CAG	GGC	CTG	GAG	GCC	TGC	GAG	ACC	TGT	CCC	TGG	255
69	L	C	K	T	C	A	Q	G	L	E	A	C	E	T	C	P	W	85
256	GGG	AGG	TAC	GGC	CGC	TGG	TGC	ACT	TCG	ACT	TGT	TCC	TGC	CAG	AAC	GGC	GCC	306
86	G	R	Y	G	R	W	C	T	S	T	C	S	C	Q	N	G	A	102
307	AAC	TGC	GAC	AAG	GAC	ACG	GGC	GAG	TGC	CGG	TGT	CTG	CCG	GGT	TTC	TCG	GGC	357
103	N	C	D	K	D	T	G	E	C	R	C	L	P	G	F	S	G	119
358	ACC	TAC	TGC	GAA	CTC	AGA	GAC	GGC	TGC	GAG	CCA	CCA	GCG	CAC	CCT	GAG	GGC	408
120	T	Y	C	E	L	R	D	G	C	E	P	P	A	H	P	E	G	136
409	ATC	TTA	GTA	GTC	ACC	ATG	GTT	CCT	GCG	CAT	CTA	CCA	AAG	ATC	ATC	CAC	TAC	459
137	I	L	V	V	T	M	V	P	A	H	L	P	K	I	I	H	Y	153
460	AAC	TGC	CAG	ATC	ATC	CAC	TAC	AAC	TGC	CCC	GCG	GGC	TTT	AAG	AGG	ATC	GGC	510
154	N	C	Q	I	I	H	Y	N	C	P	A	G	F	K	R	I	G	170
511	GCC	GGT	ACC	ATC	AAC	TGC	CAG	AAC	GAC	GGC	TCC	TGG	AAC	GGC	ATT	CCG	CCT	561
171	A	G	T	I	N	C	Q	N	D	G	S	W	N	G	I	P	P	187
562	TAC	TGC	GAG	AGA	CAA	GTC	CCG	TGT	GCA	CCA	CTG	CCG	GAC	GTC	CCG	CGC	AGT	612
188	Y	C	E	R	Q	V	P	C	A	P	L	P	D	V	P	R	S	204
613	TTG	CCG	CAG	GTG	CAT	AAT	TCC	AGT	GCC	GGA	GTT	CGG	GAC	ATC	CAC	CAC	AAC	663
205	L	P	Q	V	H	N	S	S	A	G	V	R	D	I	H	H	N	221
664	GGC	ACG	ATC	GTG	AAC	TAC	GCG	TGC	GCG	TCC	GGA	TAC	GAA	CTC	GTT	GGC	GCA	714
222	G	T	I	V	N	Y	A	C	A	S	G	Y	E	L	V	G	A	238
715	AAG	TCC	CTG	GAA	TGC	CGC	CAG	GAC	GGC	ACA	TGG	TCC	GCC	GAT	GTC	CCT	CTC	765
239	K	S	L	E	C	R	Q	D	G	T	W	S	A	D	V	P	L	255
766	TGT	CTC	CAT	GTT	TGA													780
256	C	L	H	V	*													260

Obr. 32: Nukleotidová a aminokyselinová sekvence konstruktů pro expresi rekombinantního fragmentu rFC2

Šedým pozadím je vyznačena sekvence rFC2, černým start kodón a tučným písmem His-tag.

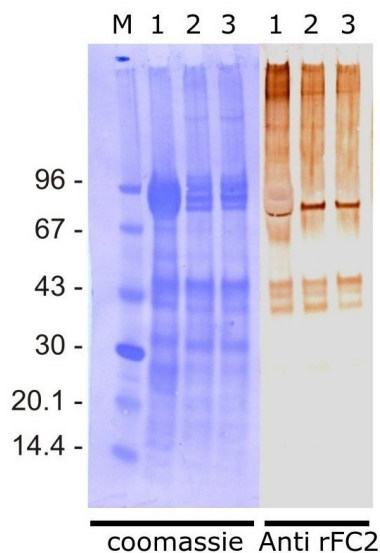
Expresí rekombinantního fragmentu rFC2 v jednotlivých frakcích byla analyzována SDS-PAGE a Western blottingem s primární protilátkou proti His-tagu. Rekombinantní protein se nacházel ve všech zkoumaných frakcích, ze kterých byl izolován chelatační chromatografií. Výsledek ukazuje obrázek 33. Vypočítaná velikost fragmentu rFC2 je 28,5 kDa. Kromě tohoto fragmentu Western blotting detekuje ještě jeho dimer o velikosti cca 57 kDa.



