

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Imunitní geny v tukovém tělese klíštěte *Ixodes ricinus*.

Diplomová práce

Bc. Eliška Kalinová

Školitel: RNDr. Veronika Urbanová, Ph.D. (BC AV ČR)

České Budějovice 2023

Diplomová práce

Kalinová, E., 2023: Imunitní geny v tukovém tělese klíštěte *Ixodes ricinus*. [Immune genes in the fat body of the tick *Ixodes ricinus*. Mgr. Thesis, in Czech.] – 66 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This thesis focuses on immune genes in the Fat Body/Trachea complex of the tick *Ixodes ricinus*. First experimental part analyses the most expressed immune genes in wild type females from a tick transcriptome. Selected genes were subsequently studied after microbial infection. Second experimental part includes *in vitro* phagocytosis of three model pathogens after RNAi of the gene coding Cactus 1 that acts as a negative inhibitor of immune Toll signaling pathway. Results of phagocytosis were compared to GFP control group.

Klíčová slova: tick, *Ixodes ricinus*, fat body, immune genes, innate immunity, transcriptome, Toll pathway, Cactus1, RNAi, phagocytosis

Finanční podpora

Tato práce byla financována z grantu GAČR 20-05736S.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 12. dubna 2023

Tato práce je součástí publikace, která je ve fázi sepisování.

Prohlašuji, že jsem se významně podílela na publikaci analýzou transkriptomických dat, provedením PCR a qPCR metod a *in vitro* fagocytárních esejí. Vyhodnocovala jsem data experimentů a podílím se na psaní rukopisu, můj celkový podíl na této publikaci je 30 %.

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří přispěli ke vzniku této diplomové práce. V první řadě bych chtěla vyjádřit vděk mé školitelce RNDr. Veronice Urbanové, Ph.D., za její bezmeznou trpělivost při vedení mé práce a přívětivý přístup. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Petru Kopáčkovi, CSc., a RNDr. Ondřeji Hajduškovi, Ph.D., za pomoc, cenné rady a odborné připomínky. Velký dík patří i ostatním pracovníkům a studentům z Laboratoře molekulární biologie klíšťat na Parazitologickém ústavu AV ČR, a to za ochotu, podporu a příjemnou pracovní atmosféru. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a příteli.

Obsah

1 Úvod	9
2 Literární přehled	10
2.1 Klíšťata	10
2.1.1 Taxonomické zařazení	10
2.1.2 <i>Ixodes ricinus</i>	10
2.1.3 Morfologie	11
2.1.4 Tukové těleso členovců a klíšťat	12
2.2 Imunita bezobratlých a klíšťat	15
2.2.1 Imunitní signální dráhy	15
2.2.1.1 JAK/STAT signální dráha	16
2.2.1.2 IMD signální dráha	16
2.2.1.3 Toll signální dráha	17
2.2.2 Buněčná imunita	18
2.2.2.1 Fagocytóza	18
2.2.3 Humorální imunita	18
2.2.3.1 Antimikrobiální peptidy a proteiny členovců	18
2.2.3.2 Složky primitivního komplementu	22
2.2.3.3 Serinové proteázy a jejich inhibitory	23
2.2.3.4 ML-doménové proteiny	23
3 Cíl práce	24
4 Materiál a metody	25
4.1 Experiment 1: Detekce a charakterizace imunitních genů v komplexu vzdušnice/tukové těleso	25
4.1.1 Klíšťata	25
4.1.2 Příprava tkání pro transkriptomovou analýzu	25

4.1.3 RNA izolace a příprava sekvenační knihovny	25
4.1.4 Analýza transkriptomu	25
4.1.5 Infekce modelovými mikroby	26
4.1.6 Izolace RNA	27
4.1.7 Reverzní transkripce	27
4.1.8 Polymerázová řetězová reakce (PCR) a qPCR.....	28
4.1.8.1 PCR a elektroforéza.....	28
4.1.8.2 qPCR.....	29
4.2. Experiment 2 – RNA interference Cactusu 1 a <i>in vitro</i> fagocytóza	33
4.2.1 Injikace dsRNA do samic <i>I. ricinus</i>	33
4.2.2 Příprava bakterií pro <i>in vitro</i> fagocytární eseje	33
4.2.3 Fagocytární eseje	33
5 Výsledky a diskuze	35
5.1 Experiment 1: Detekce a charakterizace imunitních genů v komplexu	
<i>vzdušnice/tukové těleso</i>	35
5.1.1 Výsledky transkriptomové analýzy	35
5.1.2 Experimentální infekce patogeny	37
5.2 Experiment 2 – RNA interference Cactusu 1 a <i>in vitro</i> fagocytóza	49
6 Závěr	53
7 Literatura	54

Seznam použitých zkratek

AMP = antimikrobiální peptidy/proteiny
(antimicrobial peptides/proteins)

Avg = průměrný (average)

bp = komplementární pár bazí (base pair)

BSA = hovězí sérum albumin

Ca = *Candida albicans*

CCP = complement control protein

cDNA = komplementární DNA
(complementary DNA)

CP = carrier protein

CRD = C-type carbohydrate recognition
domain

DAP = kyselina diaminopimelová
(diaminopimelic acid)

DAPI = fluorescenční barvivo 4',6-
diamidin-2-fenylindol

DNA = deoxyribonukleová kyselina
(deoxyribonucleic acid)

dsRNA = dvouvláknová RNA (double-
stranded RNA)

Ec = *Escherichia coli*

EDTA = kyselina
ethylendiamintetraoctová
(ethylenediaminetetraacetic acid)

ef = elongační faktor

FBG = fibrinogen

FBS = signály tukového tělesa
(fat body signals)

FPKM = fragments per kilobase million

FREPs = fibrinogen-related proteins

GFP = zelený fluorescentní protein
(green fluorescent protein)

IMD = imunodeficiencie
(immune deficiency)

Ir = *Ixodes ricinus*

JAK = Janusovy kinázy (Janus kinases)

L15 = Leibovitz's L-15 médium

LB médium = Luria-Bertani kultivační
médium

LPS = lipopolysacharid

MCRs = macroglobulin complement-
related

MD-2 = myeloid differentiation factor 2

MDB = membrane desalting buffer

Ml = *Micrococcus luteus*

NCBI = National Center for
Biotechnology Information

NF- κ B = Nuclear Factor-Kappa B

NI = non injected

OD = optická hustota (optical density)

PAMPs = pathogen-associated molecular
patterns

PBS = fyziologický fosfátový pufr
(phosphate buffered saline)

