

Přírodovědecká fakulta
Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích



Ricinusin – nový antimikrobiální peptid
z klíštěte *Ixodes ricinus*:
třetí člen rodiny klíštěcích obranných proteinů
bohatých na histidin.

Bakalářská práce

Veronika Dornáková
2008

vedoucí práce: Nataliia Rudenko, PhD.
Maryna Golovchenko, MSc.
fakultní garant: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

Bakalářská práce

Dorňáková V., 2008: Ricinusin - nový antimikrobiální peptid z klíštěte *Ixodes ricinus*: třetí člen rodiny klíštěcích obranných proteinů bohatých na histidin. [Ricinusin – a new antimicrobial peptide isolated from the hard tick *Ixodes ricinus*: the third member of the tick histidine-rich defense protein family.]

Faculty of Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic., BSc. Thesis in Czech, 47 pp.

Annotation:

New gene encoding antimicrobial protein (ricinusin) was isolated from *I. ricinus*. The 405 nt cDNA fragment contained a 135 aa ORF, encoding a 14.5 kDa protein with 19 aa signal peptide. Gen Bank comparison of ricinusin showed weak similarity to a new type of histidine rich antimicrobial protein with unique HEAHEAHEA repeat from *Boophilus microplus* and *Amblyomma hebraeum*.

The differential gene expression was strongly induced by blood feeding in larva, nymph and adults. The site of differential expression in salivary glands and gut indicates that ricinusin is induced as a part of broad-spectrum immune response.

To study the antimicrobial capacity of ricinusin and its capability in clearing *Borrelia burgdorferi* infections, it was expressed as a His-tagged fusion protein in bacterial expression system. Analysis of the genomic organization of *ricinusin* gene showed that it is intronless.

Bakalářská diplomová práce byla financována z výzkumného záměru MSM 6007665801 a výzkumného centra 39-LC06009.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. V planém znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury.

V Českých Budějovicích, 30.4.2008

.....
Veronika Dorňáková

Ráda bych poděkovala svým školitelkám, Maryně Golovchenko a Nataše Rudenko, za možnost pracovat na tomto tématu a také za velkou pomoc při zpracování této diplomové práce. Děkuji profesorovi Liborovi Grubhofferovi za možnost pracovat v laboratoři Molekulární biologie vektorů a parazitů. Mé díky patří i Tereze Matějovské a Janě Horáčkové za jejich rady ohledně metodiky a za příjemnou atmosféru v laboratoři.

Především bych chtěla poděkovat svým rodičům za podporu při studiu.

Děkuji.

OBSAH

1. ÚVOD	6
1.1. Klíště <i>Ixodes ricinus</i>	6
1.2. Imunitní systém klíšťat	7
2. CÍL PRÁCE	13
3. MATERIÁL A METODY	14
3.1. Materiál	14
3.1.1. Použité primery (Generi Biotech):	14
3.1.2. Použité chemikálie a kity:	14
3.2. Metody	17
3.2.1. Izolace RNA	17
3.2.2. Syntéza jednovláknové cDNA (ss cDNA – ‘single strand DNA’).....	17
3.2.3. PCR (‘Polymerase Chain Reaction’).....	18
3.2.4. Elektroforéza	19
3.2.5. Purifikace PCR produktu	19
3.2.6. Klonování PCR produktu do vektoru pCR [®] 4-TOPO	19
3.2.7. Transformace ‘One Shot [®] TOP10 <i>E. coli</i> Competent Cells’	20
3.2.8. Izolace plazmidové DNA	20
3.2.9. Ověření přítomnosti inzertu v plasmidu	21
3.2.10. Sekvenování	21
3.2.11. Příprava rekombinantního proteinu v expresním vektoru Champion [™] pET 100/D-TOPO [®]	21
3.2.12. Transformace BL21 Star [™] (DE3) One Shot [®] Cells	22
3.2.13. Exprese rekombinantního proteinu – pilotní exprese	22
3.2.14. SDS-PAGE – Kontrola exprese rekombinantního proteinu	22
3.2.15. Izolace rekombinantního proteinu	23
3.2.16. Purifikace rekombinantního proteinu	24
3.2.17. Western blotting – přenos proteinů	25
3.2.18. Izolace genomové DNA	26
4. VÝSLEDKY	28
4.1. Izolace RNA a syntéza ss cDNA	28
4.2. PCR	28
4.3. Diferenciální exprese genu pro ricinusin	30
4.3.1. Diferenciální exprese genu pro ricinusin u jednotlivých vývojových stádií klíštěte <i>I. ricinus</i>	30
4.3.2. Diferenciální exprese genu pro ricinusin v různých tkáních	30
4.4. Exon/intronní struktura genu pro ricinusin	31
4.5. Rekombinantní protein	33
4.5.1. Příprava rekombinantního proteinu se signálním peptidem	33
4.5.2. Purifikace rekombinantního proteinu se signálním peptidem	34
4.5.3. Hmotnostní spektrometrická analýza (‘mass spectrometric’ - MS analýza).....	36
4.5.4. Příprava rekombinantního proteinu bez signálního peptidu.....	37
5. DISKUZE	38

5.1. Skupina histidin-bohatých antimikrobiálních peptidů	38
5.2. Transkripční profil genu pro ricinusin.....	39
5.3. Příprava a purifikace rekombinantního proteinu	41
6. ZÁVĚR	43
7. LITERATURA.....	44

1. ÚVOD

1.1. Klíště *Ixodes ricinus*

Klíšťata tvoří jednu z důležitých skupin členovců (*Arthropoda*) významných vysokou rozmanitostí přenášených patogenních mikroorganismů (viry, bakterie a prvoci) z jednoho druhu živočichů na druhý.

Z kmene členovců (*Arthropoda*) parazitují na člověku zástupci dvou tříd – třídy hmyzu (*Insecta*) a pavoukoců (*Arachnida*). Do třídy pavoukoců, přesněji do podtřídy roztoči (*Acari*), patří řád *Parasitiformes*, jenž zahrnuje podřád klíšťata (*Ixodida*). Klíšťata se dále dělí do tří čeledí. Jmenovitě jsou to čeledi *Argasidae* („měkká“ - klíšťáci), *Ixodida* („tvrdá“ - klíšťata) a *Nuttallidae*. Avšak ne všechny druhy klíšťat mají schopnost přenášet patogenní organismy na člověka (10% ze všech druhů).

Hematofágní ektoparazit *Ixodes ricinus* (klíště obecné) je hlavním vektorem přenášejícím patogeny způsobující nemoci člověka v Evropě. Lymeská boreliosa (LB), jejímž původcem je spirocheta *Borrelia burgdorferi*, a virová klíštěcí encefalitida (VKE) patří k těm nejzávažnějším. V posledních letech se v České republice zvýšil počet případů LB a VKE. Od roku 1997 do roku 2006 stoupl výskyt případů VKE ze 4.0 na 10.0 (relativní počty na 100 000 obyvatel). Větší nárůst byl zaznamenán u Lymeské boreliosisy a to z 24.0 na 42.6 případů (<http://www.szu.cz/cem/epidat/epirel-97-06.htm>). Toto navýšení je částečně způsobeno expanzí klíšťat do městských oblastí.

I. ricinus patří mezi oportunní druhy klíšťat, jenž sají na širokém spektru hostitelů¹. Během tříletého vývojového cyklu prochází třemi vývojovými stádii – larvou, nymfou a dospělcem (imagem) a vystřídá tři hostitele.

Šestinohá larva saje především na drobných hlodavcích (např. myš), příležitostně i na ptácích a menších savcích. Po nasátí nastává hibernace, během níž se larva přemění v osminohou nymfu. Nymfy parazitují také na ptácích, středních a menších savcích (např. ježek, veverka). Po metamorfóze na dospělé (imago) dochází k poslednímu sání – samička saje 6-13 dní, sameček jen krátce a přerušovaně. Následuje kopulace (na hostiteli i mimo něj) a kladení vajíček (mimo hostitele). Příležitostným hostitelem všech tří stadií může být i člověk. Vyhledání hostitele klíšťaty je spíše pasivní pomocí speciálního smyslového orgánu tzv. Hallerova orgánu².

Dalším orgánem, kterým se klíšťata přizpůsobila ektoparazitickému způsobu života, je speciální ústní ústrojí hypostom (sací orgán). Chelicery umožňují hypostomu

penetraci kůží hostitele, čímž dochází k poškození epidermálních a dermálních buněk včetně místních cévek. Ihned na začátku sání vylučuje klíště do těla hostitele biologicky aktivní molekuly obsažené v jeho slinných žlázách, čímž značně ovlivňuje imunitní reakci hostitele. Přehled biologicky aktivních molekul ve slinných žlázách klíštěte byl nedávno zveřejněn v publikaci Valenzuely³.

Pro zajištění nezbytně nutné délky krmení musí klíště zabránit srážení krve hostitele. Proces srážení krve závisí na aktivaci faktoru X (FXa; pomocí kolagenu nebo tromboplastinem), který štěpí protrombin na trombin. Aktivní trombin štěpením proteinu fibrinogenu vytváří nerozpustnou síť, do které se zachytí červené krvinky a krevní destičky. Některé bioaktivní molekuly obsažené v klíštěcích slinách jsou zaměřeny na inhibici FXa (např. ixolaris, salp14⁴), trombinu (např. savignin⁵, americanin⁶) a nebo obou, čímž zabraňují srážení krve v místě poškození kůže.

Dalšími z modulačních látek klíštěcích slin jsou apyrázy a prostaglandiny (PGI₂, PGD₂), které zabraňují srážení krevních destiček. Prostaglandiny (PGE₂, PGI₂, PGD₂) také působí vasodilaci cév, čímž zvýší krevní tok⁷.

Extrakty slinných žláz dále ovlivňují expresi cytokinů, snižují produkci protilátek a působí na T buněčnou odpověď (T_H2), jež není účinná v eliminaci ektoparazita⁸.

Během sání se do těla klíštěte dostávají kromě krve také mikroorganismy, viry a jiné cizorodé molekuly, jejichž přítomnost vyvolává imunitní odpověď klíštěte.

1.2. Imunitní systém klíšťat

Klíšťata, stejně jako všichni bezobratlí, se musí bránit před infekcí bez pomoci protilátek a lymfocytů. Jejich hlavní zbraní v boji proti mikroorganismům je přirozená imunita⁹. Tato imunitní odpověď obecně postrádá imunologickou paměť a specifické antigeny. Výhodou je její velmi rychlá pohotovost k reakci. Přirozenou imunitu tvoří dvě, vzájemně se doplňující, odpovědi: buněčná a humorální.

Hlavní komponentou buněčné imunitní odpovědi jsou hemocyty. Hemocyty představují 50 až 60 % obsahu hemolymfy¹. Klíštěcí hemocyty se mohou dělit dle obsahu granul na plasmocyty a granulocyty, avšak někteří autoři dělí tyto imunitní činitele nejen podle přítomnosti granul, ale také podle morfologie a jejich tvaru na prohemocyty, granulární hemocyty typu I. a II., plasmocyty a fagocytární hemocyty¹⁰. U klíšťáka *Ornithodoros moubata* byly také objeveny sferulocyty homologické se sferulocyty nalezenými u hmyzu¹¹.

Hemocyty, buňky funkčně podobné bílým krvinkám, jsou zodpovědné za nodulaci (vytváření hemocytárních agregátů), enkapsulaci a fagocytózu invadujících mikroorganismů.

Fagocytóza hemocyty je považována za primární buněčnou imunitní odpověď při mikrobiální infekci u většiny druhů klíšťat¹⁰. Tuto hypotézu potvrdil Inoue a kol. u hemocytů klíšťáka *O. moubata*, přesněji u granulocytů a plasmocytů¹². Také u klíštěte *I. ricinus* byla prokázána fagocytická aktivita hemocytů¹⁰. Bylo zjištěno, že buněčná imunitní odpověď u klíšťáka *O. moubata* je rychlejší než u klíštěte *I. ricinus*. Navzdory tomuto faktu klíšťata byla k infekci imunní, kdežto klíšťáci uhynuli pár dní po injikaci bakterie *Chryseobacterium indologenes*. Z tohoto lze usoudit, že by u *I. ricinus* nejspíš mohl být ještě jiný účinný obranný mechanismus, buněčný či humorální, který zabraňuje růstu bakterií¹³.

Johns a kol. provedl studii imunitní reakce po injikaci *B. burgdorferi* u klíštěte *Dermacentor variabilis*, jejíž výsledky nasvědčovali faktu, že fagocytóza je primární odpovědí na infekci¹⁴. Avšak v roce 2002 byla uveřejněna publikace, v níž Ceraul a kol. prokázali u klíštěte *D. variabilis*, že hlavní imunitní reakcí je nodulace, která zcela odstraní bakterii *Escherichia coli* z hemolymfy 6 hodin po injikaci bakterií¹⁵.

Také u klíšťáka *O. moubata* byly pozorovány plasmocyty vytvářející shluky bakterie-hemocyt, které následně opouštějí cirkulující hemolymfu⁹.

Enkapsulace, proces podobný nodulaci, byl sledován u klíštěte *D. variabilis*¹⁶.

Hemocyty nejsou součástí pouze buněčné ale také humorální imunitní odpovědi klíštěte⁹. Během procesu humorální imunitní odpovědi jsou produkovány obranné peptidy *de novo*, většinou v tukových tělískách nebo v hemocytech, a jsou uvolňovány do hemolymfy nebo jsou transportovány do příslušných tkání¹⁷.

Tyto obranné peptidy či polypeptidy jsou obecně nazývané antimikrobiální peptidy (AMPs). Jsou to efektorové molekuly humorální imunitní odpovědi. Většina AMPs je kationických, i když byly objeveny i anionické AMPs^{18,19}. Tento kationický charakter AMPs spolu s vytvářením amfipatické struktury usnadňují interakci s negativně nabitou buněčnou stěnou a fosfolipidovou membránou mikroorganismů²⁰.

Antimikrobiální peptidy jsou široce rozšířené u rostlin i u živočichů. Velké množství antimikrobiálních peptidů bylo objeveno u hmyzu, obojživelníků i savců²¹. Méně AMPs bylo popsáno u třídy pavoukoců – *Arachnida* (např. gomesin²²) a ještě méně u samotných klíšťat.

Přestože mají AMPs některé vlastnosti podobné, jako například jejich velikost (mnohdy menší než 10 kDa), jsou odlišní ve své sekvenci a mechanismu působení²². Na základě těchto vlastností se dají AMPs rozdělit do několika skupin.