Obr. 33: Detekce rFC2 pomocí SDS-PAGE a Western blottingu

1 - rozpustné proteiny, 2 - membránové proteiny, 3 - rozpuštěná inkluzní tělíska, 4 - nezachycená frakce, 5 - přečištěný protein

S těmito protilátkami byla provedena stejná SDS-PAGE a Western blotting jako s protilátkami proti rFC1 (Obr. 28). Výsledek Western blottingu s protilátkami proti rFC2 ukazuje obrázek 34.



Obr. 34: SDS-PAGE a Western blotting analýza hemolymfy pomocí protilátek proti rFC2
M - LMW, 1 - GFP, 2 - HeLp KD, 3 - HeLp KD + IrFC KD

Obě protilátky specificky reagují se stejnými proteinovými fragmenty. Ani v případě 70 kDa fragmentu se tedy nejedná o artefakt, ale pravděpodobně o těžký řetězec z již aktivovaného IrFC, který v hemolymfě dlouhodobě přetrvává a nemizí tedy ani po RNA interferenci.

Po RNA interferenci na Western blottingu mizí agregát IrFC o přibližné velikosti 250 kDa, což je pravděpodobně ještě neaktivovaný IrFC.

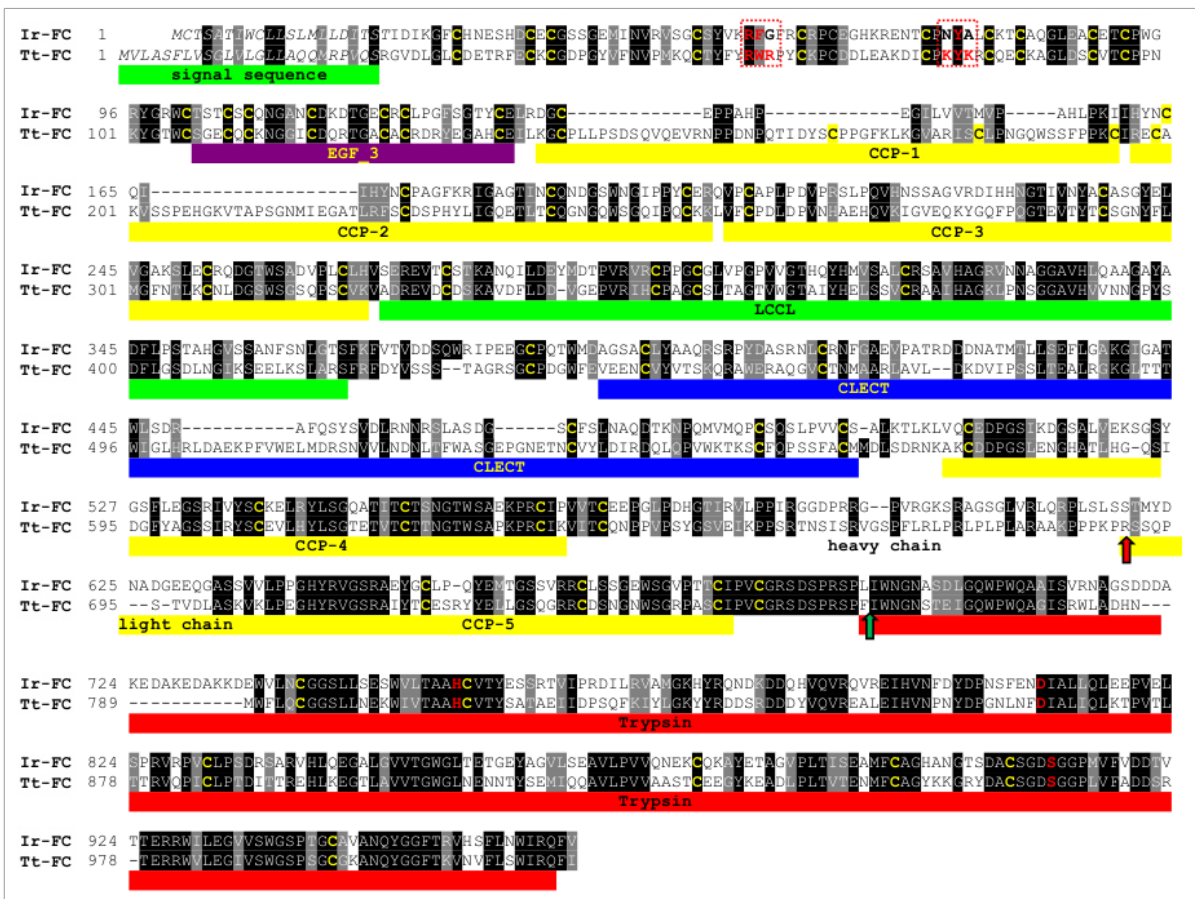
5. Diskuze

Zjištěná sekvence faktoru C klíštěte *Ixodes ricinus* (IrFC) je velmi podobná známé sekvenci faktoru C z genomu klíštěte *Ixodes scapularis* (IsFC). Hlavní rozdíl se nachází na N-terminálním konci, kde v sekvenci IsFC chybí 150 aminokyselin včetně signálního peptidu. I díky přítomnosti signálního peptidu v sekvenci faktoru C ostrorepa *Tachypleus tridentatus* (Muta a kol., 1991) se dá usuzovat, že dostupná sekvence IsFC je neúplná. Další rozdíly mezi sekvencemi jsou již velmi malé a v případě chybějících