PCR = polymerázová řetězová reakce
(polymerase chain reaction)

PGRP = peptidoglycan recognition
proteins

PRR = pattern recognition receptors

qPCR = kvantitativní polymerázová
řetězová reakce (quantitative polymerase
chain reaction)

Rb = rabbit

RCD = regulovaná buněčná smrt
(regulated cell death)

RNA = ribonukleová kyselina
(ribonucleic acid)

RNAi = RNA interference

ROS = reaktivní formy kyslíku
(reactive oxygen species)

Sa = *Staphylococcus aureus*

STAT = signal transducer and activator of
transcription protein

TAE = Tris base + Acetic acid + EDTA

TBEV = virus klíšťové encefalitidy
(tick-borne encephalitis virus)

TEP = proteiny obsahující thioester
(thioester containing proteins)

TIL = trypsin-inhibitor like

TLR = Toll-like receptory

TPM = transcripts per milion

UV = ultrafialové (ultraviolet)

Vg = vitellogenin

WSSV = white spot syndrome

1 Úvod

Celosvětově mají nemoci přenášené klíšťaty obrovský dopad na zemědělství a lidské zdraví (Jones et al., 2008). U nás ve střední Evropě se klíšťata běžně vyskytují a můžeme si je přinést prakticky z každé procházky v lese či v parku. Ačkoliv klíšťata svým sáním mohou způsobit lokální zánětlivé reakce či alergickou odpověď, jejich negativní význam tkví především v tom, že jsou přenašeči široké škály patogenů, které způsobují onemocnění lidí i zvířat. Mnoho z nich vážně ohrožuje lidské zdraví a v krajních případech i život. Klíště je navíc schopné přenášet patogeny na hostitele v jakémkoliv svém vývojovém stádiu, což ho činí zajímavým a důležitým cílem pro studium. Dalším alarmujícím důvodem, proč by měla být klíšťatům věnována větší pozornost, je, že kvůli změně klimatu mnoho druhů klíšťat migruje a je tak pravděpodobné, že během několika let se v Evropě budou vyskytovat nemoci, které se zde dříve nevyskytovaly (Semenza & Suk, 2018).

Kompetence klíšťat přenést patogen je zjevně podmíněna schopností patogenu vyhýbat se obranným mechanismům klíšťat, jeho perzistencí ve středním střevě, šířením do hemocoelu a slinných žláz a přenosem na naivního hostitele (Hajdusek et al., 2013). Přestože schopnost klíšťat přenášet patogeny je úzce spojena s jejich imunitním systémem (Kopacek et al., 2010), víme o něm stále poměrně málo. Již dlouhá léta existuje snaha o vytvoření vakcíny proti klíšťatům, jako je například vakcína založená na antigenu Bm86 (Willadsen et al., 1989), vakcína cílená proti ferritinu 2 (Hajdusek et al., 2010), anebo vakcína proti klíštěcímu mikrobiomu (Mateos-Hernandez, 2020), avšak žádná z těchto vakcín zatím neměla dostatečnou účinnost pro bezpečné použití u člověka. Aby byl vývoj vakcíny úspěšný, je potřeba hlouběji prozkoumat a porozumět klíštěcímu genomu, interakcím mezi klíštětem, hostitelem a patogenem, a v neposlední řadě klíštěcí imunitě.

Hlubší porozumění imunitním dějům v klíštěti by pomohlo v boji proti patogenům, které tato klíšťata přenášejí. Potenciálně velmi zajímavým orgánem, který hraje významnou roli v klíštěcí imunitě, je tukové těleso. Na základě studií na dalších členovcích (Hoffmann & Reichhart, 2002; Hetru et al., 2003; Lehane et al., 2004) předpokládáme, že tukové těleso klíšťat je analogem imunitního orgánu u dalších členovců, a proto jsem se v této práci zaměřila na (nejen) imunitní geny exprimované v tomto orgánu.

2 Literární přehled

2.1 Klíšťata

Klíšťata jsou vysoce specializovaní obligátní ektoparazitičtí členovci, kteří se živí krví savců, ptáků i plazů a vyskytují se v různých oblastech po celé Zemi. Přestože jejich rozšíření sahá od tropů až do subarktických oblastí, druhová rozmanitost klíšťat je největší v tropických a subtropických oblastech (Anderson & Magnarelli, 2008). Klíšťata jsou rovněž významnými přenašeči vážných a mnohdy až fatálních onemocnění zvířat i lidí, která jsou způsobena patogeny z řad virů, bakterií i protozoí (de la Fuente et al., 2008a). Právě díky tomu, že jsou jedním z nejčastějších přenašečů chorob, představují klíšťata velmi významnou skupinu členovců, které je potřeba věnovat pozornost.

2.1.1 Taxonomické zařazení

Klíšťata jsou taxonomicky řazena do kmene členovců (Arthropoda), třídy pavoukoců (Arachnida), podtřídy roztočů (Acari) a podřádu klíšťatoců (Ixodida), který se skládá ze tří čeledí: čeleď Ixodidae (tzv. tvrdá klíšťata), čeleď Argasidae (klíšťáci neboli tzv. měkká klíšťata) a monotypická čeleď Nuttalliellidae, kterou reprezentuje pouze jediný druh klíšťete – *Nuttalliella namaqua* (Guglielmone et al., 2010; Sonenshine et al., 2014a).

2.1.2 *Ixodes ricinus*

Ixodes ricinus (Linnaeus, 1758) neboli klíšťe obecné je druhem z čeledi Ixodidae, který lze běžně nalézt po celé Evropě, a to především ve vlhčích habitatech s vyšší vegetací, např. na lesních podrostech, loukách, či dokonce v městských parcích (Parola & Raoult, 2001). Rovněž se vyskytuje ve východní Asii a v severní Africe. Jeho životní cyklus zahrnuje celkem čtyři vývojová stádia (vajíčko, larva, nymfa, dospělec) a trvá obvykle 2-3 roky, někdy i déle v závislosti na podmínkách prostředí. Jedinec v každém svém vývojovém stupni sají vždy na jednom hostiteli. Po plném nasátí nastává transformace do dalšího stádia. Z dospělců sají krev výlučně samice, čímž mohou znatelně zvětšit svůj objem a vážit až stonásobek své váhy před sáním (Anderson & Magnarelli, 2008). Samec oplozuje samici před či během jejího sání na hostiteli, a po plném nasátí oplozená samice naklade vajíčka mimo hostitele a zahyne (Sonenshine et al., 2014a).