Jednou komplexně studovanou skupinou AMPs jsou lysozymy. Jsou to enzymy se schopností štěpit β -1,4-glykosidové vazby mezi kyselinou N-acetylmuramovou a N-acetyl-glukosaminem u peptidoglykanů buněčné stěny Gram-positivních bakterií. Lysozymy jsou členěny na několik typů, z nichž lysozym typu c ('chicken') se vyskytuje u klíštěte. Podboronov a kol. izoloval lysozym z několika druhů klíšťat – *Alveonanus lahorensis*, *Ornithodoros papillipes*, *O. moubata*, *Hyalomma asiaticum* a *Ixodes persulcatus*²³. Z celotělových homogenátů byl izolován lysozym, jež vykazoval výraznou podobnost s c-typem lysozymu. Některé lysozymy mohou mít jak antimikrobiální tak trávicí funkci, jako například lysozym typu-c izolovaný u klíšťáka *O. moubata*. U klíšťáka docházelo ke zvýšení exprese lysozymu při trávení krve po sání^{24,25}. U klíšťat *Dermacentor andersonii* a *D. variabilis* byla pozorována exprese lysozymu typu c po injekci bakterií a to především v hemocytech, ale také v ovariích, slinných žlázách a Malpigických trubicích. Exprese lysozymu typu c byla také pozorována v ovariích klíštěte *Boophilus microplus*²⁶.

Lektiny jsou dalšími obranými proteiny podílející se na imunitě klíštěte. Jejich základní funkcí je agregace a opsonizace mikroorganismů pomocí vazby na složky jejich buněčné stěny (N-acetyl-D-glukosamin, kyselina sialová). U *I. ricinus* bylo prokázáno, že lektiny jsou produkovány a/nebo uchovány v hemocytech a rozpoznáním především Gram-negativních bakterií se podílí na imunitní odpovědi²⁷. Prvním izolovaným klíštěcím lektinem byl Dorin M z hemolymfy klíšťáka *O. moubata*²⁸. U stejného klíštěte byl identifikován další lektin *OmGalec*²⁹. V roce 2005 byl u klíštěte *I. ricinus* objeven Ixoderin³⁰. Také u jiných klíšťat (*Rhipicephalus appendiculatus*, *O. tartakovskyi*, *O. tholozani*, *Argas polonicus*) byly charakterizovány lektiny³¹.

V posledních letech mnoho laboratoří věnuje pozornost studiu cDNA knihoven z klíštěcích slinných žláz. Díky těmto studiím bylo identifikováno několik inhibitorů serinových proteáz, zahrnující serpiny a α -makroglobuliny. U klíšťat bylo nalezeno několik serinových inhibitorů, jejichž role v obraně proti mikroorganismům však zatím studována nebyla.

Velmi významnou skupinou antimikrobiálních peptidů jsou defensiny. Tyto převážně kationické peptidy o velikosti přibližně 4 kDa (36 - 46 aminokyselin dlouhé) jsou charakteristické šesti cysteinovými zbytky, které se párují (cys1 - cys4; cys2 - cys5; cys3 - cys6) za vzniku intramolekulárních disulfidických můstků. Tato terciální struktura je důležitá především pro antimikrobiální funkčnost defensinů. Defensiny účinné především proti Gram-positivním bakteriím mají také silnou aktivitu proti některým Gram-negativním bakteriím, houbám, kvasinkám a prvokům^{32,33}.

Defensiny byly identifikovány u několika druhů klíšťat. Jednotlivé klíštěcí defensiny se od sebe liší především genomovou sekvencí, počtem izoform a tkání exprese.

Prvním defensinem izolovaným z klíštěte byl varisin³⁴. Tento kationický defensin byl získán z hemocytů klíštěte *D. variabilis*. Kromě antimikrobiální aktivity proti Gram-positivním bakteriím byla u varisinu prokázána aktivita také proti bakterii *B. burgdorferi*. Varisin se u *D. variabilis* vyskytuje ve dvou izoformách, přičemž jedna se exprimuje především v hemocytech, zatímco druhá ve střevě, ovariích, tukovém tělese a částečně i v hemocytech³⁵. Po infekci *D. variabilis* bakterií *Rickettsia montanensis* byla pozorována změna v expresi obou izoform³⁶.

Čtyři izoformy (A,B,C,D) defensinů byly identifikované u klíšťáka *O. moubata*³⁷.³⁸ Exprese defensinu A, B a C je velmi slabá v tukovém tělese oproti expresi ve střevě. Naproti tomu u defensinu D je exprese v tukovém tělese silnější. Sekvence aminokyselin prokázala blízkou příbuznost u defensinu *O. moubata* A, B a C. Všechny čtyři izoformy působí proti Gram-positivním, ne však proti Gram-negativním bakteriím³⁹. Ze střeva nasáté samičky byl izolován defensin A bez signálního peptidu, u kterého byla zjištěna antimikrobiální aktivita proti bakterii *Staphylococcus aureus*³⁸. Genomové sekvence těchto čtyř izoform obsahují 4 exony oddělené od sebe 3-mi introny.

Longicin, defensin charakterizovaný u klíštěte *Haemaphysalis longicornis*, kromě své antimikrobiální a antifungální aktivity působí také proti parazitickému prvoku *Babesia sp.*⁴⁰.

Dva defensinům podobné antimikrobiální peptidy byly identifikovány u stejného klíštěte⁴¹. Jeden, H1gut-defensin, prokazuje vysokou podobnost s ostatními objevenými defensiny u klíšťat. Avšak druhý, H1sal-defensin, se liší od ostatních defensinů negativním nábojem a 12 aminokyselin dlouhým prodloužením na C-konci.

Pomocí RT-PCR byla prokázána exprese H1gut-defensinu ve střevě, zatímco u H1sal-defensinu ve slinných žlázách. U obou těchto defensinů byla zjištěna antimikrobiální aktivita proti bakteriím *Staphylococcus aureus* a *E. coli*.

Různé defensiny byly objeveny i u příbuzných druhů klíšťat. U klíštěte *A. americanum* byl objeven defensin *amercin*⁴², zatímco u příbuzného druhu *A. hebraeum* byly identifikovány dva defensinům podobné antimikrobiální peptidy *Amblyomma defensin peptid 1 a 2*⁴³. Podobnost mezi kationickým amercinem a dvěmi aniockými defensiny je velmi nízká (okolo 30%).

U klíšťat *I. ricinus* a *I. scapularis* byly také charakterizovány dva různé defensiny. Zatímco u klíštěte *I. ricinus* byly objeveny dvě izoformy – Def1 a Def2⁴⁴, defensin *scapularisin* má pouze jednu izoformu⁴⁵. Analýzou genomových sekvencí byly u klíštěte *I. ricinus* objeveny 3 exony oddělené od sebe 2-mi introny⁴⁴. Oproti tomu u klíštěte *I. scapularis* nebyly nalezeny žádné introny⁴⁵.

Defensinům blízkou skupinou jsou tzv. peptidy bohaté na histidiny. Tyto peptidy obsahují stejně jako defensiny šestici cysteinů. Avšak na rozdíl od defensinů obsahují na svém C-konci vyšší počet histidinů. U klíšťat byly zatím objeveny jen dva takové peptidy *hebraein* a *microplusin*.

Hebraein, antimikrobiální peptid izolovaný z klíštěte *Amblyomma hebraeum*, se skládá se šesti rovnoměrně rozložených cysteinů a více histidinů na C-konci. *Hebraein* prokázal antimikrobiální aktivitu proti Gram-positivní bakterii *S. aureus*, Gram-negativní bakterii *E. coli* a také proti houbě *Candida glabrato*, čímž se ukázala široká specifikace tohoto peptidu⁴⁶.

Dva antimikrobiální peptidy byly izolované z hemolymfy klíštěte *B. microplus*⁴⁷. Peptid s nižší velikostí prokázal vysokou podobnost s defensiny. Druhý peptid - *microplusin* - nevykazoval podobnost s jinými dříve popsány AMPs klíšťat. *Microplusin* je *hebraeinu* velmi podobný (podobnost 73%), avšak *microplusin* má však na svém C-konci pouze čtyři histidiny na rozdíl od *hebraeinu*⁴⁶. Tento antimikrobiální peptid byl získán z hemolymfy klíštěte. Expresí genu pro *microplusin* byla pozorována v ovariích, tukovém tělese i v hemocytech. Nebyla prokázána antimikrobiální aktivita proti Gram-negativní bakterii *E. coli*⁴⁷.

V roce 2005 Rudenko a kol.⁴⁸ zahájili výzkum genů klíštěte *I. ricinus*, které svým působením ovlivňují interakci mezi vektorem a patogenem. Hlavním cílem projektu bylo zjistit význam těchto genů v imunitní odpovědi klíštěte po infekci *B. burgdorferi*.

Po identifikaci dvou genů kódujících AMPs u *I. ricinus*, které svými rysy odpovídaly skupině defensinů, byl objeven další nový gen kódující AMP s vyšším obsahem histidinu. Gen byl nazván *ricinusin*, podle jména klíštěte, z kterého byl vyizolován (DQ266374) a komparativní analýza s GenBank prokázala, že žádné příbuzné geny, nebo geny podobné *ricinusinu* do této doby popsané nebyly. Ricinusin se stal třetím obranným proteinem po hebraeinu a microplusinu, který patří do nové rodiny antimikrobiálních peptidů klíšťat bohatých na histidin.

Je velmi obtížné porozumět přirozené imunitě klíšťat. V posledním letech začaly být antimikrobiální peptidy uznávané jako velmi důležitá součást této imunitní odpovědi. Jejich studium nám může objasnit jak přirozená imunita klíšťat vlastně funguje a tím nám osvětlit i interakce mezi vektorem a patogenem.

2. CÍL PRÁCE

V naší laboratoři byl před pár lety zahájen výzkum diferenciatně exprimovaných genů klíštěte *Ixodes ricinus* ovlivňujících interakci mezi vektorem a patogenem.

V roce 2005 byl v rámci tohoto výzkumu objeven nový gen kódující AMP s C-koncem bohatým na histidiny . Gen byl nazván podle jména klíštěte, z kterého byl vyizolován, *ricinusin* (DQ266374). Komparativní analýza s GenBank prokázala, že žádné příbuzné geny, nebo geny podobné *ricinusinu* do této doby popsány nebyly.

Cílem této práce je pomocí molekulárně biologických metod charakterizovat gen *ricinusin* a protein, který kóduje. Proto byly stanoveny tyto cíle:

- Vyizolovat gen pro *ricinusin*, zaklonovat jej do pCR[®] 4-TOPO vektoru a zkontrolovat správnou nukleotidovou sekvenci a čtecí rámec sekvenováním plazmidu.
- Zaklonovat gen pro *ricinusin* do Champion pET-100 expresního vektoru.
- Optimalizovat podmínky exprese a purifikace proteinu.
- Exprimovat a purifikovat rekombinantní protein. Výsledky ověřit pomocí metody Western Blotting a MS analýzy.
- Zjistit genomovou strukturu genu pro *ricinusin* u klíštěte *I. ricinus*.
- Zjistit expresi genu pro *ricinusin* u vybraných tkání a jednotlivých vývojových stádií klíštěte *I. ricinus* v závislosti na příjmu potravy.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Materiál

3.1.1. Použité primery (Generi Biotech):

název primeru	sekvence	T _A (°C)
RicinusinForw	5'- CAC CAT GAA GTG CAG CGT GTG CCT -3'	52
RicinusinRev	5'- CGC ATC ATG GTG GGC CGC TTC AG -3'	52
Ricinusin mature	5'- CAC CGA GGA AGC CCA TGG AGC C -3'	55
RicF10-31	5'- AGC GTG TGC CTC CTG GTT CTC T -3'	50
RicRev404-383	5'- GCA TCA TGG TGG GCC GCT TCA -3'	50
RicRev375-353	5'- CTC TTC AGG GTG GGC AGT AGC AG -3'	50
RicGenomF1-18	5'- ATG AAG TGC AGC GTG TGC -3'	53
RicGenomRev405	5'- GCA TCA TGG TGG GCC -3'	53
ACTIN-Forw	5'- CGT CTG GAT CGG CGG CTC TAT -3'	52
ACTIN-Rev	5'- AGC CGC ACT CTT TTC CAC AAT CTC -3'	52
T7-Forw	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG -3'	50
T7-Rev	5'- GCT AGT TAT TGC TCA GCG G -3'	50
M13-Forw	5'- GTA AAA CGA CGG CCA -3'	50
M13-Rev	5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'	50

3.1.2. Použité chemikálie a kity:

RNA elektroforéza	
5x TBE pufr	10mM Na ₂ EDTA, 178mM kyselina boritá, 178mM Tris
Agaróza NA	1.2% agaróza (SERVA) bez RNáz v 1x TBE pufru
6x vzorkový pufr	0.25%(w/v) bromfenolová modř, 0.25%(w/v) xylen cyanol, 30%(w/v) glycerol, 1.2% SDS, 60mM fosforečnan sodný, 500x 'SYBR Green'; pH 6.8
DNA elektroforéza	
50x TAE pufr (1l)	242g Tris-baze, 100ml 500mM EDTA(pH 8.0), 57.1ml kyseliny octové (ledové)
Agaróza	1% agaróza (SERVA) pro DNA elektroforézu v 1x TAE pufru
5x vzorkový pufr	20% Ficoll, 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mg/ml 'Orange G', 500x 'SYBR Green'
Expresní a klonovací plasmidy	
pET100/D-TOPO [®]	Invitrogen - selekce přes ampicilin
pCR 4-TOPO [®]	Invitrogen - selekce přes ampicilin
Média a půdy pro pěstování bakterií	
SOC médium	2% 'bacto-tryptone', 0.5% 'bacto-yeast' extrakt, 0.05% NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl ₂ , 10mM MgSO ₄ , 20mM glukóza; pH 7.0; sterilní

LB médium	1% 'bacto-tryptone', 0.5% 'bacto-yeast' extrakt, 0.5% NaCl; pH 7.0; sterilní
LB agar	1.5% bacto-agar v LB médiu
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside (zásobní roztok 1M)
Antibiotika	Ampicilin (zásobní roztok 50mg/ml H ₂ O)
SDS-PAGE	
30% AA	Acrylamide a bisacrylamide
C1 pufr	1.5 M Tris-HCL; pH 8.8
C2 pufr	0.5 M Tris-HCL; pH 6.8
10% SDS	Laurylsulfát sodný
10% APS	Amonium persulfát
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
5x vzorkový pufr	250mM Tris-HCl (pH 6,8), 500mM dithiotreitol, 10% SDS, 0.2% bromophenol blue, 50% glycerol
barvicí roztok	PageBlue™ (Invitrogen)
10x SDS E pufr (1l)	10g SDS, 30.3g TRIS, 144.1g glycin
Western blotting	
blotovací pufr	20% methanol, 25mM Tris-Base, 150mM glycin
Imunodetekce Ni-NTA konjugáty	
blokovací pufr	3% BSA (bovine serum albumun) v 1x TBS
protilátky	Ni-NTA konjugaty: TBST; ředění 1:1000
1x TBS	10mM Tris-Cl, 150mM NaCl; pH 7.5
1x TBS-Tween	20mM Tris-Cl, 500mM NaCl, 0,05% Tween; pH 7.5
10x Tris-saline	9% (w/v) NaCl v 1M Tris-Cl; pH 8.0
barvicí roztok (HPR)	18mg 4 chloro-1-naftol, 6 ml methanolu, 24ml 1x Tris-saline, 60 μ l 30% H ₂ O ₂
Izolace rekombinantního proteinu	
v rozpustné formě :	
lyzační pufr	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM imidazol; pH 8,0
TPI :	
IEF pufr	7 M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 1% dithiotreitol
Purifikace	
Nativní :	
Ni-NTA agarosa	'nickel-charged resin'
lyzační pufr	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM imidazol; pH 8.0
promývací pufr	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 20mM imidazol; pH 8.0
eluční pufr	50mM NaH ₂ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM imidazol; pH 8.0
Denaturační :	
promývací roztok I	8M urea, 0.1M NaH ₂ PO ₄ , 0.01M Tris; pH 8.0

promývací roztok II	4M urea, 0.1M NaH ₂ PO ₄ , 0.01M Tris; pH 6.0
promývací roztok III	2M urea, 0.1M NaH ₂ PO ₄ , 0.01M Tris; pH 5.3
eluční pufr	0.5M imidazol

3..2. Metody

3.2.1. Izolace RNA

Pro izolaci RNA byla použita nasátá neinfikovaná klíšťata *Ixodes ricinus*.