nebo přebývajících úseků se jedná nejspíše o špatnou predikci exonů v sekvenci IsFC, která je genomická, zatímco sekvence IrFC byla získána z cDNA. Toto by bylo možné ověřit sekvencí odpovídající cDNA z klíštěte *Ixodes scapularis*.

Sekvence IrFC byla porovnána se sekvencí ostrorepa *Tachypleus tridentatus*. Srovnání ukazuje obrázek 35. Konzervované domény jsou vyznačeny podle sekvence ostrorepa. Klíštěti téměř zcela chybí první CCP doména, část druhé CCP a část C-lektinové domény. Proto také C-lektinová doména není rozeznána predikcí konzervovaných domén na NCBI. Schéma doménové struktury IrFC upravené podle srovnání se sekvencí ostrorepa ukazuje obrázek 36.

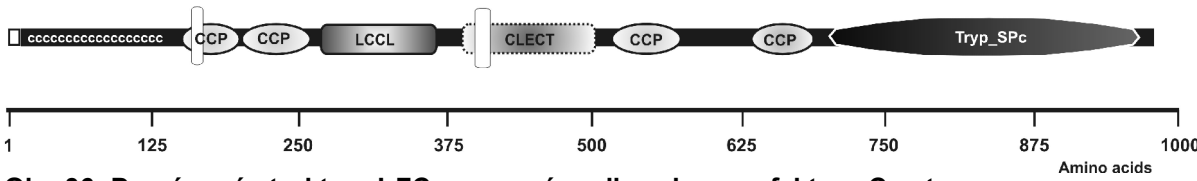
Červená a zelená šipka na obrázku 35 ukazují místa, kde se faktor C po svojí aktivaci štěpí (Muta a kol., 1991). Po štěpení vzniká jeden těžký a dva lehké řetězce. Těžký řetězec obsahuje u klíštěte tři CCP, LCCL a C-lektinovou doménu. Jeden lehký řetězec obsahuje poslední CCP doménu a druhý trypsinovou doménu. Trypsinová doména má konzervované všechny aminokyseliny tzv. katalytické triády (serin, kyselina asparagová, histidin), takže lze usuzovat, že proteáza je po odštěpení aktivní (Muta a kol., 1991).

Stejně jako u ostrorepa se na N-terminálním konci podařilo u klíštěte nalézt tzv. Cys-rich region - oblast bohatou na cysteiny, včetně motivů zodpovědných za vazbu faktoru C na LPS (Koshiha a kol., 2007). Na obrázku 35 jsou vyznačeny červenými rámečky.