I. ricinus je přenašečem různých patogenů, z nichž asi nejvýznamnějším je bakterie *Borrelia burgdorferi* sensu lato způsobující lymeskou boreliózu. Také je vektorem protozoí rodu *Babesia* sp. způsobujících babeziózu; původce tularémie – bakterie *Francisella tularensis*; viru klíšťové encefalitidy (TBEV); rickettsie *Anaplasma phagocytophilum* – původce lidské

granulocytární anaplazmózy a mnoha dalších (Parola & Raoult, 2001; Deviatkin et al., 2020; Azagi et al., 2020).

2.1.3 Morfologie

Klíšťata jsou svou stavbou těla velmi blízcí obecné morfologii parazitických roztočů, jelikož mají gnathosoma, a zároveň chybí viditelné oddělení od zbytku těla (Sonenshine et al., 2014a; Noble & Noble, 1976). Těla klíšťat z čeledi Ixodidae mají tvar připomínající kapku a jsou pokryta tegumentem skládajícího se z vnitřní vrstvy epiteliálních buněk a z vnější vrstvy pevné kutikuly. Na dorsální straně těla mají přítomen tvrdý štítek zvaný scutum. Tělo se skládá ze dvou částí, kterými jsou gnathosoma a idiosoma. Anteriorní část těla gnathosoma zahrnuje tzv. capitulum, kde se nachází ústní ústrojí s vyčnívajícím hypostomem. Hypostom má na svém vnějším povrchu ventrální, dozadu směřující dentikuly a slouží jako fixní orgán a potravní kanál (Anderson & Magnarelli, 2008). Na zadní části těla jsou umístěny končetiny. Larvální stádia klíšťat mají šest končetin, zatímco nymfy a dospělci mají končetin osm. Na prvním páru končetin se nachází jejich hlavní smyslový orgán zvaný Hallerův orgán (Parola & Raoult, 2001).

Vnitřní orgány klíštěcího těla jsou obklopeny cirkulující hemolymfou. Co se týče trávicího ústrojí, střevu předchází tzv. preorální kanál, který začíná v zadní části hypostomu a funguje jako prodloužení úst (Sonenshine et al., 2014a). U čeledi Ixodidae do tohoto kanálu ústí kanálky slinných žláz a příjem krve se střídá s produkcí slin do rány hostitele. Nasátá krev prochází díky silnému sacímu hltanu přes jícen do střeva. Střední střevo slouží kromě trávení krve také jako zásobní orgán, který klíštěti umožňuje trávit jeho obsah postupně po mnoho měsíců nebo dokonce let (Sonenshine et al., 2014a). Střední střevo je spojeno s rektálním vakem, kde se nestrávený obsah střeva zahrnující např. odumřelé trávicí buňky, nestrávené zbytky hemoglobinu a tekutiny z lumen střeva mísí s guaninem z malpighických trubic. Opakovaný přísun materiálu do rektálního vaku vede k otevření řitního otvoru kontrakcí lalokových svalů a následnému vyprazdňování (Sonenshine et al., 2014a). Centrem nervového systému je kompaktní synganglion, ze kterého vybíhají nervy do všech oblastí těla. Výměnu plynů zajišťuje komplexní systém tracheálních trubic (vzdušnic), které jsou propojeny s menšími trachejemi, kolem nichž se často vyskytují buňky tukového tělesa.

2.1.4 Tukové těleso členovců a klíšťat

Tukové těleso členovců je tkáň, která je analogická obratlovčí tukové tkáni a játrům (Li et al., 2019). Nachází se především u hmyzu, ale můžeme ji nalézt také u dalších skupin členovců jako jsou např. klepítkatci, stonožkovci a korýši. Tukové těleso může tvořit jediný typ buněk nebo naopak řada různých typů buněk v závislosti na druhu členovce a jeho životní fázi. Běžně se vyskytuje jako vrstva buněk těsně pod epidermis integumentu a jako pruhy buněk kolem orgánů (Arrese & Soulages, 2010). Toto umístění umožňuje efektivní přístup hemolymfy k buňkám tukového tělesa. Tukové těleso nemá na všech místech v organismu stejnou převažující funkci. Tkáň umístěná v blízkosti střev je často metabolicky aktivnější než ta, která se nachází těsně pod kutikulou častěji se podílející na ukládání živin a zásobování (Sonenshine et al., 2014a). Nejčastějším typem buněk tukového tělesa jsou trofocyty, které mohou být kvádrového tvaru, jež jsou obvykle menší ale přítomny ve větším množství, obklopující reprodukční a jiné hlavní vnitřní orgány, kdy potom mluvíme o tzv. vnitřním tukovém tělese. Mohou však být rovněž tvaru kulatého, jež bývají větší a vyskytují se jako příležitostné shluky pod epidermis nebo obalují vzdušnice a bývají označovány jako tzv. periferní tukové těleso (Denardi et al., 2008; Sonenshine et al., 2014a). Jednotlivé trofocyty jsou k sobě připojené pojivovou tkání. Tukové těleso je u klíšťat rozptýlené a buňky tvoří komplex se vzdušnicemi, což je také důvodem, proč je nelze při pitvě oddělit.

Tukové těleso členovců je velmi dynamickou tkání, jež se mění a přeskupuje během celého vývoje organismu. Právě ve vývoji hraje tukové těleso nezanedbatelnou roli, a to skrze syntézu a sekreci různých regulačních molekul zvaných „fat body signals (FBS)“ (Zheng et al., 2016). Tukové těleso má vliv na růst larev, velikost těla, diapauzu kukel a může ovlivňovat i délku života (Li et al., 2019). Některé metabolické procesy jsou specifické pro konkrétní stádium, jako je například syntéza, ukládání a sekrece zásobních proteinů do hemolymfy, které se vyskytují u larev, nebo syntéza vitellogeninu (Vg) u dospělců (Arrese & Soulages, 2010). Právě Vg je u klíšťat zcela klíčový pro správnou reprodukci, jelikož u samic zajišťuje transport lipidů do oocytů a jejich zrání (Sonenshine et al., 2014a). Bylo také prokázáno, že produkce Vg souvisí se sáním krve u komárů (Wang et al., 2017; Roy et al., 2018).