Klíšťata byla homogenizována ve sterilní zkumavce v Trizol[®] Reagent (Invitrogen) v poměru 1 ml roztoku na 100 mg tkáně.

Pro izolaci RNA byl použit 1 ml homogenátu, který byl přenesen do 1.5 ml zkumavky a centrifugován (13 000 rpm, 20 min, 4°C). Supernatant byl přenesen do čisté 1.5 ml zkumavky a ponechán po dobu 5 min při pokojové teplotě. Po inkubaci při pokojové teplotě bylo k vzorku přidáno 0.2 ml chloroformu na 1 ml Trizolu. Vzorek byl protřepán (15 sekund) a opět ponechán při pokojové teplotě po dobu 3 minut. Následovala centrifugace (12 000 rpm, 15 min, 4°C) a odebrání vodní fáze (opatrně, aby nebyla odebrána i vysrážena DNA). Bylo přidáno 500 µl isopropanolu (k supernatantu) a vzorek byl protřepán. Po 10 minutové inkubaci při pokojové teplotě byl vzorek stočen (12 000 rpm, 10 min, 4°C). Supernatant byl odstraněn a pelet promyt 1 ml 75% ethanolu. Po následující centrifugaci byl pelet vysušen (15 minut při pokojové teplotě) a poté rozpuštěn ve 100 µl sterilní vody (bez RNáz).

Výsledky izolace RNA byly zhodnoceny na elektroforéze v 1.2% agarózovém gelu v 1x TBE pufru.

Měření koncentrace izolované RNA bylo provedeno v tenkostěnných kyvetách (UVette[®] 220-1 600 nm; Eppendorf) na přístroji BioPhotometer při vlnové délce 260 nm.

3.2.2. Syntéza jednovláknové cDNA (ss cDNA –‘single strand DNA’)

Požadovaná cDNA byla syntetizována ve dvou krocích pomocí kitu ‘Enhanced Avian HS RT-PCR kit’ (Sigma). První reakce obsahovala 6 µl H₂O, 2 µl RNA templátu, 1 µl Anchored oligo (dT)₂₃ a 1 µl ‘deoxynucleotide mix’ (dNTP mix). Vzorek byl denaturován 10 minut na 70 °C (pro zefektivnění reversní transkripce). K reakci bylo přidáno 6 µl H₂O, 1 µl RNase inhibitoru, 2 µl 10x pufru pro AMV-RT a 1 µl ‘Enhanced avian RT-enzym’ a jemně promícháno. Syntéza ss cDNA proběhla při 45 °C po dobu 50min.

Koncentrace syntetizované ss cDNA byla změřena v tenkostěnných kyvetách (UVette® 220-1 600nm; Eppendorf) na přístroji BioPhotometer při vlnové délce 260 nm.

3.2.3. PCR ('Polymerase Chain Reaction')

Pro amplifikaci specifického úseku z izolované DNA byly použity specifické primery (viz. 3.1.1.) pro gen *ricinusin*, které byly navrženy dle sekvence pro *ricinusin* u *I. ricinus* přístupné v databázi GenBank™ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, kód genové sekvence DQ266374)

Byla použita negativní kontrola pro ověření možné přítomnosti kontaminace.

Reakční směs obsahovala:

10 x PCR pufr	2 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
1 mM primer Forward.....	1 µl
1 mM primer Reverse	1 µl
10 mM dNTPs.....	1 µl
Tag DNA polymeráza	0.5 µl
templát.....	0.2-1 µl (120 – 150ng/ml)

Zbývající objem byl doplněn sterilní deionizovanou vodou do 20µl.

Amplifikace byla provedena v 0.2 ml tenkostěnné zkumavce, v přístroji Mastercycler (Eppendorf).

Program pro PCR:

1. Denaturace DNA.....96°C5 min
2. 35 cyklů:
 - denaturace DNA.....95°C30 s
 - nasedání primerů.....52°C30 s
 - syntéza.....72°C1 min (u genomové DNA 2 min)
3. Teplota ponechána při 4°C

Před zaklonováním produktu do vektoru byla provedena PCR, u níž byl přidán ještě jeden krok 'final extension'. Tento krok byl proveden po 35. cyklu při teplotě 72°C po dobu 20 minut.

3.2.4. Elektroforéza

K 20 µl reakce byly přidány 4 µl vzorkového pufru obsahujícího SYBR Green. Vzorky byly analyzovány na 1% agarózovém gelu v 1x TAE pufru. Elektroforéza byla prováděna na aparatuře HU13 (SCIE-PLAS) při napětí 100 V přibližně 20 – 30 minut. Výsledek byl kontrolován pod UV světlem a fotograficky zaznamenán.

3.2.5. Purifikace PCR produktu

Izolace PCR produktu vyříznutého z gelu byla provedena pomocí kitu 'QIAquick[®] Gel Extraction kit' (Quiagen).

PCR produkt byl vyříznut z agarózového gelu a zvážen. Do zkumavky byl přidán pufr QG v poměru 3 díly pufru (µl) na 1 díl gelu (100 mg ~ 100 µl). Vzorky byly inkubovány při 50 °C po dobu 10 minut za průběžného promíchávání (po 2 - 3 minutách), dokud se gel nerozpustil. Po rozpuštění, byl ke gelu přidán 1x objem isopropanolu a směs byla důkladně promíchána. Pro navázání DNA byly vzorky naneseny na kolonku 'QIAquick', která byla vložena do 2 ml sběrné zkumavky. Následovala centrifugace při 10 000 rpm 1 minutu. 'Flow-through' byl odstraněn a na kolonku bylo naneseno 500 µl pufru QG pro odstranění zbylých stop agarózy. Vzorky byly opět centrifugovány (10 000 rpm, 1 min). K promytí kolonky bylo přidáno 750 µl PE pufru a zkumavky byly stočeny (10 000 rpm, 1 min). Tenhle krok byl zopakován pro odstranění zbytků etanolu z kolonky. Kolonka byla přenesena do čisté 1.5 ml zkumavky a DNA byla eluována 30 µl H₂O. Po inkubaci 1 minutu při pokojové teplotě byla DNA stočena (10 000 rpm, 1 min).

3.2.6. Klonování PCR produktu do vektoru pCR[®] 4-TOPO

Purifikovaný PCR produkt byl ligován do vektoru pCR[®] 4-TOPO[®] Vector (Invitrogen). K ligační reakci byly použity 4 µl PCR produktu (maximální množství doporučené výrobcem), 1 µl salt solution a 1 µl vektoru. Ligační směs byla po dobu 20 – 25 minut inkubována při pokojové teplotě a následně přenesena na led.

3.2.7. Transformace ‘One Shot[®] TOP10 *E. coli* Competent Cells’

Kompetentní buňky One Shot[®] TOP10 *E. coli* (chemically competent, Invitrogen) byly skladovány při -70 °C. Po pozvolném rozmrazení na ledu byly k buňkám přidány 2 µl ligační směsi (viz. 3.2.7.). Směs byla jemně promíchána a inkubována 30 minut na ledě. Následoval tepelný šok (42 °C, 30s), při kterém se vektor dostal přes plasmatickou membránu do buňky. Po ochlazení na ledě bylo při sterilních podmínkách k buňkám přidáno 250 µl SOC media. Buňky byly kultivovány 1 hodinu na třepačce při 37 °C. Po kultivaci byla transformační směs rozetřena na Petriho misky s agarem (LB/agar s ampicilinem – 50 µg/ml). Pro získání jednotlivých kolonií byla použita různá ředění transformační reakce (100 µl a 200 µl/misku). Misky byly inkubovány při 37 °C přes noc.

Jednotlivé kolonie byly přeočkovány do LB média s ampicilinem (50 µg/ml) a kultivovány přes noc za stálého třepání při 37 °C. Po stočení (5 000x g, 4 °C, 15min) byla z buněčného peletu izolovaná plazmidová DNA.

3.2.8. Izolace plazmidové DNA

Plazmidová DNA byla izolována z peletu transformovaných buněk (viz. 3.2.7.) pomocí kitu ‘QIAprep[®] Spin Miniprep’ (Qiagen) (později byl používán kit ‘GenElute Plasmid Mini-Prep’ (Sigma)

a) ‘QIAprep[®] Spin Miniprep kit’ (Qiagen)

Buněčný pelet byl resuspendován ve 250 µl pufru P1 a směs byla přenesena do nové zkumavky (1.5 ml). Následně bylo přidáno 250 µl lyzačního pufru P2 a vše bylo smícháno jemným protřepáním (4-6x). Po následujícím přidání 350 µl neutralizačního pufru N3 byl obsah opět jemně protřepán (4-6x). Směs byla stočena (13 200 rpm, 10 min), supernatant byl přenesen na QIAprep kolonku a rychle stočen (30 - 60s) opět. Kolonka bylo promyta 750 µl pufru PE (s přidaným ethanolem) a opět stočena (30 - 60 s). Pro odstranění zbylého pufru na kolonce byla centrifugace opakována. K eluci plazmidové DNA byla kolonka přenesena do čisté 1.5 ml zkumavky a bylo přidáno 50 µl deionizované H₂O do středu membrány. Zkumavka byla ponechána po dobu 1 minuty při pokojové teplotě a následně centrifugována (13 200 rpm, 1 min).

Izolovaná plazmidová DNA byla uschována při -20 °C nebo ihned zpracována.

b) ‘GeneElute Plasmid Mini-Prep Kit’ (Sigma)

Buněčný pelet byl resuspendován v 200 μ l ‘resuspend solution’, přenesen do čisté 1.5 ml zkumavky a bylo k němu přidáno 200 μ l ‘lysis solution’. Vše bylo jemně smícháno a ponecháno chvíli stát. Po přidání 350 μ l ‘neutralization solution’ byl vzorek stočen (13 200 rpm, 10 min). Supernatant byl přenesen na ‘Mini Spin’ kolonku a centrifugován (13 200 rpm, 1 min). Kolonka byla promyta 750 μ l ‘wash solution’ a centrifugována (13 200 rpm, 1 min). Po odstranění obsahu sběrné zkumavky se centrifugace (13 200 rpm, 2 min) opakovala pro odstranění zbylého pufru na kolonce. K eluci plazmidové DNA bylo do středu kolonky nanášeno 100 μ l deionizované H₂O a zkumavky byly stočeny (13 200 rpm, 1 min).

Izolovaná plazmidová DNA byla uschována při -20 °C nebo ihned zpracována.

3.2.9. Ověření přítomnosti inzertu v plasmidu

K ověření přítomnosti inzertu ve vektoru byla použita metoda PCR (viz. 3.2.3.) se specifickými primery pro *ricinusin* (RicinusinForw a RicinusinRev) a vektor-specifickými primery M13-Forw a M13-Rev. Produkty PCR byly analyzovány na 1 % agarozovém gelu v TAE pufru a vizualizované pod UV světlem. Vzorky, ve kterých byla prokázána přítomnost inzertu v plasmidu, byly sekvenovány.

3.2.10. Sekvenování

K sekvenování byly použity plazmidy s prokázaným zaklonovaným inzertem (viz. 3.2.9.). Reakce obsahovala 30 ng plazmidové DNA a 3.2 pmol primerů (M13-Forw; M13-Rev). Vzorky byly sekvenovány v servisní laboratoři PRF JU a BC AVČR v Českých Budějovicích na sekvenátoru ABI 3130 (Applied Biosystems) za použití sekvenačního kitu ‘Big Dye[®] Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit’ (Applied Biosystems).

3.2.11. Příprava rekombinantního proteinu v expresním vektoru Champion[™] pET 100/D-TOPO[®]

Rekombinantní proteiny byly připraveny v bakteriálním systému za použití ‘Champion[™] pET Directional TOPO[®] Expression Kitu’ (Invitrogen). PCR produkty byly připraveny pomocí specifických primerů a to tak, že k 5’ konci forward primeru

(tj. před ATG kodon) byl přidán CACC fragment pro správnou orientaci produktu ve vektoru, 3' konec reverse primeru obsahoval stop kodon. Amplifikace PCR produktů proběhla podle již uvedeného schématu (viz. 3.2.3.).

Pro zaklonování inzertu do expresního plazmidu byly použity 4 μ l PCR produktu (maximální koncentrace doporučovaná výrobcem), 1 μ l salt solution a 1 μ l TOPO[®] vektoru. Ligační směs byla po dobu 20 – 25 minut inkubována při pokojové teplotě a následně byla ponechána na ledu.

Po zaklonování inzertu do expresního plazmidu a následné transformaci One Shot[®] TOP10 *E. coli* kompetentních buněk, byly pomocí sekvenování vybrány rekombinanty obsahující inzert ve správním čtecím rámci.