Obr. 35: Porovnání aminokyselinové sekvence faktoru C klíštěte *Ixodes ricinus* (nahore) a ostrepa *Tachypleus tridentatus* (dole)

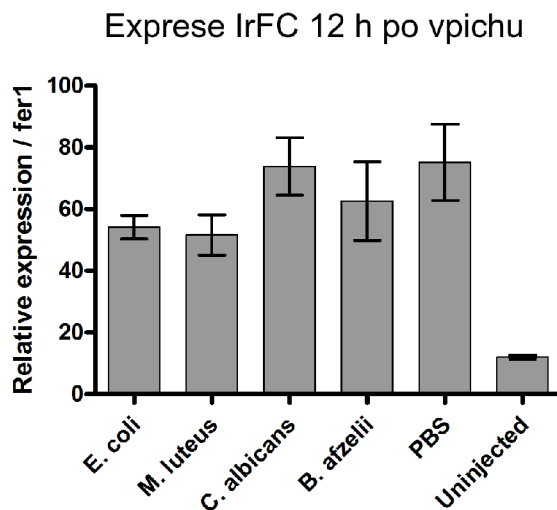
Černé pozadí ukazuje přesné shody, šedé aminokyseliny s podobnými vlastnostmi. Barevně je vyznačen signální peptid a konzervované domény podle sekvence ostrepa. Červené značky v oblasti bohaté na cysteiny na N-terminálním konci ukazují místa, která jsou pravděpodobně zodpovědná za vazbu na LPS. Šipky ukazují místa, kde se faktor C po aktivaci štěpí. Červené písmo uvnitř trypsinové domény značí katalytickou třídu, žlutým písmem jsou označeny cysteiny.



Obr. 36: Doménová struktura IrFC upravená podle sekvence faktoru C ostrepa
Bílá místa v CCP a v C-lektinové doméně ukazují chybějící části aminokyselinové sekvence.

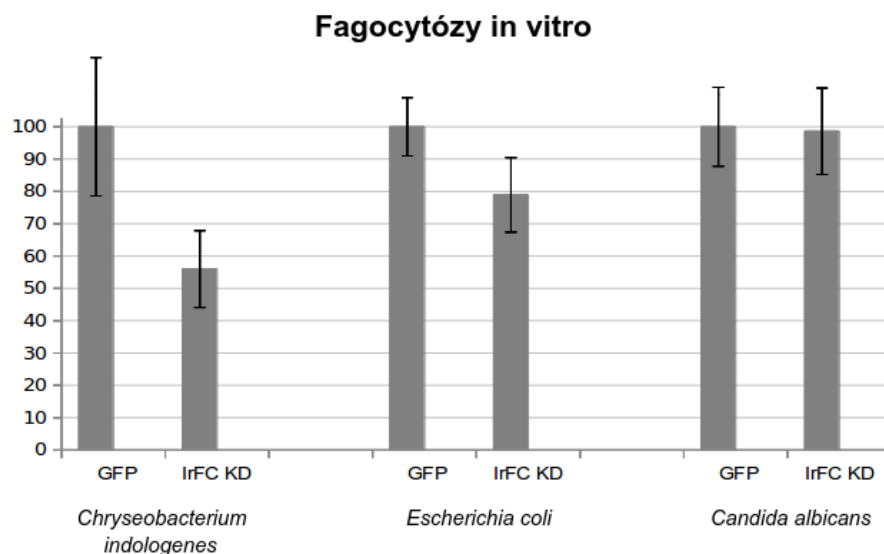
Jedním z cílů práce bylo určit, zda IrFC slouží i u klíštěte podobně jako u ostrepa jako koagulační faktor. U klíštěte byla na rozdíl od ostrepe tato práce mimořádně náročná kvůli velmi malému množství hemolymfy, které je možné z klíšťat získat. Nepodařilo se spolehlivě odlišit koagulaci od vysychání hemolymfy. Transkripce IrFC byla zvýšena nejen po vpichu bakterií a kvasinek, ale i po vpichu sterilního

PBS (Obr. 37) (Hajdušek a kol., nepublikováno). Zvýšení transkripce IrFC po vpichu nasvědčuje tomu, že IrFC patrně hraje úlohu při poranění a zřejmě tedy i v koagulaci hemolymfy klíštěte. Zvýšená exprese IrFC je tedy odpověď přímo na zranění (vpich) a ne na samotné invadující mikroorganismy.



Obr. 37: Graf ukazující míru exprese IrFC 12 hodin po vpichu
(graf poskytnut O. Hajduškem)

Výsledky experimentu sledování fagocytózy *in vitro* Dr. Veroniky Urbanové prokazují, že po snížení exprese IrFC pomocí RNAi klesá schopnost klíštěcích hemocytů fagocytovat gram-negativní bakterie, zatímco u kvasinek *Candida albicans* fagocytóza ovlivněna není (Obr 38). Pro snížení exprese IrFC byla použita dsRNA IrFC připravená v rámci méj diplomové práce. Tyto výsledky naznačují, že IrFC slouží v systému komplementu klíštěte ve specifické obraně proti infekci gram-negativních bakterií podobně, jak bylo ukázáno u ostrorepa (Ariki a kol., 2008).