Tukové těleso zaujímá během vývoje významnou roli také při ukládání a využití energie a vykazuje vysokou biosyntetickou a metabolickou aktivitu (Li et al., 2019). Hlavními zásobními látkami v tukovém tělese jsou lipidy ve formě lipidových kapének a glykogen. Buňky tukového tělesa také zajišťují syntézu velkého množství hemolymfových proteinů a cirkulujících metabolitů (Arrese & Soulages, 2010). Například trehalóza, nejhojnější sacharid

v hemolymfě, je syntetizována výlučně tukovým tělesem (Sonenshine et al., 2014a). Jinými slovy, v tukovém tělese se odehrává většina intermediárního metabolismu členovců, včetně metabolismu lipidů a sacharidů, syntézy bílkovin a metabolismu aminokyselin a dusíku. (Arrese & Soulages, 2010). Tukové těleso je u klíšťat také jedním ze zdrojů zásobního proteinu CP (carrier protein), který je během vývoje převládajícím proteinem hemolymfy samců i samic.

Kromě zásobárny živin a funkce v energetickém metabolismu má tukové těleso i další funkce zahrnující detoxifikaci organismu, cirkadiánní rytmus a rovněž u něj byla prokázána role v sekvestraci hemu a udržování homeostázy odstraňováním specifických látek z hemolymfy (Sonenshine et al., 2014a). V neposlední řadě má tukové těleso i imunitní funkci (Arrese & Soulages, 2010), jelikož produkuje AMP, které mají velmi významnou úlohu v humorální odpovědi organismu proti patogenu, a rovněž syntetizuje a produkuje některé peptidy, které pomáhají fagocytóze hemocytů (Yi et al., 2014; Li et al., 2019). Například u rodu *Drosophila* bylo prokázáno, že tukové těleso exprimuje mikroRNA (miR-8) zodpovědnou za produkci a regulaci AMP jako je drosomycin a dipterin (Choi & Hyun, 2012).

Co se týče klíšťat, například u druhu *Amblyomma americanum* byly nalezeny transkripty pro AMP defensin a amerin v několika tkáních včetně tukového tělesa (Sonenshine et al., 2014a). U druhu *Ornithodoros moubata* je v tukovém tělese exprimován defensin D (Nakajima et al., 2002). Tyto informace silně naznačují, že klíštěcí tukové těleso se podílí na vrozené imunitě. Nicméně v porovnání s ostatními členovci stále chybí podrobnější studie odkrývající konkrétní imunitní funkce tohoto orgánu.



Obrázek 1: Snímek komplexu vzdušnice/tukové těleso klíštěte *I. ricinus* z mikroskopu s fázovým kontrastem; TT = buňky tukového tělesa, V = vzdušnice.

2.2 Imunita bezobratlých a klíšťat

Imunitní systém je komplexním souhrnem mechanismů, jejichž hlavními úlohami jsou obranyschopnost organismu a imunitní dohled, a zároveň rozpoznávání vlastního a autotolerance. Imunitní odpověď nastává v případě, že patogen překoná mechanické bariéry organismu, jakou je u bezobratlých například kutikula na povrchu těla či chitinózní membrána střev a vzdušnic (Wigglesworth, 1972), a dostává se do hemocoelu, kde je rozpoznán jako cizorodý.

Imunitní systém živočichů je obecně tvořen dvěma základními typy: vrozenou a získanou imunitou. Získaná neboli specifická imunita je přítomna u vyšších obratlovců. Vrozená (také zvaná přirozená či nespecifická) imunita je evolučně starším systémem vyskytujícím se u všech eukaryotních organismů (Christophides et al., 2004), a zároveň je jedinou imunitou u bezobratlých. Klíšťata jsou jakožto bezobratlí na této primitivní imunitě zcela závislá. Vrozenou imunitu lze rozdělit na dvě základní složky – humorální a buněčnou odpověď. U klíšťat buněčná imunita zahrnuje fagocytující buňky (hemocyty), humorální zahrnuje primitivní komplement, AMP a imunitní signální dráhy. Můžeme u nich také nalézt mechanismy jako je RNA interference, reaktivní formy kyslíku (ROS) a regulovaná buněčná smrt, které lze též řadit do vrozené imunity (Fogaca et al., 2021).

Bezobratlí dokážou rozlišovat vlastní molekuly od molekul cizích díky přítomnosti tzv. PRR receptorů (Pattern Recognition Receptors), na které se váží molekuly pocházející z patogenů zvané PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Obvykle se jedná o jejich povrchové struktury (lipopolysacharid gramnegativních bakterií, peptidoglykany grampozitivních bakterií či β -1,3-glukany hub), které bývají společné pro mnoho skupin organismů (Janeway & Medzhitov, 2002; Fjita et al., 2004). Tato vazba pak aktivuje imunitní signální kaskády vedoucí ke zničení patogenního organismu prostřednictvím fagocytózy, melanizace, buněčné lýze a dalších mechanismů (Hillyer, 2016).

2.2.1 Imunitní signální dráhy

Jak v buněčné, tak v humorální imunitě působí dráhy, které jsou aktivovány po invazi patogenu do hostitelského organismu a vedou k produkci mnoha efektorových molekul včetně AMP. Mezi ty nejvýznamnější a v současnosti i nejvíce prostudované dráhy patří IMD, Toll a JAK/STAT. První dvě zmíněné patří do tzv. NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B) signálních drah, jelikož transkripční faktory těchto kaskád váží určité promotorové oblasti genů kódujících AMP. Tyto oblasti obsahují nukleotidové motivy podobné savčím vazebným

místům pro NF- κ B/Rel proteiny. U klíštěte již byly popsány komponenty všech tří výše zmíněných imunitních drah (Fogaca et al., 2021), ale stále chybí některé klíčové informace.

2.2.1.1 JAK/STAT signalizační dráha

JAK/STAT signalizační dráha je kaskádou zahrnující interakce různých proteinů podílejících se na imunitě proti virům, buněčném dělení, buněčné smrti a protinádorové imunitě (Dostert et al., 2005; Osman et al., 2012; Narasimhan et al., 2014). U mouchy rodu *Drosophila* hraje JAK/STAT pouze doplňkovou úlohu během bakteriální či houbové infekce, a především podporuje imunitní odpověď Toll a IMD dráhy (Fogaca et al., 2021).