3.2.12. Transformace BL21 Star[™] (DE3) One Shot[®] Cells

Pro zjištění správného čtecího rámce byly nejdříve vektory obsahující inzert osekvenovány (viz. 3.2.10.; primery T7-Forw, T7-Rev). Vektor obsahující inzert ve správném čtecím rámci byl použit pro transformaci expresních kompetentních buněk BL21 Star[™] (DE3) One Shot[®] Cells (Invitrogen) podle doporučení výrobce (viz. 3.2.7).

3.2.13. Expese rekombinantního proteinu – pilotní expese

Narostlá kultura BL21 Star[™] (DE3) One Shot[®] Cells (viz. 3.2.12.) byla naředěna čerstvým LB médiem s ampicilinem (50 μ g/ml) a to v poměru 1:20. Po 3 hodinové inkubaci na třepačce při 37 °C bylo odebráno 500 μ l kultury ('zero time sample' – kontrolní vzorek bakteriálních proteinů) a přidáno IPTG (o konečné koncentraci 0.5 mM) pro indukci expese. Expese probíhala 6 hodin. Každou hodinu bylo odebráno 500 μ l kultury. Vzorky byly centrifugovány (2 100x g, 15 min, 4 °C) a získaný pelet byl zmražen při – 20 °C. Kontrola expese rekombinantního proteinu byla poté provedena u všech sedmi získaných vzorků pomocí SDS-PAGE.

3.2.14. SDS-PAGE – Kontrola expese rekombinantního proteinu

Elektroforetická analýza proteinu byla vedena dle standartních postupů⁴⁹. SDS-PAGE probíhala na aparatuře Hoefer SE 250 (Hoefer Scientific Instruments-Amersham Biosciences) při napětí 130 V v *E* pufru přibližně 1,5 hodiny.

a) příprava gelu:

Rozdělovací gel (17.5 %)	množství (ml)	Zaostřovací gel (4%)	množství (ml)
Destilovaná deionizovaná voda	2.975	Destilovaná deionizovaná voda	1.590
40% Akrylamid/ Bis-akrylamid	4.375	40% Akrylamid/ Bis-akrylamid	0.250
1.5 M Tris-HCL, pH 8.8	2.500	0.5 M Tris-HCL, pH 6.8	0.630
10% SDS	0.100	10% SDS	0.250
10% APS	0.050	10% APS	0.125
TEMED	0.005	TEMED	0.002

b) příprava vzorků:

Buněčný pelet z pilotní exprese (vzorky 0 – 6 od indukce exprese) byl resuspendován v 50 µl TE pufru (pH 8.0). Bylo odebráno 20 µl a smícháno s redukujícím vzorkovým pufrům obsahujícím dithiothreitol (DTT). Následně byly vzorky 10 minut povařeny, umístěny na led a při maximálních otáčkách stočeny. Supernatant byl nanesen na SDS-PAGE gel.

c) barvení gelu:

Po skončení elektroforézy byl gel 3x promyt v 100 ml destilované vody a dobarven v PageBlueTM (Fermentas) přes noc. Po promytí ve vodě byl výsledek fotograficky zdokumentován.

3.2.15. Izolace rekombinantního proteinu

a) v rozpustné formě

Buněčný pelet byl resuspendován v lyzačním pufru v poměru 2 - 5 ml na gram mokré váhy a byl přidán lysozym (1mg/ml resuspendovaných buněk). Následovala inkubace na ledě po dobu 30 minut a sonikace na ledě 6x 10 sekund (20 kHz; Bandelin Sonoplus). Po centrifugaci (10 400 rpm, 30min, 4°C) bylo 20 µl supernatantu uschováno pro kontrolu pomocí SDS-PAGE (lyzát), zbylé množství bylo použito pro nativní purifikaci proteinu.

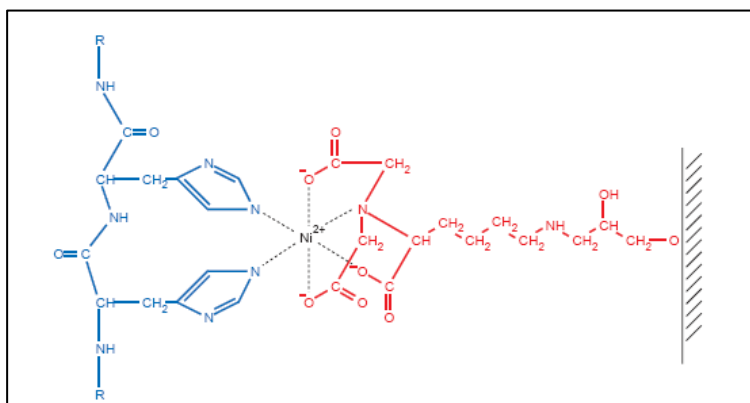
b) TPI ('Total Protein Isolation')

Rekombinantní protein byl izolován pomocí metody Total Protein Isolation⁵⁰.

Resuspendovaný buněčný pelet v IEF pufru v poměru 10 objemů pufru na 1 objem peletu byl nejdříve sonikován na ledě (6x 10 sekund; 200W; Bandelin Sonoplus) a inkubován na třepačce při pokojové teplotě 1 hodinu. Vzorky byly stočeny (12 000x g, 10 min), supernatant byl přenesen do čisté zkumavky a 9 objemů acetonu bylo přidáno pro vysrážení proteinů (vortexování po dobu 2 minut). Vysrážené proteiny v podobě bílých vloček byly stočeny, aceton byl odsán a proteiny byly resuspendovány v IEF pufru (objem odpovídal objemu buněčného peletu na začátku). Část resuspendovaných proteinů (20 μ l) byla ponechána pro kontrolu pomocí SDS-PAGE, zbylá část byla využita pro purifikaci proteinu za denaturačních podmínek.

3.2.16. Purifikace rekombinantního proteinu

Rekombinantní proteiny připravené v ChampionTM pET 100/D-TOPO[®] expresním systému obsahují na svém N-konci 6 histidinů (His-Tag kotva) o velikosti 3 kDa. His-Tag kotva má vysokou afinitu k Ni^{2+} iontům (viz. obr.1.), což je využíváno v metalové afinitní chromatografii na agarózové koloně s navázaným Ni^{2+} .



Obr.1. Interakce histidinu s Ni^{2+} iontem navázaným na NTA (nitrilotrioctová kyselina) matrix.

a) nativní purifikace

Pro nativní purifikaci byly použity proteiny izolované v rozpustné formě (viz. 3.2.15.a)

Před purifikací byla kolonka ekvilibrována 2 ml lyzačního pufru – roztokem, ve kterém byly proteiny rozpuštěny a následně naneseny na kolonku. Do kolonky s 1 ml Ni-NTA agarózou (Qiagen) byly přidány 4 ml lyzovaných buněk. Následovala inkubace za mírného třepání po dobu 1 hodiny při 4°C za účelem navázání fúzních proteinů na kolonku. Po odebrání první frakce ‘flow-through’ byla kolonka dvakrát

promyta 4 ml promývacího pufru a byly získány další dvě frakce ‘wash 1’ a ‘wash 2’. Nakonec byl cílový protein eluován 4x 0.5 ml elučního pufru (‘eluate 1-4’).

Frakce byly následně kontrolovány pomocí SDS-PAGE (viz. 3.2.14).

b) denaturační purifikace

Proteiny izolované pomocí metody TPI (viz. 3.2.15b) byly přes noc dialyzovány (dialyzační střívko SPECTRA/POR 4; Sigma) v 1x PBS.

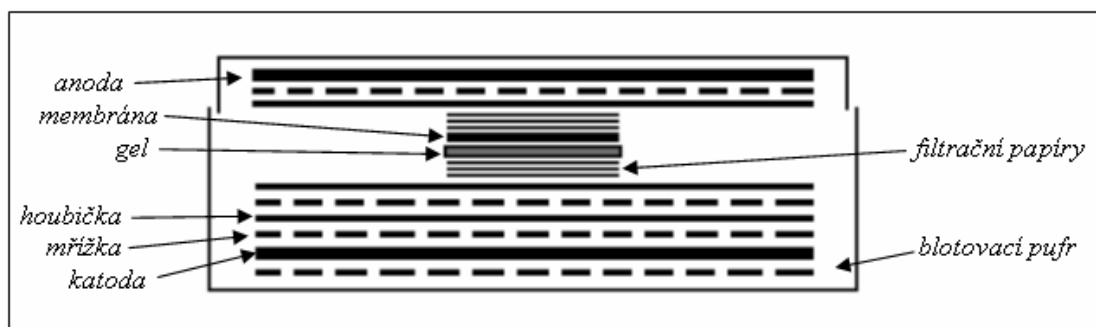
Před purifikací byla Ni-NTA agaróza (Qiagen) ekvilibrována roztokem, ve kterém byly proteiny rozpuštěny a následně naneseny na kolonku (10 ml 1x PBS). Po přidání izolovaných proteinů následovala inkubace po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě za mírného třepání pro navázání fúzních proteinů na kolonku. Následně byla kolonka promývána 20 ml tří pufrů se snižující se koncentrací močoviny (8 M – 2 M) a s klesajícím pH (pH 8 – 5.3). Pomocí těchto pufrů byly odstraněny bakteriální, nespecificky se vázající, proteiny. Cílový rekombinantní protein byl nakonec eluován pomocí elučního pufru (20 ml). Při každé frakci byl odebrán vzorek pro kontrolu pomocí SDS-PAGE (viz. 3.2.14.).

3.2.17. Western blotting – přenos proteinů

Vzorky rozdělené na SDS-PAGE byly přeneseny na PVDF (polyvinylidenfluorid) membránu (Millipore, 0.45 μ m) technikou ‘Western Blotting’ podle Towbina a kol.⁵¹.

a) sestavení blotovací aparatury

Blotovací sendvič byl sestaven následujícím postupem (viz. obr.2.) dle pokynů výrobce.



obr.2.: sestavení blotovacího sendviče

b) přenos proteinů

Přenos proteinů separovaných v SDS-PAGE probíhal za konstantního proudu 250 mA po dobu 1.5 hodiny v blotovacím pufru na blotovacím zařízení (Idea Scientific Company – USA).

c) hybridizace – imunodetekce rekombinantního proteinu

Pro zjištění přítomnosti rekombinantního proteinu ve vzorcích byla provedena imunodetekce za pomoci Ni-NTA HRP (horseradish peroxidase) konjugátů (Qiagen), které se váží na histidinovou kotvu na N- konci rekombinantního proteinu.

Membrána s navázanými proteiny byla 2x promyta v TBS po dobu 10 minut, blokována nejméně 1 hodinu v 3% BSA v TBS a promyta 3x 10 minut TBST. Po dobu 1 hodiny membrána byla inkubována s Ni-NTA HRP konjugáty a opět promyta 3x 10 minut v TBST.

Chromogenní reakce byla provedena v substrátovém roztoku s 4-chloro-1-naftolem a zastavena promytím v destilované vodě.

3.2.18. Izolace genomové DNA

Pro izolaci genomové DNA bylo klíště nakrájené na malé kousky. Ke vzorku bylo přidáno 180 µl lyzačního pufru (ATL; ‘DNeasy[®] Tissue Kit’ Qiagen) spolu s 20 µl proteinázy K (‘DNeasy[®] Tissue Kit’ Qiagen). Vše bylo smícháno a ponecháno přes noc při 55°C za občasného vortexování během inkubace. Poté byla reakce přenesena na led (5 minut). Po následné centrifugaci (13 000 rpm, 5 minut) byl supernatant přenesen do čisté mikrozkušavky (1.5 ml; Eppendorf). Objem byl doveden do 600 µl deionizovanou vodou a bylo přidáno i stejné množství fenolu. Reakce byla po dobu 5 minut jemně promíchávána. Centrifugací (13 000 rpm, 5 minut) se ve zkumavce vytvořily dvě fáze, z nichž ta vrchní byla přenesena do čisté mikrozkušavky a byl k ní přidán stejný objem fenolu. Před centrifugací (13 000 rpm, 5 minut) byl vzorek jemně promícháván (5 minut). Spodní (vodní) fáze byla pročišťována fenolem tak dlouho, dokud nebylo rozhraní mezi fázemi čiré. Poté byl přidán fenol s chloroformem (1:1) v objemu odpovídajícímu vodní fázi. Reakce byla smíchána a centrifugována (13 000 rpm, 5 minut). Vzniklá vrchní fáze byla smíchána s čistým chloroformem (1:1). Vše bylo smícháno a centrifugováno stejně jak již bylo uvedeno. Vrchní fáze

byla poté odebrána a přenesena do nové zkumavky (1.5ml; Eppendorf), kde byla smíchána s etanolem (96%, pokojová teplota) v poměru 1:3. Reakce byla po dobu 3 hodin inkubována při teplotě - 20 °C. Poté byla zkumavka centrifugována při 4 °C (14 000 rpm, 15 minut). Supernatant byl odsát a pelet byl promýván v 1 ml etanolu (70%). Následovala centrifugace (14 000 rpm, 15 minut, 4°C). Vzniklý pelet byl vysušen při pokojové teplotě po dobu 30 minut a rozpuštěn v 50 µl deionizované vody. Izolovaná genomová DNA byla uchována při - 20° C pro další použití.

Výsledky izolace genomové DNA byly zhodnoceny na elektroforéze v 1 % agarózovém gelu v 1x TAE pufu.

4. VÝSLEDKY

4.1. Izolace RNA a syntéza ss cDNA

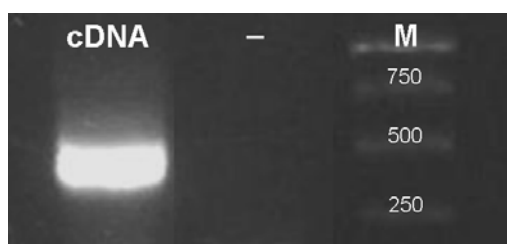
Celková RNA byla izolovaná z nasátých neinfikovaných klíšťat. Jednořetězcová cDNA byla syntetizována z izolované RNA pomocí anchored oligo (dT)₂₃ primerů (tab.1).

vzorek	RNA (µg/ml)	ss cDNA (µg/ml) ředění 1:10 (ss cDNA:dH ₂ O)
1.	438	728,3
2.	375	635,4

Tab.4.:Koncentrace izolovaných RNA a z nich syntetizovaných ss cDNA

4.2. PCR

Pomocí metody PCR se specifickými primery RicinusinForw a RicinusinRev byl z cDNA prvního vzorku získán celý gen pro *ricinusin* (obr.3.). Velikost genu je 405 bp. Amplikon byl zaklonován do vektoru pCR[®] 4-TOPO. Po transformaci kompetentních buněk (One Shot TOP10 *E.coli* Chemically Competent) byly vybrány kolonie (6 kolonií), z nichž byla izolována plazmidová DNA. Metodou PCR s primery M13-Forw a M13-Rev na plazmidu byla ověřena přítomnost inzertu. Plasmidy s inzertem byly osekvenovány. Získaná sekvence byla ověřena (<http://www.NCBI.nlm.nih.gov/BLAST> - metodou “nucleotide BLAST”). Homologie (identita: 98 %) se sekvencí *ricinusinu* opublikované v GenBank (DQ266374) prokázala, že se jedná o správný gen. Srovnání proteinových sekvencí (metoda “protein BLAST”) shodu obou sekvencí potvrdilo.