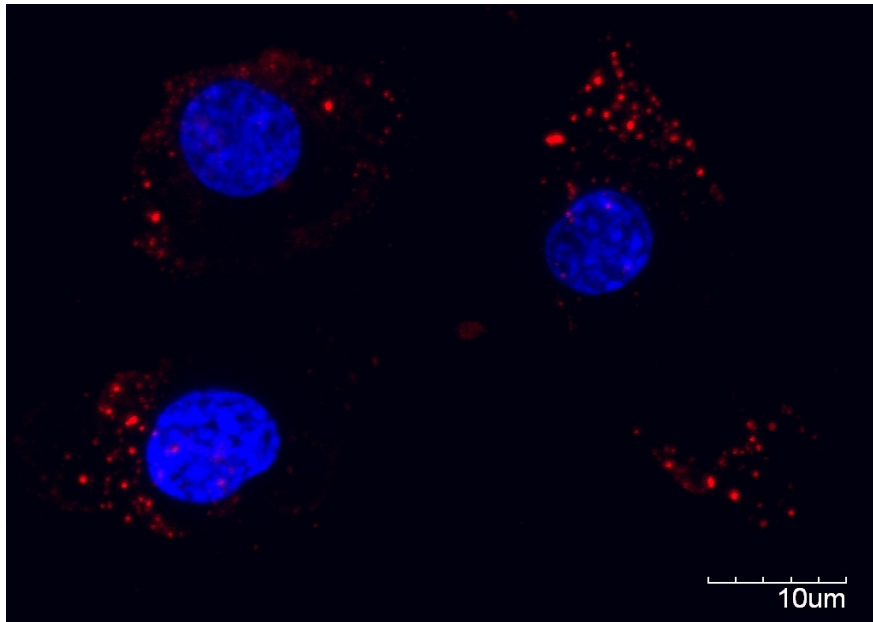


Obr. 38: Graf ukazující schopnost klíštěcích hemocytů fagocytovat mikroorganismy

GFP - kontrola, IrFC KD - klíšťata se sníženou expresí IrFC

Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku ze tří nezávislých experimentů (graf poskytnut V. Urbanovou).

Stejně jako faktor C ostrorepa, který byl nalezen v hemocytech (Tokunaga a kol., 1987), byla také exprese IrFC detekována pomocí qRT-PCR převážně v hemocytech. IrFC lze na proteinové úrovni detekovat v hemolymfě zřejmě ve zreagované formě. Výsledky RNAi naznačují, že tento produkt je v klíštěcí hemolymfě dlouhodobě přítomen a není tedy ovlivněn okamžitým snížením exprese po RNA interferenci. Detekovat neaktivovaný IrFC v klíštěcí hemolymfě se nepodařilo. RNAi experiment naznačoval, že IrFC by mohl odpovídat protein o velikosti cca 250 kDa. Není dosud jasné, jestli se jedná o dimer, nebo agregát, a objasnění této otázky bude vyžadovat další experimenty za využití RNA interference a vysoce citlivé chemiluminiscenční detekce pro Western blotting. V hemocytech byl IrFC detekován také metodou nepřímé imunofluorescence (práce Dr. Veroniky Urbanové) pomocí mnou připravených protilátek. Její předběžné výsledky ukázaly, že IrFC je přítomen v hemocytech (Obr. 39) a je schopen se vázat na gram-negativní bakterie *Escherichia coli* a *Chryseobacterium indologenes*.



Obr. 39: Detekce IrFC v klíčcích hemocytech metodou nepřímé imunofluorescence
Modře jádra hemocytů značená DAPI, červeně IrFC značený primární protilátkou Anti rFC2
a sekundární kozí Anti-Rabbit Alexa 594 (obrázek poskytnut V. Urbanovou).