Kaskáda je spuštěna chemickými signály zvenčí buňky a zahrnuje 3 klíčové signalizační komponenty (Morris et al., 2018). Prvním jsou tzv. Janusovy kinázy (JAKs). Kinázy reagují s širokou škálou cytokinových receptorů, jež představují druhý komponent dráhy. Tyto receptory přenášejí signál pouze za přítomnosti Janusových kináz, jelikož samy o sobě nemají kinázovou aktivitu. Hlavní funkcí JAK enzymů je však fosforylace proteinů rodiny STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), což je rodina transkripčních faktorů představující poslední komponent JAK/STAT dráhy. Fosforylace STAT vede k jejich translokaci do jádra, kde ovlivňují genovou expresi (Morris et al., 2018).

2.2.1.2 IMD signalizační dráha

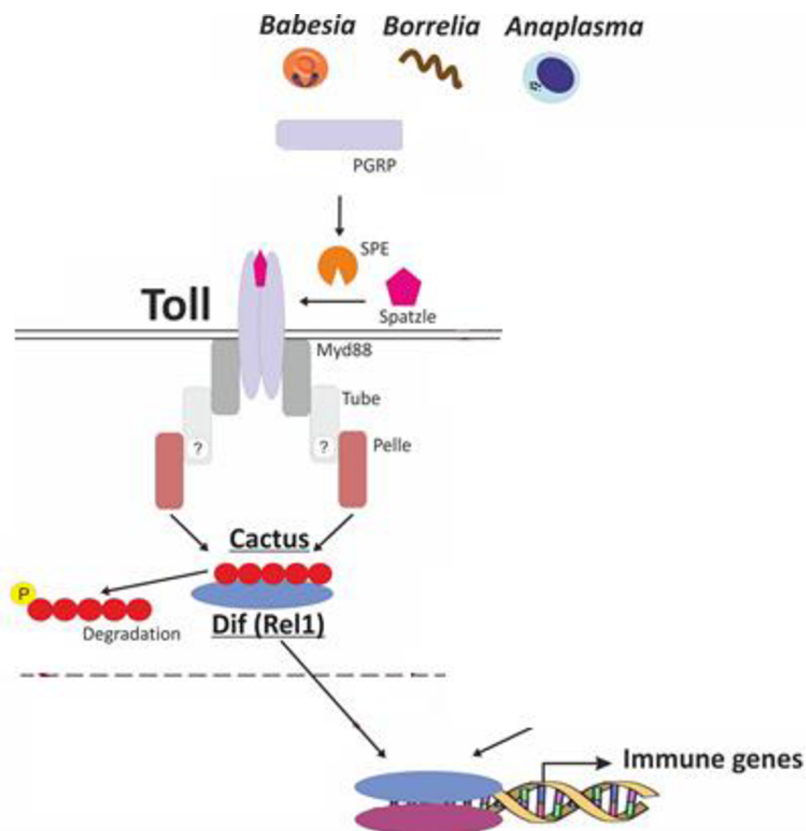
IMD dráha (tzv. Immune Deficiency Pathway) je signální dráha hmyzu, která je stimulována především gramnegativními bakteriemi. Může však být aktivována i některými grampozitivními bakteriemi, jako je například rod *Bacillus* (Fogaca et al., 2021). Rovněž bylo objeveno, že je nejefektivnější imunitní obranou komára rodu *Anopheles* proti původci malárie *Plasmodium falciparum* (Frolet et al., 2006; Garver et al., 2012). IMD signalizační kaskádu aktivuje vazba peptidoglykanu typu DAP (diaminopimelic acid) na peptidoglykan rozpoznávající proteiny (PGRP). To vede k translokaci transkripčního faktoru Relish do jádra a k produkci AMP a dalších efektorů.

U klíšťat nebyly nalezeny všechny komponenty této dráhy, pravděpodobně kvůli obtížné anotaci genů, ale další teorie zahrnují neúplnost dráhy či spřažení a aktivaci skrze Toll dráhu (Capelli-Peixoto et al., 2017). Nicméně výskyt a funkčnost alespoň části této dráhy byla u klíšťat potvrzena (Capelli-Peixoto et al., 2017; McClure Carroll et al., 2019).

2.2.1.3 Toll signalizační dráha

Jedním z nejdůležitějších mechanismů přirozené imunity je Toll signalizační dráha. Ta je dobře prozkoumána především u mouchy rodu *Drosophila*, u níž byla rovněž i objevena (Morisato & Anderson, 1995). Dráhu spouštějí grampozitivní bakterie, houby, a zároveň je zahrnutá i v protivirové imunitě (Ramirez & Dimopoulos, 2010; Clayton et al., 2014).

Toll dráha je aktivována molekulou Spätzle. Jedná se o protein se strukturou podobnou savčím neurotrofinům, který vyžaduje proteolytické štěpení pro plnou biologickou aktivitu (Hoffman, 2003). To je indukováno kaskádou aktivovanou v časně fázi infekce. Po vazbě Spätzle na Toll receptor a aktivaci Toll dráhy dochází k deaktivaci negativního inhibitoru Cactus a následnému uvolnění transkripčního faktoru Rel1 (zvaný také Dif či Dorsal) do jádra, čímž je zahájena exprese imunitních genů, které spouští imunitní reakci proti danému patogenu.



Obrázek 2: Toll signalizační dráha u mouchy *Drosophila* (převzato od Hajdušek, nepublikovaná data); Toll signalizace je spuštěna vazbou molekuly Spätzle na Toll receptor. Vazba spustí interakci dalších molekul, jako jsou adaptér MyD88 nebo molekula Pelle. Fosforylací dojde k degradaci negativního inhibitoru Cactus. Tím se aktivuje transkripční faktor Rel1 (Dif) a putuje do jádra, kde se naváže na DNA a umožní genovou expresi.

Genomové a transkriptomové analýzy odhalily, že klíčící genom obsahuje geny kódující mnoho komponentů Toll dráhy (Smith & Pal, 2014; Rosa et al., 2016; Gulia-Nuss et al., 2016), včetně více než 20 genů kódujících negativní inhibitor Cactus. Na rozdíl od IMD dráhy byly identifikovány téměř všechny komponenty Toll dráhy popsané u *Drosophily*, a lze předpokládat, že Toll dráha u klíšťat je plně funkční.

2.2.2 Buněčná imunita

2.2.2.1 Fagocytóza

Fagocytóza je obranný proces, který zahrnuje fáze rozpoznání, pohlcení a zničení patogenu buňkami zvanými hemocyty (Sonenshine et al., 2014b). Odehrává se v klíčící hemolymfě. Pohlčení umožňují pseudopodia, která cizorodou buňku obejmou a tím ji pohltnou do tzv. fagozomu. Fagozom se následně spojí s lysozomy, jež obsahují různé trávicí enzymy a zabíjivé molekuly, čímž dochází k eliminaci požitého patogenu.