Obr.3. Produkt PCR se specifickými primery (*RicinusinForw* a *RicinusinRev*):

cDNA – získaný gen pro *ricinusin* (405bp)

M – DNA marker

- – negativní kontrola

Na obr.4. je uvedena nukleotidová sekvence i s přeloženou aminokyselinovou sekvencí. Molekulová hmotnost, bez posttranslačních úprav (tj. glykosylace, fosforylace, atd.), je 14 523.5 Da. Protein se skládá ze 135 aminokyselin, z toho 46 je hydrofóbního charakteru (A, I, L, F, W, V) a 36 aminokyselin je polárních (N, C, Q, S,

T, Y). Izoelektrický bod (pI) tohoto proteinu je 5.004. Celkový náboj při pH 7 je negativní.

Pomocí programu SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) bylo určeno místo odštěpení signální sekvence mezi 19. a 20. aminokyselinou.

U aminokyselinové sekvence byly také zjištěny pravděpodobné posttranslační modifikace. Programem NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) nebylo zjištěno žádné místo N-glykosylace. Čtyři threoniny (v polohách 36, 34, 110 a 120) byly v programu NetOglyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOglyc/>) označeny jako potenciální místa O-glykosylace. Byly také určeny fosforylační místa (6 serinů a 3 threoniny) pomocí programu NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) (*obr.4.*).

1	ATGAAGTGCAGCGTGTGCCTCCTGGTTCTCTGCTCTCTCGCACTCTTCGTT
1	M K C S V C L L V L C S L A L F V
52	TCCGCCGAGGAAGCCCATGGAGCCCATGAAGCCCACGAAGCCCCGGTCGCC
18	S A E E A H G A H E A H E A P V A
103	CCGACTCCGACTCAGAGTCCCTACTGCCATCTTGATGACGCACATCTGACC
35	P T P T Q S P Y C H L D D A H L T
154	GCCCTGACAGAATGCGTTGGCCGAGGAATGACCGAGGCGCTGAGAACGAAA
52	A L T E C V G R G M T E A L R T K
205	CTGCAAGCTGTCAACCACCAGCCTTAGCTGTGAGAACATGGTGTGCACATTG
69	L Q A V T T S L S C E N M V C T L
256	AGGAAACTGTGTGAGCAAGAACC GTTGAGCACTGTCAGTGTCTTCAACGAG
86	R K L C E Q E P L S T V S V F N E
307	GAAGAAATAGATGAATTCCGAACTCTCGGCGCCGGATGCCGCAGCCCTGCT
103	E E I D E F R T L G A G C R S P A
358	ACTGCCACCCCTGAAGAGGCCACCCTGAAGCGGCCACCATGATGCG
120	T A H P E E A H P E A A H H D A

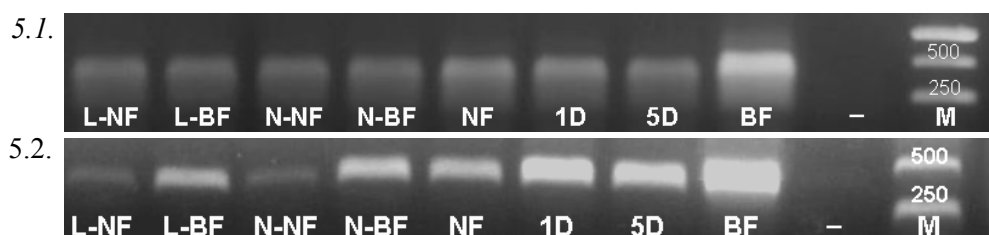
Obr.4. Nukleotidová sekvence genu pro ricinusin a její překlad do peptidové sekvence:

- signální sekvence
- fosforylace
- O- glykosylace

4.3. Diferenciální exprese genu pro ricinusin

4.3.1. Diferenciální exprese genu pro ricinusin u jednotlivých vývojových stádií klíštěte *I. ricinus*

Pro určení exprese genu byla získána RNA ze všech tří vývojových stádií (tj. z nymfy, larvy a dospělé) klíštěte *I. ricinus*, která byla různě nasátá. Následně byla z RNA syntetizovaná cDNA. U jednotlivých vzorků byla koncentrace cDNA dovedena na stejnou hodnotu. Metodou PCR pak byla zkoumána míra exprese. Výsledky (obr.5.) ukázaly, že *ricinusin* se nachází ve všech vývojových stádiích klíštěte *I. ricinus*. Bylo prokázáno, že exprese se liší u jednotlivých stádií podle toho, jestli bylo klíště nasáté nebo ne, což znamená, že exprese genu pro *ricinusin* je indukována sáním klíštěte na hostiteli. Největší míra exprese byla zaznamenána u plně nasáté samičky, zatímco nejnižší u nenasáté larvy a nymfy (obr.5.).



Obr.5. Diferenciální exprese genu pro ricinusin u různě nasátých vývojových stádií klíštěte *I. ricinus*:

5.1. pozitivní kontrola exprese (primery ACTIN-Forw a ACTIN-Rev)

5.2. exprese genu pro ricinusin v orgánech (primery RicinusinForw a RicinusinRev)

L-NF – nenasátá larva

L-BF – plně nasátá larva

N-NF – nenasátá nymfa

N-BF – plně nasátá nymfa

NF – nenasátá samička

1D – 1 den nasátá samička

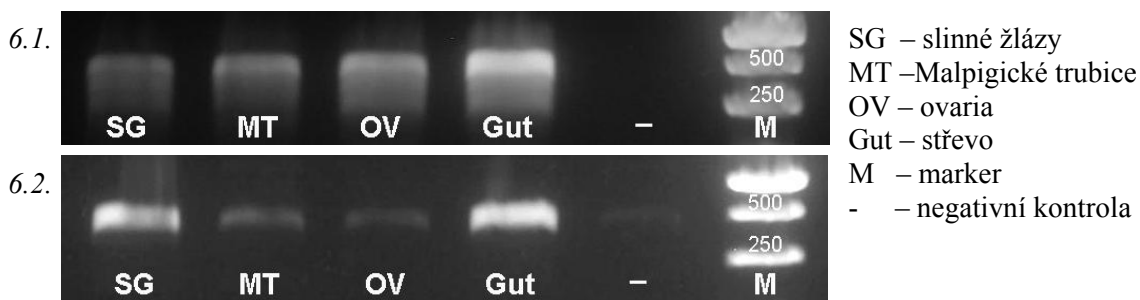
5D – 5 dnů nasátá samička

BF – plně nasátá samička

M - marker

4.3.2. Diferenciální exprese genu pro ricinusin v různých tkáních

Pro zjištění diferenciální exprese genu pro *ricinusin* v různých tkáních byla izolovaná RNA ze slinných žláz (SG), Malpigické trubice (MT), ovarii (OV) a střeva (Gut). Podobně jako u zkoumání exprese u vývojových stádií byla syntetizována cDNA a pomocí PCR metody poté byla studována míra exprese. Výsledek ukázal (obr.6.), že *ricinusin* je přítomen ve všech vybraných tkáních. Nejsilnější exprese je patrná ve slinných žlázách a ve střevě.



Obr. 6: Diferenciální exprese genu pro ricinusin v jednotlivých tkáních:

6.1. pozitivní kontrola exprese (primery ACTIN-Forw a ACTIN-Rev)

6.2. exprese genu pro ricinusin v orgánech (primery RicinusinForw a RicinusinRev)

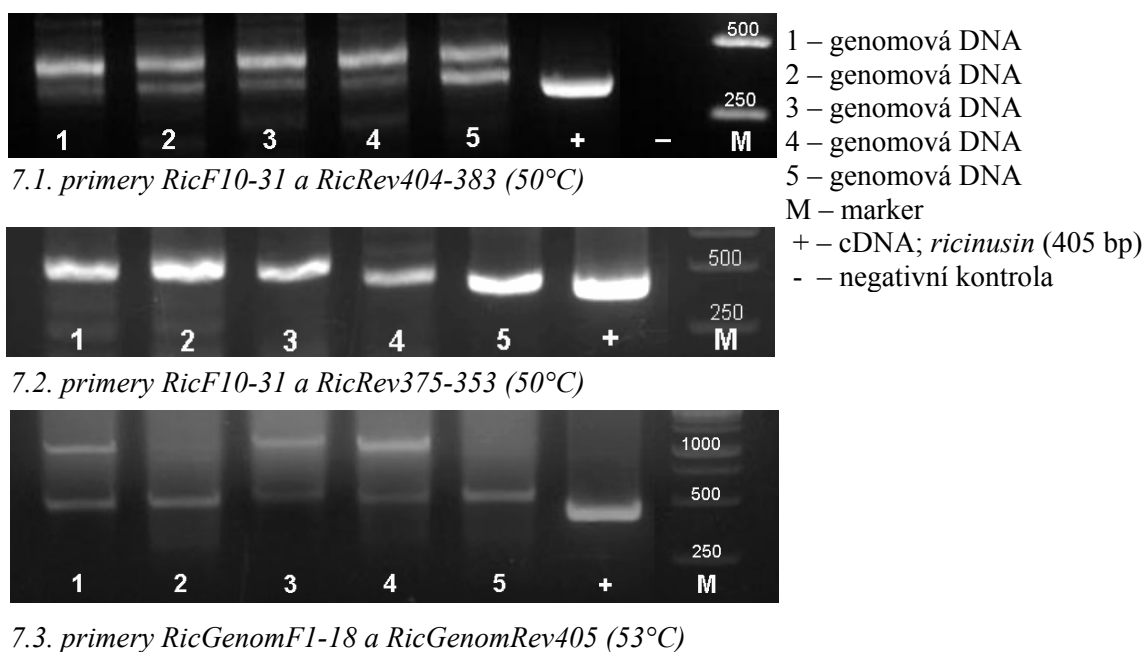
4.4. Exon-intronní struktura genu pro ricinusin

Genomová DNA, izolovaná z plně nasátých samiček, byla použita na ověření přítomnosti intronů v genu pro *ricinusin*. Pomocí metody PCR (krok 'syntéza' byl prodloužen na 2 minuty) byly vybrány vzorky, které měly větší velikost než má gen pro ricinusin nebo kde se ukázala přítomnost více PCR produktů ('proužků'). Pro transformaci byly použity kompetentní buňky One Shot TOPO10 *E.coli* (Chemically competent). Izolovaná plazmidová DNA z narostlých kolonií byla osekvenována. Sekvence byly vždy nejdříve srovnány s cDNA sekvencí *ricinusinu* pomocí programu BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> - metodou „nucleotide blast“) a poté byly v programu Genewise (<http://www.ebi.ac.uk/Wise2/index.html>) otestovány na přítomnost intronů.

Pro zkoumání genomové struktury genu pro *ricinusin* byly navrženy nové primery (RicF10-31, RicRev404-383, RicRev375-353, RicGenomF1-18, RicGenomRev405).

Nejdříve byla provedena PCR s teplotou pro nasedání primerů 50°C (primery RicF10-31, RicRev404-383, RicRev375-353) a 53°C (primery RicGenomF1-18, RicGenomRev405) (obr. 7.). U dvojice primerů RicF10-31 a RicRev375-353 výsledky ukázaly produkty o stejné velikosti jako produkt PCR na cDNA (405 bp) (obr. 7.1.). Oproti tomu, u primerů RicF10-31 a RicRev404-383 (obr. 7.2.) a také u dvojice RicGenomF1-18 a RicGenomRev405 (obr. 7.3.) byly PCR produkty i o větší velikosti (přibližně 1 000 bp). Produkty s větší velikostí byly zaklonovány, avšak získané sekvence nevykazovaly žádnou podobnost s genem pro *ricinusin*.

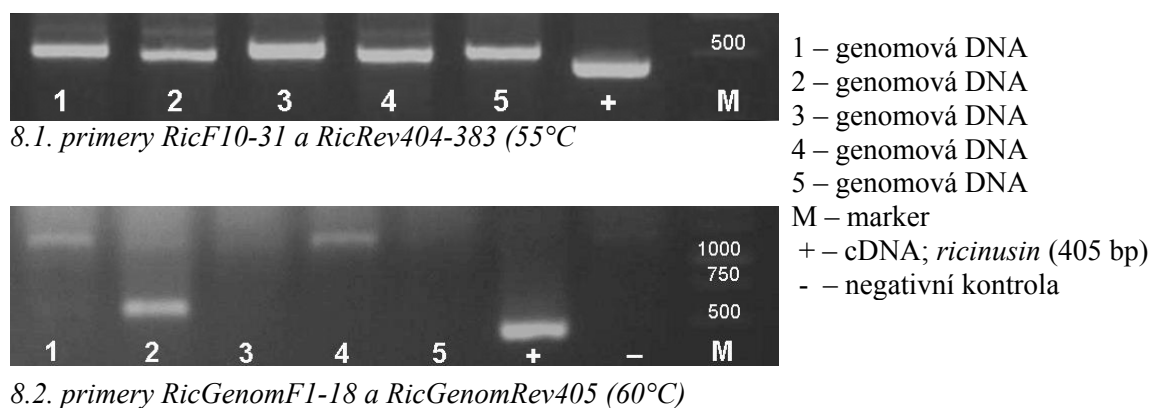
Obr.7.: Ověření přítomnosti intronů v genomové sekvenci pro gen *ricinusin* pomocí PCR:



Byla opakována PCR (obr.8.), se zvýšenou teplotou nasedání primerů, a to na 55°C u primerů RicF10-31 a RicRev404-383 a 60°C u primerů RicGenomF1-18 a RicGenomRev405. U PCR s primery RicF10-31 a RicRev404-383 vyšly produkty s velikostí shodnou s velikostí cDNA produktu pro *ricinusin* (405 bp) (obr.8.1.). Výsledkem druhé PCR (primery RicGenomF1-18 a RicGenomRev405) byly nespecifické produkty odlišné od genu pro *ricinusin* (obr.8.2.).