6. Závěr

Byl identifikován ortholog faktoru C z klíštěte *Ixodes scapularis* v klíštěti *Ixodes ricinus*. Byla zjištěna jeho úplná sekvence. Sekvence faktoru C z klíštěte *Ixodes ricinus* je téměř identická jako sekvence faktoru C z klíštěte *Ixodes scapularis* (query cover 100 %). Vysoká podobnost je také s faktorem C ostrorepů *Tachypleus tridentatus* a *Carcinoscorpius rotundicauda* (query cover 98 %).

Pomocí metody Western blottingu a qRT-PCR byl zjištěn tkáňový expresní profil. Expres IrFC na úrovni proteinů byla prokázána v hemolymfě, na úrovni mRNA v hemocytech a v daleko menším množství i ve slinných žlázách, střevě a vaječnících.

V bakteriálním systému byly exprimovány dva rekombinantní fragmenty IrFC, proti kterým byly imunizací králíka připraveny polyklonální protilátky. Pomocí těchto protilátek jsem prokázal, že IrFC se vyskytuje v klíštěcí hemolymfě ve formě těžkého řetězce, který nemizí po RNA interferenci. Zřejmě se jedná o nahromaděnou formu aktivovaného IrFC. Naopak neaktivovaný IrFC se zdá být přítomen ve velmi malém množství a jeho detekce je na hranici citlivosti použitého systému pro Western blotting. Další experimenty bude nutné provést s výrazně vyšší citlivostí např. pomocí chemiluminiscenční detekce při větším ředění protilátek.

V navazující práci bylo zjištěno, že se exprese IrFC výrazně zvyšuje po poranění klíštěte, což naznačuje jeho možnou úlohu v koagulaci hemolymfy klíštěte. Metodou nepřímé imunofluorescence byla prokázána přítomnost IrFC v hemocytech klíštěte a jeho schopnost vázat se na povrch gram-negativních bakterií. Umlčení IrFC RNA interferencí také snižovalo schopnost klíštěcích hemocytů fagocytovat gram-negativní bakterie, což dohromady ukazuje také na možné zapojení do komplementového systému.

7. Použitá literatura

- Aderem, A., Ulevitch, R., 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782–787.
- Alwis, K.U., Milton, D.K., 2006. Recombinant factor C assay for measuring endotoxin in house dust: comparison with LAL, and (1 → 3)-beta-D-glucans. *Am. J. Ind. Med.* 49(4), 296–300.
- Ariki, S., Koori, K., Osaki, T., Motoyama, K., Inamori, K., Kawabata, S., 2004. A serine protease zymogen functions as a pattern-recognition receptor for lipopolysaccharides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 953–958.
- Ariki, S., Takahara, S., Shibata, T., Fukuoka, T., Ozaki, A., Endo, Y., Fujita, T., Koshiba, T., Kawabata, S., 2008. Factor C acts as a lipopolysaccharide-responsive C3 convertase in horseshoe crab complement activation. *J. Immunol.* 181, 7994–8001.
- Barker, S.C., Murrell, A., 2004. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology.* 129, 15–36.
- Begum, N., Matsumoto, M., Tsuji, S., Toyoshima, K., Seya, T., 2000. The primary host defense system across humans, flies and plants. *Curr Trends Immunol.* 3, 59–74.
- Bergner, A., Oganessyan, V., Muta, T., Iwanaga, S., Typke, D., Huber, R., 1996. Bode W. Crystal structure of coagulogen, the clotting protein from horseshoe crab: a structural homologue of nerve growth factor. *EMBO J.* 15, 6789–6797.
- Borovickova, B., Hypsa, V., 2005. Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*. *Exp. Appl. Acarol.* 35, 317–333.
- Buresova, V., Hajdusek, O., Franta, Z., Loosova, G., Grunclova, L., Levashina, E.A., Kopacek, P., 2011. Functional genomics of tick thioester-containing proteins reveal the ancient origin of the complement system. *Journal of innate immunity.* 3, 623–630.
- Buresova, V., Hajdusek, O., Franta, Z., Sojka, D., Kopacek, P., 2009. IrAM-an alpha2-macroglobulin from the hard tick *Ixodes ricinus*: characterization and function in phagocytosis of a potential pathogen *Chryseobacterium indologenes*. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 489–498.
- Ceraul, S.M., Sonenshine, D.E., Hynes, W.L., 2002. Resistance of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) following challenge with the bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). *J. Med. Entomol.* 39, 376–383.
- Eggenberger, L.R., Lamoreaux, W.J., Coons, L.B., 1990. Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. *Exp. Appl. Acarol.* 9, 279–287.
- Fujita, T., 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 346–353.
- Imler, J.L., Hoffmann, J.A., 2000. Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 16–22.
- Iwaki, D., Kawabata, S., Miura, Y., Kato, A., Armstrong, P.B., Quigley, J.P., Nielsen, K.L., Dolmer, K., 1996. Sottrup-Jensen, L., Iwanaga, S., Molecular cloning of *Limulus* alpha 2-macroglobulin. *Eur. J. Biochem.* 242, 822–831.