2.2.3 Humorální imunita

2.2.3.1 Antimikrobiální peptidy a proteiny členovců

Jedním z klíčových aspektů vrozeného imunitního systému členovců je rychlá syntéza účinných AMP při infekci nebo traumatu. Většinou se jedná o malé peptidy vykazující nejen antibakteriální aktivitu, ale také mohou působit proti některým parazitům, houbovým patogenům a virům (Yi et al., 2014). AMP jsou obvykle syntetizovány v tukovém tělese nebo v hemocytech a doposud jich bylo identifikováno více než 150 (Yi et al., 2014). AMP lyzují buňky patogenů skrze interakci s jejich membránami (Sonenshine et al., 2014a). Kromě přímé obrany hostitele mají též úlohu v zánětu, kde působí na epitelální a zánětlivé buňky a ovlivňují tak různé procesy, jako je uvolňování cytokinů, chemotaxe, buněčná proliferace, hojení ran a rovnováha proteáz a jejich inhibitorů.

AMP obvykle vznikají z inaktivních prekurzorů či pre-proteinů a lze je rozdělit podle jejich sekvence a struktury zhruba do čtyř skupin: peptidy obsahující α -helix (př. cecropin, moricin), peptidy bohaté na prolin (př. apidaecin, lebecin), peptidy bohaté na cystein (př. defensin, drosomycin) a větší proteiny bohaté na glycin (př. attacin či gloverin, který lze nalézt pouze u motýlů) (Yi et al., 2014). Klíšťata s ostatními členovci sdílejí některé skupiny, jako jsou defensiny a lysozymy, ale mají i specifické AMP – například mikroplusiny (Kopacek et al., 2010).

2.2.3.1.1 Defensiny

Defensiny jsou jednou z nejvíce prozkoumaných skupin AMP. Defensiny členovců poprvé izolovali Matsuyama a Natori z kultivovaných buněk pocházejících z mouchy *Sarcophaga peregrine* (Matsuyama & Natori, 1988). Před více než dvaceti lety byly klíštěcí defensiny poprvé popsány u klíštěčka *Ornithodoros moubata* a klíštěte *Dermacentor variabilis* (Nakajima et al. 2001; Johns et al., 2001), přičemž dnes už byly defensiny identifikovány u velkého množství dalších druhů tvrdých i měkkých klíšťat (Rudenko et al., 2005, 2007; Sonenshine & Hynes 2008; Saito et al., 2009; Chrudimska et al. 2010).

Klíštěcí defensiny jsou krátké kationtové peptidy obsahující tři cysteinové páry, které tvoří strukturu zvanou „defensin fold“ (Ganz, 2003). Jsou syntetizovány jako prepropeptidy o velikosti cca 8 kDa (dlouhé 67–92 aminokyselin), které obsahují signální peptid s vysoce konzervovaným štěpným motivem pro proteázu furin RVRP pro uvolnění funkčního peptidu (cca 36–46 aminokyselin) s velikostí obvykle menší než 5 kDa (Bulet et al., 2004; Wu et al., 2022). Defensiny jsou podle své sekvence a struktury řazeny do dvou super rodin: cis- a trans-defensinů. Cis-defensiny zahrnují defensiny tzv. CS $\alpha\beta$ -typu (cysteinem stabilizovaný α -helix a β -list) vyskytující se u bezobratlých, rostlin a hub, zatímco mezi trans-defensiny obecně patří obratlovčí α -, β -, θ - defensiny a velké defensiny bezobratlých. Obě rodiny defensinů obsahují disulfidické můstky, díky kterým jsou peptidy stabilní vůči teplotě, pH a proteolýze (Maemoto et al., 2004; Chan & Ng, 2013; Shafee et al., 2017).

U druhu *D. variabilis* byl nalezen defensin zvaný varisin (Johns et al., 2001), který je aktivní proti grampozitivním bakteriím, ale také proti gramnegativní *B. burgdorferi*. Dále byl ve střevě tohoto klíštěte identifikován defensin 2, jehož role v imunitě však nebyla zcela potvrzena.

U druhu *I. ricinus* byly identifikovány *def1*, *def2* a *def3* (Rego, 2005; Rudenko et al., 2005, 2007; Chrudimska et al. 2010), z nichž první dva jsou si velice podobné a působí proti grampozitivním bakteriím. Jedná se o izofomy lišící se jednou aminokyselinou v sekvenci aktivního peptidu. Ačkoliv se liší tak málo, aktivita *def2* je znatelně vyšší než u *def1* (Chrudimska et al. 2010). *Def3* má odlišnou strukturu (obsahující pouze 2 cysteinové páry ze 3), která byla zatím popsána pouze částečně.

2.2.3.1.2 Mikroplusiny

Mikroplusiny (také hebraeiny) jsou AMP bohaté na cystein a histidin, jež jsou specifické pro klíšřata. Jejich sekundární struktura obsahuje 4 až 6 α -helixů. Mikroplusin (10 kDa) byl poprvé izolován z hemolymfy *R. microplus* a v přibližně stejnou dobu byl z hemolymfy *A. hebraeum* izolován další AMP bohatý na histidin, pojmenovaný hebraein (11 kDa) (Fogaca et al., 2004; Sonenshine et al., 2014a). Hebraein má stejně jako mikroplusin šest cysteinových zbytků a α -helikální strukturu. Vzájemně sdílejí 62% identitu a 73% podobnost, a vykazují zejména antifungální aktivitu. Mikroplusiny chelatují ionty mědi pravděpodobně vazbou s histidiny, jelikož mutanti s histidinovým deficitem měli značně sníženou schopnost ničit houbové patogeny (Lai et al., 2004).

Mikroplusiny účinkují proti grampozitivním bakteriím, houbám *Aspergillus niger*, *Cryptococcus* a kvasince *C. neoformans*. Zjištěný bakteriostatický účinek mikroplusinů proti *Micrococcus luteus* byl pravděpodobně způsoben jeho schopností vázat ionty mědi, které jsou nezbytné pro bakteriální dýchání (Silva et al., 2009).