Pomocí PCR z různými primery bylo zjištěno ze *ricinusin*-specifickými jsou dvojice RicF10-31/ RicRev404-383 a RicinusinForw/ RicinusinRev. Sérií pokusů bylo zjištěno, že gen pro *ricinusin* je bez intronů.

Obr.8. Opakovaná PCR s navýšenou teplotou nasedání primerů:



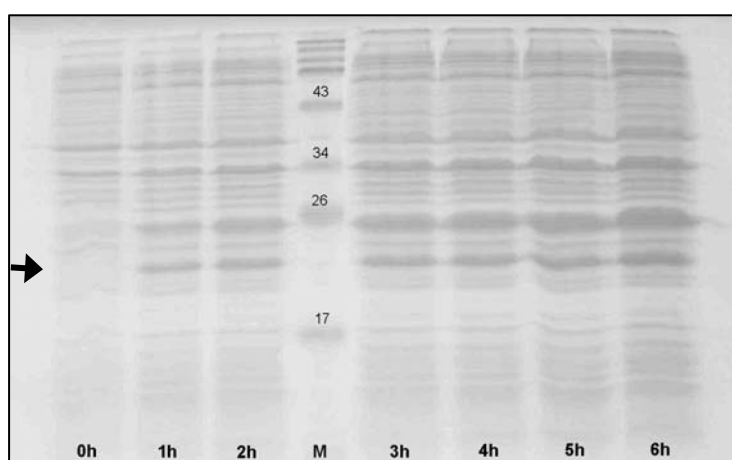
4.5. Rekombinantní protein

4.5.1. Příprava rekombinantního proteinu se signálním peptidem

Gen pro *ricinusin* obsahující signální peptid byl zaklonován do expresního vektoru Champion™ pET 100/D-TOPO®, který přidáním 6 histidinů na N-konec proteinu (His-Tag kotva) zvýšil jeho molekulovou hmotnost o 3 kDa.

Pro přípravu rekombinantního ricinusinu byl použit PCR produkt obsahující na začátku 5' konci sekvenci nukleotidů CACC důležitou pro správnou orientaci ve vektoru a na 3' konci stop kodon. Kompetentní buňky One Shot TOPO10 *E.coli* (Chemically competent) byly transformovány rekombinantními plazmidy. Z 10 vybraných individuálních kolonií byla izolovaná plazmidová DNA. Pomocí PCR byla zjištěna přítomnost inzertu (primery RicinusinForw a RicinusinRev nebo T7-Forw a T7-Rev). Plasmidy obsahující inzert byly osekvenovány pro ověření správnosti čtecího rámce.

Po transformaci expresních buněk 'BL21 Star™ One Shot® Cells' byla provedena pilotní exprese (indukce 0.5 mM IPTG). Buňky byly kultivovány 6 hodin při 37°C. Každou hodinu bylo odebráno 500 µl buněčné kultury.



Obr.9. SDS-PAGE gel (17.5%) s výsledky z pilotní exprese:

(ricinusin 18.7 kDa)

0h – kontrola

1h – hodina od začátku exprese

2h – 2 hodiny od začátku exprese

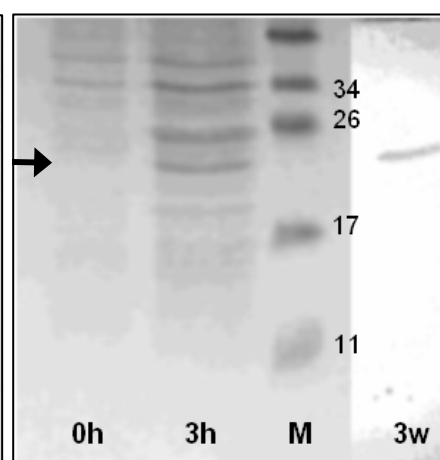
3h – 3 hodiny od začátku exprese

4h – 4 hodiny od začátku exprese

5h – 5 hodin od začátku exprese

6h – 6 hodin od začátku exprese

M – marker



Obr.10. Pilotní exprese- detekce rekombinantního proteinu ricinusinu (18.7 kDa) Ni-NTA konjugátu:

0h – kontrola

3h – 3 hodiny od začátku exprese

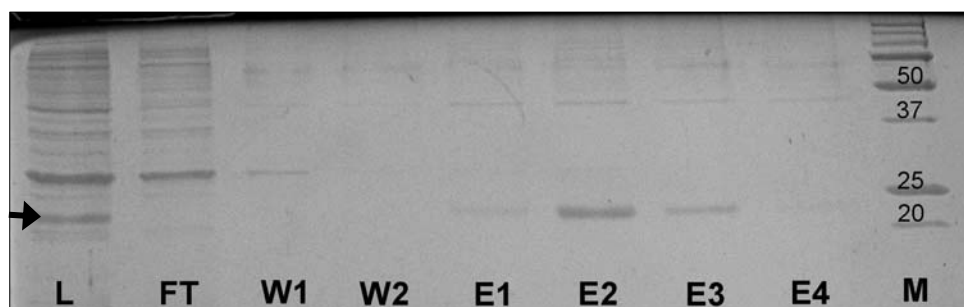
3w – detekce rekombinantního proteinu Ni-NTA konjugátu ve vzorku '3h'

Výsledky byly vyhodnoceny na SDS-PAGE gelu (*obr.9.*) a rekombinantní protein (18.7 kDa) byl detekován Ni-NTA HRP konjugáty po přenosu na membránu (*obr.10.*). Exprese je patrná již hodinu od začátku exprese a pokračuje dalších 5 hodin. Jako nejvhodnější doba exprese byla určena 3. hodina, kdy byla exprese největší, což bylo potvrzeno i pomocí Ni-NTA konjugátu.

4.5.2. Purifikace rekombinantního proteinu se signálním peptidem

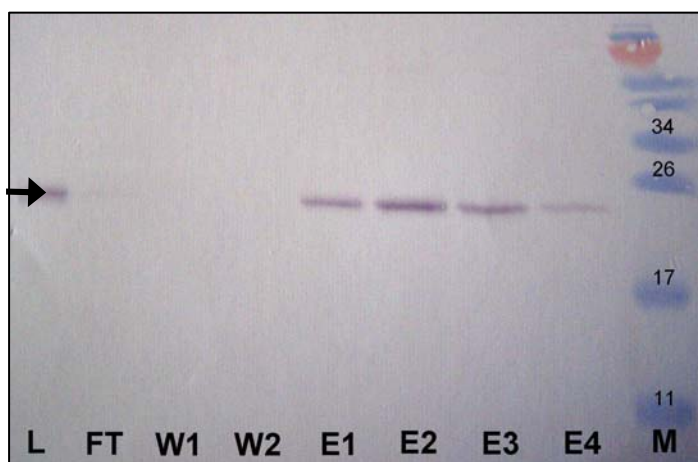
4.5.2.1. Nativní purifikace

Pro purifikaci rekombinantního ricinusinu v nativní formě byly použity totální proteiny izolované v rozpustné formě z 200 ml buněčné kultury. Po hodinové inkubaci byla Ni-NTA agarózová kolona s navázaným proteinem promyta promývacími a elučními pufry. Na *obr.11.* je SDS-PAGE gel s jednotlivými frakcemi. Rekombinantní protein byl přítomen v lyzátu a ve frakcích 'eluate 1-4'. Výsledek byl ověřen Ni-NTA konjugáty (*obr.12.*).



Obr.11. Purifikace rekombinantního proteinu ricinusinu (18.7 kDa) v nativní formě – SDS-PAGE (17%) gel:

- L – lyzát
- FT – 'flow-through' proteiny, které se nenařaly na kolonu
- W1-2 – 'wash 1-2' proteiny vymyté promývacím pufrem
- E1-4 – 'eluate 1-4' navázaný protein – rekombinantní protein ricinusin (18.7 kDa)
- M – marker

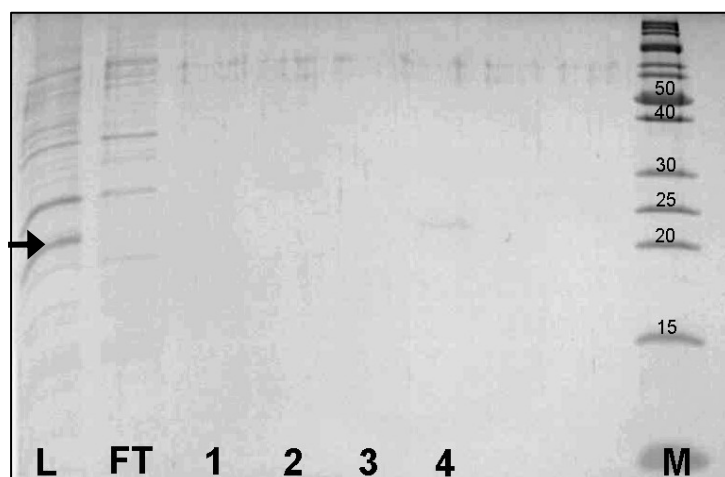


Obr.12. Detekce rekombinantního proteinu Ni-NTA konjugáty:

- L – lyzát
- FT – 'flow-through'
- W1-2 – 'wash 1-2'
- E1-4 – 'eluate 1-4'
- M – marker

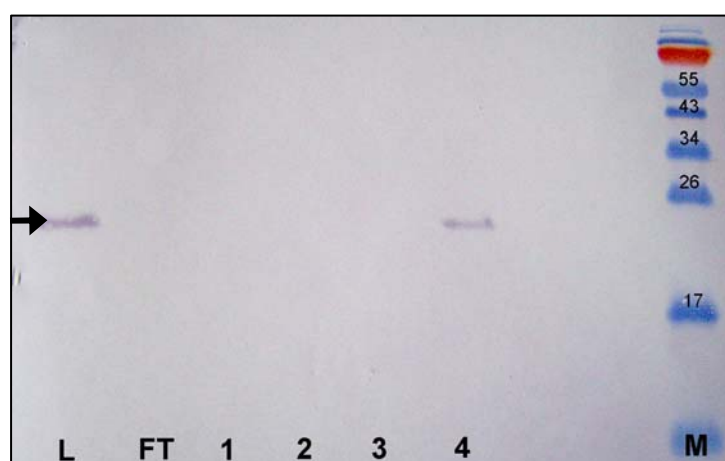
4.5.2.2. Denaturační purifikace

Pro purifikaci rekombinantního proteinu ricinusinu při denaturačních podmínkách byly použity totální proteiny izolované pomocí metody TPI ('Total Protein Isolation'). Proteiny byly přes noc dialyzovány v 1x PBS a byly nanášeny na Ni-NTA agarózovou kolonu. Po hodinové inkubaci, kdy se na agarózu navázaly fúzní proteiny s His-Tag částí, následovalo promývání nespecificky navázaných proteinů třemi promývacími puframi. Rekombinantní protein byl eluován pomocí elučního pufru. Kvůli nízké koncentraci proteinu ve vzorku byl proteinový proužek na SDS-PAGE gelu velmi slabý (*obr.13.*), avšak detekce pomocí Ni-NTA konjugátu prokázala, že se podařilo purifikovat rekombinantní protein (18.7 kDa) při denaturačních podmínkách (*obr.14.*).



Obr.13. SDS-PAGE (17%) gel – frakce odebrané během denaturační purifikace:

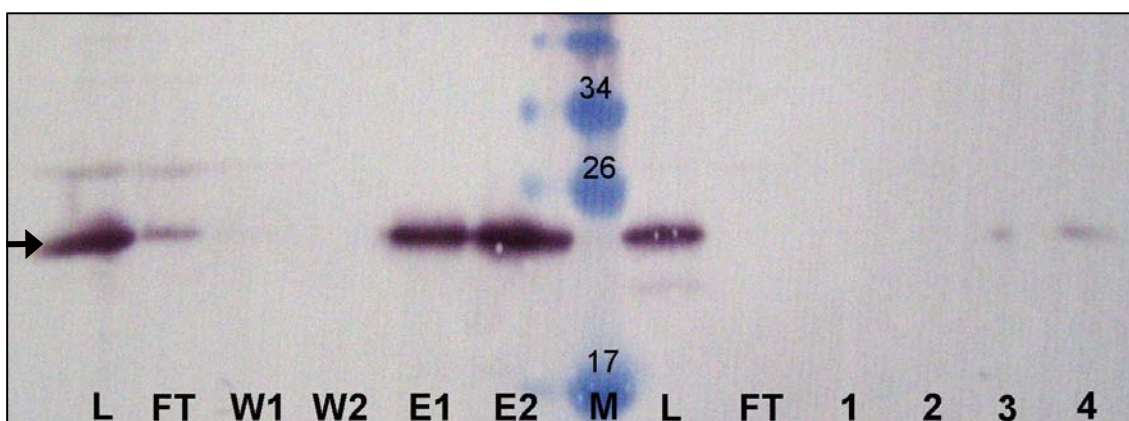
L – lysát
FT – 'flow-through'
1 – promývací pufr 1
2 – promývací pufr 2
3 – promývací pufr 3
4 – eluovaný rekombinantní protein
M – marker



Obr.14. Detekce rekombinantního proteinu (18.7 kDa) Ni-NTA konjugátu:

L – lysát
FT – 'flow-through'
1 – promývací pufr 1
2 – promývací pufr 2
3 – promývací pufr 3
4 – eluovaný rekombinantní protein
M – marker

Rekombinantní protein byl purifikován při nativních i při denaturačních podmínkách. V obou těchto případech se podařilo purifikovat rekombinantní protein o stejné velikosti 18.7 kDa (obr.15.). Rekombinantní protein byl podroben hmotnostní spektrometrické analýze a bylo prokázáno, že jeho aminokyselinová sekvence odpovídá předpovězené sekvenci genu .