- Iwanaga, S., Kawabata, S., Muta, T., 1998. New type of clotting factors and defense molecules found in horseshoe crab hemolymph: their structures and functions. *J. Biochem.* 123, 1–15.
- Iwanaga, S., Morita, T., Harada, T., Nakamura, S., Niwa, M., Takada, K., Kimura, T., Sakakibara, S., 1978. Chromogenic substrates for horseshoe crab clotting enzyme. Its application for the assay of bacterial endotoxins. *Haemostasis.* 7(2-3), 183–188.
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology.* 129, 3–14.
- Kawabata, S., Koshiba, T., Shibata, T., 2009. The lipopolysaccharide-activated innate immune response network of the horseshoe crab. *Invertebrate Surviv J.* 6, 59–77.
- Kawabata, S., 2010. Immunocompetent molecules and their response network in horseshoe crabs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 708, 122–136.
- Kopacek, P., Hajdusek, O., Buresová, V., Daffre, S., 2010. Tick innate immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 708, 137–162.
- Kopacek, P., Hajdusek, O., Buresova, V., 2012. Tick as a model for the study of a primitive complement system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 710, 83–93.
- Koshiba, T., Hashii, T., Kawabata, S., 2007. A Structural perspective on the interaction between lipopolysaccharide and factor C, a receptor involved in recognition of gram-negative bacteria. *J. Biol. Chem.* 282, 3962–3967.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86, 973–983.
- 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), 709–18.
- Levin, J., Bang, F.B., 1968. Clottable protein in *Limulus*: Its localization and kinetics of its coagulation by endotoxins. *Thromb Diath Haemorrh.* 19, 186–197.
- Loosova, G., Jindrak, L., Kopacek, P., 2001. Mortality caused by experimental infection with the yeast *Candida haemulonii* in the adults of *Ornithodoros moubata* (Acarina: Argasidae). *Folia Parasitol.* 48, 149–153.
- Maya-Monteiro, C.M., Daffre, S., Logullo, C., Lara, F.A., Alves, E.W., Capurro, M.L., Zingali, R., Almeida, I.C., Oliveira, P.L., 2000. HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 275(47), 36584–36589.
- Muta, T., Miyata, T., Misumi, Y., Tokunagag, F., Nakamura, T., Toh, Y., Ikehara, Y., Iwanaga, S., 1991. *Limulus* factor C. An endotoxin-sensitive serine protease zymogen with a mosaic structure of complement-like, epidermal growth factor-like, and lectin-like domains. *J. Biol. Chem.* 266(10), 6554–6561.
- Nava, S., Guglielmo, A.A., Mangold, A.J., 2009. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci (Landmark Ed).* 14, 2857–2877.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G., Nielsen, H., 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods.* 8, 785–786.

Roslansky, P.F., Novitsky, T.J., 1991. Sensitivity of *Limulus* ameobocyte lysate (LAL) to LAL-reactive glucans. J. Clin. Microbiol. 11, 2477–2483.

Toh, Y., Mizutani, A., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., 1991. Morphology of the granular hemocytes of the Japanese horseshoe crab *Tachypleus tridentatus* and immunocytochemical localization of clotting factors and antimicrobial substances. Cell Tissue Res. 266, 137–147.

Tokunaga, F., Miyata, T., Nakamura, T., Morita, T., Kuma, K., Miyata, T., Iwanaga, S., 1987. Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) of horseshoe crab hemocytes. Eur. J. Biochem. 167, 405–416.

Volf, P., Votypka, J., 2007. Parazitičtí členovci (lékařská entomologie). in: Paraziti a jejich biologie. Volf, P., Horak, P., Cepicka, I., Flegr, J., Lukes, J., Mikes, L., Svobodova, M., Vavra, J., Votypka, J. (eds.) TRITON, Praha, pp. 231–299.