2.2.3.1.3 Lektiny

Lektiny jsou velmi důležitou skupinou proteinů vrozené imunity a jsou považovány za funkční analogy imunoglobulinů u organismů postrádajících získanou imunitu (Vasta & Marchalonis, 1984). Obecně se jedná o proteiny schopné vázat sacharidy a aglutinovat některé buňky. V imunitě plní následující role – rozpoznávání a agregaci mikroorganismů, opsonizaci a aktivaci komplementového systému (Vasta et al., 1994). Většina lektinů izolovaných z členovců pochází z hemolymfy a pravděpodobně jsou produkovány hemocyty a buňkami tukového tělesa (Vasta et al., 1999).

Lektiny se na základě své funkce dělí do dvou skupin podle toho, zda rozpoznávají ligandy endogenního či exogenního původu. Strukturně je můžeme dělit do mnoha skupin, z nichž nejvýznamnější jsou C-lektiny, galektiny a pentraxiny. C-lektiny (zahrnující např. kolektiny a selektiny) obsahují doménu CRD, která je zodpovědná za vazbu sacharidů prostřednictvím iontů vápníku (Xia et al., 2018). Fungují tedy jako receptory rozpoznávající složky povrchu různých mikrobů. Selektiny jsou patrně nejprozkoumanější skupinou C-lektinů, jsou to membránové proteiny a u obratlovců se nacházejí na buňkách endotelu, trombocyttech a leukocytech. Od toho je též odvozen jejich název – L-selektin je exprimovaný na leukocytech, E-selektin je produkován endoteliálními buňkami a P-selektin se exprimuje na povrchu krevních destiček (platelets) (McEver, 1994).

Co se týče lektinů klíšťat, zatím bylo provedeno jen pár studií na několika málo druzích, jako např. *Ornithodoros tartakovskyi* a *tholozani*, *Argas polonicus* a *I. ricinus* (Grubhoffer et al., 1991). U *I. ricinus* byla zjištěna vazebná aktivita nového lektinu (85 kDa) s kyselinou sialovou, D-galaktózou a N-acetyl-D-glukosaminem, což naznačuje, že klíšťecí lektiny zajišťují rozpoznávání mezi vlastním a cizím (Kuhn et al., 1996). V hemolymfě *O. moubata* byl nalezen lektin pojmenovaný Dorin M, u něhož se věří, že má imunitní funkci (Kovar et al., 2000). Dorin M vykazuje sekvenční podobnost s tachylektiny 5A a 5B – nejabundantnějšími lektiny z ostrorepa *Tachypleus tridentatus* (Kawabata & Tsuda, 2002). Tachylektiny 5A a 5B obsahují C-koncovou fibrinovou (FBG, fibrinogen) doménu, která je svou sekvencí a strukturou velice podobná FBG doméně fikolinů savců (Gokudan et al., 1999).

Tachylektiny patří do rodiny proteinů obsahující právě FBG domény – tzv. fibrinogen-related proteins (FREPs), a jsou spojené s imunitou obratlovců i bezobratlých (Wang et al., 2004). S rozvojem nových molekulárních a bioinformatických metod došlo u klíšťat k identifikaci dalších FREP proteinů a proteinů příbuzných tachylektinům, které sdílejí značnou homologii s Dorinem M. Příkladem takových proteinů jsou OMFREP u druhu *O. moubata*, či Ixoderin A a B u druhu *I. ricinus* (Rego et al., 2005).

2.2.3.2 Složky primitivního komplementu

2.2.3.2.1 Proteiny obsahující thioester (TEP)

Komplementový systém je nadmíru důležitým obranným mechanismem nejen u bezobratlých, ale i u obratlovců. U vyšších obratlovců se jedná o komplexní systém zahrnující více než 20 komponentů a fungující skrze tři různé dráhy (klasická, alternativní a lektinová) vedoucí k eliminaci patogenu. Za centrální složku komplementu se dá považovat C3 komponent, jehož výskyt sahá až k evolučně starým bezobratlým živočichům, jakým je např. ostrorep *T. tridentatus* (Zhu et al., 2005; Sekiguchi & Nonaka, 2015). Tito živočichové byli použiti jako modelové organismy ke zmapování primitivní formy komplementu u bezobratlých.

Již bylo identifikováno a popsáno několik molekul, které mají roli v primordiálním komplementovém systému členovců. Patří mezi ně výše zmíněné FREPs (aktivace lektinové dráhy) a rodina proteinů obsahujících thioester (TEP), která zahrnuje α 2-makroglobuliny (α 2M), molekuly související s C3 složkou komplementu, TEP proteiny hmyzího typu (iTep), makroglobulinové proteiny spojené s komplementem (MCRs) a konvertázy (Buresova et al., 2011; Urbanova et al., 2015; Fogaca et al., 2021).

TEP proteiny u rodu *Ixodes* zahrnují konkrétně tři α 2-makroglobuliny (Ir α 2M), tři molekuly související s C3 složkou komplementu (IrC3), dvě molekuly související s komplementem makroglobulinu (IrMCR) a jeden TEP hmyzího typu (IrTep) (Urbanova et al., 2015).

2.2.3.2.2 Faktor B

Faktor B je C3/C5 konvertáza v alternativní dráze aktivace obratlovčího komplementu (Ricklin et al., 2010). Molekula IrC2/Bf nalezená v klíštěti *I. ricinus* sdílí s Faktorem B molekulární strukturu zahrnující repetice CCP na N konci, doménu von Willebrand factor A a konzervovanou doménu podobnou trypsinu (Urbanova et al., 2018). Bylo zjištěno, že IrC2/Bf je syntetizován převážně v tukovém tělese, a po infekci kvasinkou *C. albicans* a bakterií *B. burgdorferi* byla detekována zvýšená exprese *irc2/bf* genu (Urbanova et al., 2018).

2.2.3.3 Serinové proteázy a jejich inhibitory

Naše znalosti o účasti serinových proteáz v imunitě klíšťat jsou poněkud omezené. Co se týče jejich struktury, serinové proteinázy u členovců sestávají z regulační CLIP domény na N konci a z katalytické domény na C konci (Jiang & Kanost, 2000). Serinová proteináza s CLIP doménou byla identifikována u druhu *D. variabilis* a byla vysoce homologní s řadou genových produktů členovců spojených s imunitou (Simser et al., 2004).

V hemolymfě klíšťat můžeme nalézt také proteiny s inhibiční aktivitou serinových proteáz, tzv. serpiny (Kanost & Jiang, 1996). Serpiny se podílejí na imunitní obraně před patogeny – zprostředkovávají koagulační procesy hemolymfy, melanizaci, aktivaci cytokinů a produkci některých AMP (Polanowski & Wilusz, 1996; Gulley et al., 2013). Kromě toho mohou serpiny také bránit patogenům kolonizovat hostitelské tkáně a inhibovat jejich schopnost unikat imunitnímu systému (Armstrong, 2001).