Obr. 15. Detekce rekombinantního proteinu ricinusinu purifikovaného při nativních i při denaturačních podmínkách Ni-NTA konjugáty:

nativní purifikace (nalevo od markeru):

L – lyzát
 FT – ‘flow-through’
 W1-2 – ‘wash 1-2’
 E1-4 – ‘eluate 1-4’
 M – marker

denaturační purifikace (napravo od markeru):

L – lyzát
 FT – ‘flow-through’
 1 – promývací pufr 1
 2 – promývací pufr 2
 3 – promývací pufr 3
 4 – eluovaný rekombinantní protein
 M – marker

4.5.3. Hmotnostní spektrometrická analýza (‘mass spectrometric’ - MS analýza)

MS analýza provedená dr. Miroslavem Šulcem (Mikrobiologický Ústav, Praha) prokázala, že aminokyselinová sekvence purifikovaného proteinu odpovídá sekvenci předpovězené z nukleotidové sekvence genu, tj. představuje rekombinantní protein ricinusin (pokrytí: 66%), jehož velikost je 18.7 kDa (Obr.16.).

```
MRGSHHHHHH GMASMTGGQQ MGRDLYDDDD KDHPFTMKCS VCLLVLCSLA
LFVSAEEAHG AHEAHEAPVA PTPTQSPYCH LDDAHLTALT ECVGRGMTEA
LRTKLQAVTT ALACENMVCT LRKLCEQEPL STVSVFNEEE XDEFRTLGA
CRSPATAHPE EAHPEAAHHD A
```

Obr.16. Identifikace rekombinantního proteinu ricinusinu pomocí hmotnostní spektrometrické analýzy (pokrytí: 66%): Podtržené aminokyseliny pocházejí z expresního plasmidu. Označené (žluté) aminokyseliny jsou shodné s MS analýzou.

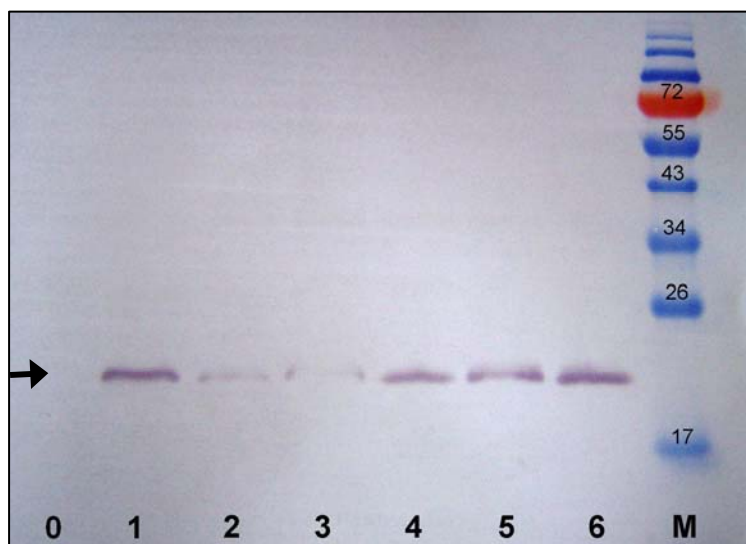
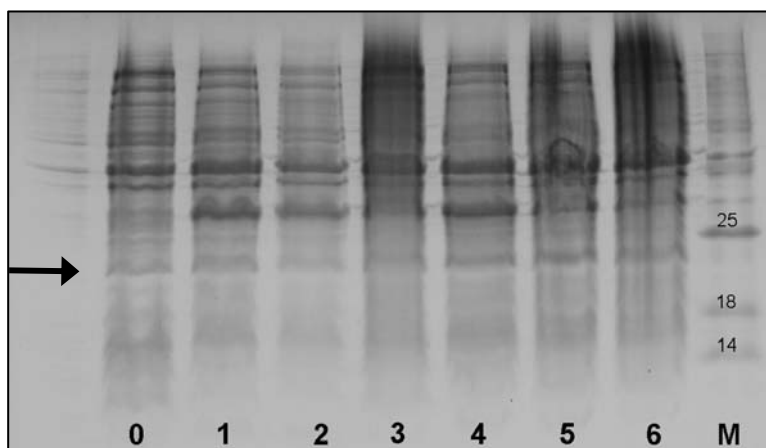
4.5.4. Příprava rekombinantního proteinu bez signálního peptidu

Signální peptid je krátký řetězec aminokyselin na začátku proteinu, který směřuje protein po translaci na místo určení. Protein se signální sekvencí je neaktivní. Pro zkoumání antimikrobiální aktivity ricinusinu je důležité získat rekombinantní protein bez signální sekvence.

Pomocí programu SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) bylo u ricinusinu určeno místo odštěpení signální sekvence, tj. mezi 19. a 20. aminokyselinou. Podle získané sekvence genu pro *ricinusin* byl navržen nový 'forward' primer, s použitím kterého byl získán kratší PCR produkt, neobsahující signální sekvenci. Zaklonování PCR produktu a pilotní experiment byly provedeny stejným způsobem jako při přípravě rekombinantního proteinu se signální sekvencí (viz. 4.5.1.). Výsledky vyhodnocené na SDS-PAGE gelu (obr.17.) prokázaly, že rekombinantní protein ricinusin bez signální sekvence (16.7 kDa) je exprimován již první hodinu od začátku exprese, což bylo prokázáno i pomocí Ni-NTA konjugátu (obr.18.).

Obr.17. Pilotní exprese rekombinantního proteinu ricinusinu bez signální sekvence (16.7 kDa):

0h – kontrola
1h – hodina od začátku exprese
2h – 2 hodiny od začátku exprese
3h – 3 hodiny od začátku exprese
4h – 4 hodiny od začátku exprese
5h – 5 hodin od začátku exprese
6h – 6 hodin od začátku exprese
M - marker



Obr.18. Detekce rekombinantního proteinu ricinusinu bez signální sekvence (16.7 kDa) Ni-NTA konjugátu:

0h – kontrola
1h – hodina od začátku exprese
2h – 2 hodiny od začátku exprese
3h – 3 hodiny od začátku exprese
4h – 4 hodiny od začátku exprese
5h – 5 hodin od začátku exprese

5. DISKUZE

5.1. Skupina histidin-bohatých antimikrobiálních peptidů klíšťat

Antimikrobiální peptidy (AMPs) jsou důležitou součástí imunitní odpovědi klíšťete. V roce 2004 byla u klíšťat objevena zcela nová skupina AMPs, která se podobá defensinům konzervativní šesticí cysteinů, ale liší se od nich vysokým počtem histidinů na C-konci. Hebraein⁴⁶, z klíšťete *Amblyomma hebraeum*, microplusin⁴⁷, z klíšťete *Boophilus microplus*, a nedávno námi objevený ricinusin⁴⁸, z klíšťete *Ixodes ricinus*, jsou zatím jediné tři proteiny/peptidy patřící do této skupiny.

Použitím techniky RT-PCR byla získána celá cDNA sekvence kódující *ricinusin*. Nukleotidová sekvence má velikost 405 bp obsahující čtecí rámec, který kóduje 135 aminokyselin. Srovnání (obr.19.) aminokyselinových sekvencí ricinusinu, microplusinu (AAO48942) a hebraeinu (AAR97292) ukázalo, že tyto tři peptidy jsou podobné a patří tedy do stejné skupiny. Společnými znaky těchto proteinů jsou konzervativní šestice cysteinů, která je charakteristická i pro defensiny, a C-konec s vysokým obsahem histidinů. Ricinusin stejně jako microplusin obsahuje na C-konci čtyři histidiny narozdíl od hebraeinu, který jich má devět. Předpokládá se, že C-konec proteinu bohatý na histidiny hraje významnou roli, ale zatím nejsou důkazy, které by tuto teorii potvrdily⁴⁶.

Ricinusin je novým, třetím proteinem z této nedávno objevené skupiny histidin-bohatých antimikrobiálních peptidů. V rámci této práce byla zjištěna jeho kompletní nukleotidová/aminokyselinová sekvence a zároveň byl částečně charakterizován.

<i>Microplusin</i>	-----MKAI FVSALLVVALVAS-----TSAHHQEI ICTKGDDA
<i>Hebraein</i>	-----MNAVFASCLIVAALVAF-----ASAHHLEI LCKKNDQV
<i>Ricinusin</i>	MKCSVCLLVLC SLALFVSAEEA HGAHEAHEAPVAPTPTQSPYCHLDDAH
<i>Microplusin</i>	ALVTELECIRLRISPETNAAFDNAVQQLNCLNRACAYRKM CATNNLEQAMS
<i>Hebraein</i>	VLATELEC IKQHIPAETNAAFDEAVTKLQCCSDRS CAIRKICEGNDLEGAMA
<i>Ricinusin</i>	HLTALTECVGRGMTEALRTKLQAVTTSLS CENMVCTLRKICEQEPLS--TV
<i>Microplusin</i>	VYFTNEQIKEIHDAATACDPEAHHHHH-----
<i>Hebraein</i>	KYFTPEQIKHVHDAALTCDPDARHHHHHCHGHGHHDHDFH
<i>Ricinusin</i>	SVFNEEEI DEFRTL GAGCRSPATAHPEEAHPEEAHHDA---

Obr.19. Srovnání tří antimikrobiálních peptidů ze skupiny proteinu z vysokým obsahem histidinů

5.2. Transkripční profil genu pro *ricinusin*

Stádium-specifická exprese

Pomocí metody RT-PCR s genově specifickými primery bylo zjištěno, že gen pro *ricinusin* je exprimován ve všech vývojových stádiích (larva, nymfa a dospělec) klíštěte *I. ricinus*. Stálá exprese genu u všech stádiích zřejmě poskytuje klíštěti možnost reagovat okamžitě v obraně proti mikrobiální infekci. U klíšťáka *Ornithodoros moubata* byly příbuzné defensinové geny (A, B, C a D) exprimované ve všech vývojových stádiích. Expresní izoformy A, B a C byla výraznější u vajíčka a dospělé samičky, zatímco izoforma D byla exprimována pouze ve vajíčkách³⁸.

Tkáňově-specifická exprese

Střevo klíštěte, postrádající trávící enzymy, je nejlepším útočištěm pro invadující mikroorganismy. To je nejspíš důvod, proč byla klíšťaty vyvinuta imunitní odpověď ve střevě v podobě antimikrobiálních peptidů³⁸. Přítomnost defensinů byla pozorována ve střevě i několika druhů krev sajícího hmyzu, například u bodalky *Stomoxys calcitrans*⁵² či komára *Anopheles gambiae*⁵³. Expresní genů pro defensiny u klíšťat *Ixodes scapularis* a *I. ricinus* byla prokázána pouze ve střevě^{44,45}. Všechny čtyři defensiny klíšťáka *O. moubata* jsou exprimovány ve střevě, kromě toho byla exprese těchto genů pozorována také v tukovém tělisku a v ovariích^{37,39}. U klíštěte *Haemaphysalis longicornis* byly objeveny dva defensinům-podobné peptidy z nichž jeden (*Hlgut*) byl exprimován ve střevě, zatímco exprese defensinu *Hlsal* byla prokázána v slinných žlázách⁴¹.

Slinné žlázy jsou dalším důležitým orgánem klíštěte. Produkci a sekreci proteinů slinnými žlázami je klíště schopné ubránit se hostitelské imunitní odpovědi a dokončit příjem potravy. Známa je skupina proteinů označovaná jako SALP (salivary secreted proteins), pro kterou je charakteristická exprese pouze v slinných žlázách (např. *salp14*⁴).

Gen pro *ricinusin* je především exprimován ve střevě a ve slinných žlázách. Slabá exprese tohoto genu byla také zaznamenána v ovariích a malpigických trubicích. Reprodukční a vylučovací soustavy klíštěte jsou v kontaktu s okolním prostředím, proto exprese antimikrobiálního proteinu v těchto orgánech se zdá být logická.

Expres genů pro hebraein a microplusin nebyla zatím testována. Ricinusin je první ze skupiny histidin-bohatých obranných proteinů klíšťat, u něhož byla zkoumána exprese genu u vývojových stádiích a vybraných tkáních.

Indukce exprese sáním klíštěte

Sání klíštěte je proces, při kterém se zvyšuje riziko invaze patogenů do těla sajícího ektoparazita. Právě antimikrobiální peptidy jsou jednou z obran klíštěte proti těmto invadujícím patogenům. Zvýšená exprese genu pro *ricinusin* u nasátých jedinců prokázala, že exprese je indukována sáním. U nenasátých jedinců je exprese genu slabá, avšak hned od prvního dne sání se zvyšuje. U genu pro hebraein byla také popsána diferenciální exprese stimulovaná sáním.

Zvýšená exprese genu pro AMPs v důsledku sání byla pozorována u krev sajícího hmyzu *S. calcitrans*⁵⁴ i u klíšťáka *O. moubata*^{37,39}. Předpokládalo se, že exprese genů u těchto druhů je indukována septickým zraněním a infekcí⁵⁵. Avšak u klíštěte *A. hebraeum* bylo zjištěno, že exprese *defensinu 1* je vyšší u klíštěte, které je 4 dny po ukončení sání než u klíštěte čerstvě nasátého¹⁸. Expres *Amblyomma defensinu 1* zřejmě stále stoupá i po ukončení sání, což předchází teorii nepodporuje.

Regulace exprese genů pro antimikrobiální peptidy indukovaná sáním klíštěte není ještě zcela jasná. Bližší identifikace způsobu regulace by mohla přispět k pochopení mechanismu imunity klíšťat.

Genomová sekvence genu

Analýzou genomových sekvencí se defensiny mohou rozdělit do dvou skupin:

1. genomová sekvence je bez intronů
2. genomová sekvence obsahuje jeden či více intronů

Ricinusin je první z genů ze skupiny peptidů bohatých na histidiny, u kterého byla zkoumána genomová sekvence na přítomnost intronů. U zbylých dvou zástupců rodiny, microplusinu a hebraeinu, nebyla dosud genomová sekvence zkoumána.

Pomocí metody PCR se specifickými primery na genomové DNA bylo zjištěno, že *ricinusin* neobsahuje introny. Stejně jako u genů pro defensiny klíšťat *I. scapularis* (scapularisin) a *Dermacentor variabilis* (varisin)³⁵ měla i získaná genomová sekvence genu pro *ricinusin* stejnou velikost (tj. 405 bp) jako již dříve získaná cDNA. Oproti tomu, genomová sekvence defensinu klíštěte *I. ricinus* a *O. moubata* obsahovala

introny. U genu *defensinu* klišťete *I. ricinus* byly zjištěny 2 introny a u genu *defensinu* klišťete *O. moubata* 3 introny .

5.3. Příprava a purifikace rekombinantního proteinu

K produkci rekombinantních proteinů se používá dvou rozdílných přístupů. Tím novějším je využití eukaryotních expresních systémů, kde se virové částice používají jako vektory a produkčními buňkami mohou být upravené hmyzí buňky. Rekombinantní proteiny získané v eukaryotních expresních systémech mají přirozenější sekundární i terciální strukturu a blíží se více nativním eukaryotním proteinům. Nevýhodou těchto systémů jsou však nízké výtěžky rekombinantních proteinů, dlouhá doba produkce a vysoké riziko kontaminace.

Jednodušším přístupem s větším výtěžkem rekombinantních proteinů je produkce v prokaryotním systému. Tyto rekombinantní proteiny jsou často využity pro přípravu mono- nebo polyklonálních protilátek, či otestování jejich aktivity.

Rekombinantní protein ricinusin byl exprimován v prokaryotním systému.

Experimentálně bylo zjištěno, že nejvyšší produkce rekombinantního ricinusinu se signální sekvencí je dosažena tři hodiny po indukci 0.5 mM IPTG v LB médiu při 37 °C. Pomocí Ni-NTA HPR konjugátů, které se vážou na fúzní část proteinu, byl tento rekombinantní protein detekován.

Protein byl izolován v rozpustné formě i pomocí metody TPI. Purifikace proteinu při nativních i denaturačních podmínkách byla prováděna pomocí vazby fúzní části proteinu na His-tag na Ni-NTA agarózové koloně. Purifikovaný protein byl podroben hmotnostní spektrometrické analýze. Výsledky prokázaly, že testovaný protein je rekombinantní protein ricinusin se signálním peptidem o velikosti 18.7 kDa.

Pro přípravu polyklonálních protilátek či testování biologických aktivit ricinusinu je nutné získat rekombinantní protein bez signální sekvence. V rámci této práce byl však získán rekombinantní protein se signální sekvencí. Protein bez signální sekvence může nabývat vlastností, které jsou pro buňku toxické. Mohlo by tedy dojít k destrukci či zablokování rekombinantního plazmidu v produkčních buňkách. Proto byla nejdříve provedena exprese, izolace a purifikace rekombinantního proteinu se signální sekvencí. Na základě tohoto experimentu byly optimalizovány podmínky pro přípravu rekombinantního proteinu bez signální sekvence.

Rekombinantní protein bez signálního peptidu byl exprimován v bakteriálním systému při stejných podmínkách jako se signálním peptidem.

V budoucnu díky těmto optimalizovaným podmínkám bude možné charakterizovat tento nový antimikrobiální peptid ricinusin z funkčního hlediska.

6. ZÁVĚR

Z klíštěte *Ixodes ricinus* byl získán zcela nový gen kódující antimikrobiální peptid – ricinusin. Získaná cDNA (405 bp) obsahovala jeden čtecí rámec kódující 14.5 kDa velký protein. Porovnání unikátní sekvence *ricinusinu* v databázi GenBank ukázalo malou shodu s geny kódující proteiny hebraein a microplusin - novou skupinou histidin-bohatých antimikrobiálních peptidů klíšťat.

Analýza exprese genu pro *ricinusin* prokázala že *ricinusin* je exprimován ve všech vývojových stádiích klíštěte *I. ricinus*. Exprese genu závisí na příjmu potravy, již od prvního dne a přetrvává po celou dobu sání. *Ricinusin* je exprimován převážně ve slinných žlázách a střevě.

V prokaryotním expresním systému byl získán rekombinantní protein se signální sekvencí. Hmotnostní spektrometrickou analýzou bylo potvrzeno, že se jedná o protein, jehož aminokyselinová sekvence odpovídá sekvenci předpovězené z genu pro *ricinusin*. V prokaryotním systému *E. coli* byl připraven i rekombinantní protein bez signální sekvence, který bude v budoucí práci využit pro získání polyklonálních protilátek, analýzu jeho antibakteriálních aktivit proti gram-pozitivním a gram-negativním bakteriím, houbám, kvasinkám i virům, jeho zapojení do procesu přenášení patogenů nebo naopak procesu bránícímu přenášení škodlivých mikroorganismů. Pomoci rekombinantního *ricinusinu* se pokusíme vyhledat i jiné obrané proteiny *I. ricinus* a jejich možnou skupinovou spolupráci v obraně klíštěte.

7. LITERATURA

1. **SONENSHINE, 1993:** Biology of tick, Volume 2. Oxford University press, New York.
2. **OSCHMANN P, KRAICZY P, HALPERIN J, BRADE V. 1999:** Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis. UNI-MED, Bremen.
3. **VALENZUELA JG. 2004:** Exploring tick saliva: from biochemistry to 'sialomes' and functional genomics. *Parasitology* 129: 83-94, (Review).
4. **NARASIMHAN S, KOSKI RA, BEAULIEU B, ANDERSON JF, RAMAMOORTHY N, KANTOR F, CAPPELLO M, FIKRIG E. 2002:** A novel family of anticoagulants from the saliva of *Ixodes scapularis*. *Insect Mol Biol.* 11: 641-650.
5. **NIENABER J, GASPAR AR, NEITZ AW. 1999:** Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp Parasitol.* 93: 82-91.
6. **ZHU K, BOWMAN AS, BRIGHAM DL, ESSENBERG RC, DILLWITH JW, SAUER JR. 1997:** Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). *Exp Parasitol.* 87: 30-38.
7. **SINGH SK, GIRSCHICK HJ. 2003:** Tick-host interactions and their immunological implications in tick-borne diseases. *Current science* 85: 1284-1298.
8. **WIKEL SK. 1999:** Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int J Parasitol.* 29: 851-859, (Review)
9. **NAKAJIMA Y, ISHIBASHI J, YUKUHIRO F, ASAOKA A, TAYLOR DM, YAMAKAWA M. 2003:** Antibacterial activity and mechanism of action of the tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1624: 125-130.
10. **KUHN KH, HAUG T. 1994:** Ultrastructural, cytochemical and immunocytochemical characterization of haemocytes of the hard tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Chelicerata). *Cell Tissue Res.* 277: 493-504.
11. **BOROVICKOVÁ B, HYPŠA V. 2005:** Ontogeny of tick hemocytes: a comparative analysis of *Ixodes ricinus* and *Ornithodoros moubata*. *Exp Appl Acarol.* 35: 317-333.
12. **INOUE N, HANADA K, TSUJI N, IGARASHI I, NAGASAWA H, MIKAMI T, FUJISAKI K. 2001:** Characterization of phagocytic hemocytes in *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 38: 514-519
13. **BURESOVÁ V, FRANTA Z, KOPÁČEK P. 2006:** A comparison of *Chryseobacterium indologenes* pathogenicity to the soft tick *Ornithodoros moubata* and hard tick *Ixodes ricinus*. *J Invertebr Pathol.* 93: 96-104.
14. **JOHNS R, SONENSHINE DE, HYNES WL. 2000:** Response of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) to hemocoelic inoculation of *Borrelia burgdorferi* (Spirochetales). *J Med Entomol.* 37: 265-270.
15. **CERAUL SM, SONENSHINE DE, HYNES WL. 2002:** Resistance of the tick *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) following challenge with the bacterium *Escherichia coli* (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). *J Med Entomol.* 39: 376-383.
16. **EGGENBERGER LR, LAMOREAUX WJ, COONS LB. 1990:** Hemocytic encapsulation of implants in the tick *Dermacentor variabilis*. *Exp Appl Acarol.* 9: 279-287.
17. **LOWENBERGER C. 2001:** Innate immune response of *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 31: 219-229, (Review)
18. **LAI R, LOMAS LO, JONCZY J, TURNER PC, REES HH. 2004:** Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Biochem J.* 379: 681-685.

19. FALES-WILLIAMS AJ, BROGDEN KA, HUFFMAN E, GALLUP JM, ACKERMANN MR. 2002: Cellular distribution of anionic antimicrobial peptide in normal lung and during acute pulmonary inflammation. *Vet Pathol.* 39: 706-711.
20. BULET P, STÖCKLIN R, MENIN L. 2004: Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev.* 198: 169-184, (Review)
21. LAI R, TAKEUCHI H, LOMAS LO, JONCZY J, RIGDEN DJ, REES HH, TURNER PC. 2004: A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. *FASEB J.* 18: 1447-1449.
22. FOGACA AC, LORENZINI DM, KAKU LM, ESTEVES E, BULET P, DAFFRE S. 2004: Cysteine-rich antimicrobial peptide of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Develop Compar Immun.* 28: 191-200.
23. PODBORONOV VM. 1990: Comparative characteristics of lysozymes of different origin. *Antibiot Khimioter.* 35: 22-25.
24. KOPÁČEK P, VOGT R, JINDRÁK L, WEISE C, SAFARÍK I. 1999: Purification and characterization of the lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem Mol Biol.* 29: 989-997.
25. GRUNCLOVÁ L, FOUQUIER H, HYP SA V, KOPÁČEK P. 2003: Lysozyme from the gut of the soft tick *Ornithodoros moubata*: the sequence, phylogeny and post-feeding regulation. *Dev Comp Immunol.* 27: 651-660.
26. RACHINSKY A, GUERRERO FD, SCOLES GA. 2007: Differential protein expression in ovaries of uninfected and *Babesia*-infected southern cattle ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochem Mol Biol.* 37: 1291-1308.
27. KUHN KH, UHLÍR J, GRUBHOFFER L. 1996: Ultrastructural localization of a sialic acid-specific hemolymph lectin in the hemocytes and other tissues of the hard tick *Ixodes ricinus* (Acari; Chelicerata). *Parasitol Res.* 82: 215-221.
28. KOVÁR V, KOPÁČEK P, GRUBHOFFER L. 2000: Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem Mol Biol.* 30: 195-205.
29. HUANG X, TSUJI N, MIYOSHI T, NAKAMURA-TSURUTA S, HIRABAYASHI J, FUJISAKI K. 2007: Molecular characterization and oligosaccharide-binding properties of a galectin from the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Glycobiology* 17: 313-323.
30. REGO RO, HAJDUSEK O, KOVÁR V, KOPÁČEK P, GRUBHOFFER L, HYP SA V. 2005: Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*. *Insect Biochem Mol Biol.* 35: 991-1004.
31. GRUBHOFFER L, KOVÁR V, RUDENKO N. 2004: Tick lectins: structural and functional properties. *Parasitology* 129: 113-125, (Review).
32. RICHMAN AM, DIMOPOULOS G, SEELEY D, KAFATOS FC. 1997: Plasmodium activates the innate immune response of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *EMBO J.* 16: 6114-6119.
33. SHAHABUDDIN M, FIELDS I, BULET P, HOFFMANN JA, MILLER LH. 1998: *Plasmodium gallinaceum*: differential killing of some mosquito stages of the parasite by insect defensin. *Exp Parasitol.* 89: 103-112.
34. JOHNS R, SONENSHINE DE, HYNES WL. 2001: Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochem Mol Biol.* 31: 857-865.
35. CERAUL SM, SONENSHINE DE, RATZLAFF RE, HYNES WL. 2003: An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem Mol Biol.* 33: 1099-1103.

36. CERAUL SM, DREHER-LESNICK SM, GILLESPIE JJ, RAHMAN MS, AZAD AF. 2007: New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge. *Infect Immun.* 75: 1973-1983.
37. NAKAJIMA Y, VAN DER GOES VAN NATERS-YASUI A, TAYLOR D, YAMAKAWA M. 2001: Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Biochem Mol Biol.* 31: 747-751.
38. NAKAJIMA Y, VAN DER GOES VAN NATERS-YASUI A, TAYLOR D, YAMAKAWA M. 2002. Antibacterial peptide defensin is involved in mitgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. *Insect Mol Biol.* 11: 611-618.
39. NAKAJIMA Y, ISHIBASHI J, YUKUHIRO F, ASAOKA A, TAYLOR DM, YAMAKAWA M. 2003. Antibacterial activity and mechanism of action of the tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1624: 125-130.
40. TSUJI N, BATTSETSEG B, BOLDBAATAR D, MIYOSHI T, XUAN X, OLIVER JH JR, FUJISAKI K. 2007: Babesial vector tick defensin against *Babesia* sp. parasites. *Infect Immun.* 75:3633-3640.
41. ZHOU J, LIAO M, UEDA M, GONG H, XUAN X, FUJISAKI K. 2007: Sequence characterization and expression patterns of two defensin-like antimicrobial peptides from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Peptides* 28: 1304-1310.
42. TODD SM, SONENSHINE DE, HYNES WL. 2007: Tissue and life-stage distribution of a defensin gene in the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. *Med Vet Entomol.* 21: 141-147.
43. LAI R, LOMAS LO, JONCZY J, TURNER PC, REES HH. 2004: Two novel non-cationic defensin-like antimicrobial peptides from haemolymph of the female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Biochem J.* 379: 681-685.
44. RUDENKO N, GOLOVCHENKO M, GRUBHOFFER L. 2007. Gene organization of novel defensin of *Ixodes ricinus*: first annotation of an intron/exon structure in a hard tick defensin gene and first evidence of the occurrence of two isoforms of one member of the arthropod defensin family. *Insect Mol Biol.* 16: 501-507.
45. HYNES WL, CERAUL SM, TODD SM, SEGUIN KC, SONENSHINE DE. 2005: A defensin-like gene expressed in the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. *Med Vet Entomol.* 19: 339-344.
46. LAI R, TAKEUCHI H, LOMAS LO, JONCZY J, RIDGEN DJ, REES HH, TURNER PC. 2004: A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. *FASEB J.* 18: 1447-1449.
47. FOGACA AC, LORENZINI DM, KAKU LM, ESTEVES E, BULET P, DAFFRE S. 2004: Cysteine-rich antimicrobial peptide of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Develop Compar Immun.* 28: 191-200.
48. RUDENKO N, GOLOVCHENKO M, EDWARDS MJ, GRUBHOFFER L. 2005: Differential expression of *Ixodes ricinus* tick genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection. *J Med Entomol.* 42: 36-41.
49. LAEMMLI U.K. 1970: Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
50. VISKARI PJ, COLYER CL. 2003: Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. *Analytical Biochemistry* 319: 263-271.
51. TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J. 1979: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci. U S A.* 76: 4350-4354.

52. **MUNKS RJ, HAMILTON JV, LEHANE SM, LEHANE MJ. 2001:** Regulation of midgut defensin production in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Insect Mol Biol.* 10:561- 571.
53. **RICHMAN AM, BULET P, HETRU C, BARILLAS-MURY C, HOFFMANN JA, KAFALOS FC. 1996:** Inducible immune factors of the vector mosquito *Anopheles gambiae*: biochemical purification of a defensin antibacterial peptide and molecular cloning of preprodefensin cDNA. *Insect Mol Biol.* 5: 203-210.
54. **LEHANE MJ, WU D, LEHANE SM. 1997:** Midgut-specific immune molecules are produced by the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 94: 11502-11507.
55. **RAJ PA, DENTINO AR. 2002:** Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiol. Lett.* 206: 9-18.