Prvním objeveným inhibitorem serinových proteáz u klíšťat je Ixodidin nalezený u druhu *R. microplus* (Fogaca et al., 2006). Ixodidin má s nejvyšší pravděpodobností v klíštěci hemolymfě mnoho různých mechanismů svého účinku. Jednak může působit přímo proti patogenům, dále pomáhá zprostředkovat další imunitní reakce v hemolymfě, a rovněž zachovává integritu jiných AMP (Fogaca et al., 2006).

2.2.3.4 ML-doménové proteiny

Rodina proteinů ML zahrnuje různé proteiny s tzv. ML doménou, která zajišťuje rozpoznávání lipidů související s MD-2 (myeloid differentiation factor 2), jež byly identifikovány v houbách, rostlinách a zvířatech. ML-doména obsahuje signální peptidovou sekvenci a čtyři cysteinové zbytky tvořící disulfidické můstky (Inohara & Nunez, 2002). V současnosti tato proteinová rodina zahrnuje více než 150 proteinů.

Ačkoli přesná funkce většiny ML proteinů nebyla dosud popsána, víme, že ML doména je zodpovědná za schopnost vázat lipidy. ML proteiny se tedy mohou podílet na rozpoznávání patogenů a imunitních reakcí (Inohara & Nunez, 2002).

3 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je najít a popsat nejvíce exprimované imunitní geny v komplexu vzdušnice/tukové těleso v částečně nasátých samicích klíštěte *I. ricinus* pomocí transkriptomové analýzy, validace těchto transkriptů pomocí real-time PCR metody a studia exprese těchto genů po experimentální infekci klíšťat modelovými patogeny. Dalším z cílů této práce je zkoumání vlivu Toll dráhy na buněčnou imunitu, a to za použití RNA interference a *in vitro* fagocytózy.

4 Materiál a metody

4.1 Experiment 1: Detekce a charakterizace imunitních genů v komplexu vzdušnice/tukové těleso

4.1.1 Klíšťata

Čtyři dospělé samice *I. ricinus* použité v této práci pocházely z přírody a byly sesbírány vlnkováním v lese v okolí Českých Budějovic (Česká republika). Klíšťata byla umístěna v klima boxu ve skleněných dózách o vlhkosti 95 %, teplotě 24 °C a s denní a noční periodou 15/9 hodin. Se všemi laboratorními zvířaty bylo zacházeno v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání České republiky č. 246/1992 Sb., podle schváleného projektu pokusů č. 25/2020.

4.1.2 Příprava tkání pro transkriptomovou analýzu

Po pěti dnech sání na morčatech byly samice *I. ricinus* sundány. Povrch klíšťat byl očištěn 70% ethanolem a destilovanou vodou (každé omytí 3x30 sekund). Pro přípravu knihovny byl ze samic vypitván komplex vzdušnice/tukové těleso. Vzorky byly následně umístěny do 200 µl vychlazeného pufru RNAlater (Ambion) a ihned zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny v -80 °C pro další použití.

4.1.3 RNA izolace a příprava sekvenční knihovny

Vzorky byly odeslány do laboratoře North Carolina State Genomic Sciences Laboratory (Raleigh, NC, USA), kde byla vyizolována RNA a provedena RNAseq analýza komplexu vzdušnice/tukové těleso vypreparovaného ze čtyř částečně nasátých dospělých samic *I. ricinus*. K analýze byl použit přístup semi-kvantitativního profilování exprese založeném na hodnotách FPKM (TPM) transkriptů. Více informací v NCBI Bioproject PRJNA748353 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=748353>).

4.1.4 Analýza transkriptomu

Filtrace transkriptomických dat za účelem výběru nejvíce exprimovaných imunitních genů reprezentujících různé imunitní třídy probíhala podle níže popsaného postupu.

Nejdříve byla nastavena minimální hodnota *Average transcript per milion* (Avg TPM) a to na hodnotu ≥ 3 , čímž došlo k odstranění transkriptů, u kterých byly u všech čtyř vzorků příliš nízké či nulové hodnoty TPM. Tabulka byla následně rozdělena na jednotlivé listy podle předem anotovaných skupin imunitních genů (např. ML domain, TLR, microplusins,

lectins...). Transkripty byly seřazeny ve všech listech podle TPM hodnoty od nejvyšší po nejnižší a byly odstraněny ty transkripty, u kterých se nevyskytovaly hodnoty TPM vyšší než nula alespoň u 3 ze 4 vzorků. Následně byl u každé skupiny vybrán transkript s nejvyšší hodnotou Max TPM. Výjimku tvořila skupina α 2-makroglobulinů, kde byl proveden BLAST všech transkriptů proti Ixodida v NCBI databázi. Vybrány byly transkripty, které představovaly již známé TEP proteiny. Další výjimkou byl výběr genu pro GILT, který byl vybrán na základě osobního doporučení a publikace od Dr. Martins, ve které byla exprese GILT ovlivněna infekcí *R. rickettsii* (Martins et al., 2017).

Celkem bylo vybráno 20 kandidátních genů. Následovalo navržení specifických primerů, jejich ověření pomocí PCR a detekce míry exprese vybraných genů po infekci modelovými mikroby pomocí qPCR.

4.1.5 Infekce modelovými mikroby

Bakterie *Micrococcus luteus* (CIP A270) a *Escherichia coli* (1106) byly kultivovány v LB médiu bez antibiotik v třepačce při 37 °C, 220 rpm, přes noc. Kvasinka *C. albicans* (MDM8) byla kultivována v Sabouraud médiu, 220 rpm, při 28 °C přes noc. Poté, co byly mikroby centrifugovány při 3.500 × g po dobu 10 minut, byly dvakrát promyty sterilním PBS pufrem a naředěny na optickou hustotu OD₆₀₀ = 1.

Samice *I. ricinus* sály 5 dní na morčatech, poté byly odebrány. Částečně nasáté samice byly rozděleny do pěti skupin (Ec, Ml, Ca, PBS, NI), z nichž každá skupina obsahovala 5x5 samic. Prvním třem skupinám samic bylo injikováno 69 nl dané mikrobiální suspenze (10⁸ buněk/ml), další skupině 69 nl sterilního PBS pufru (injikační kontrola) pomocí mikroinjikátoru (Drummond) a poslední skupina klíšťat byla ponechána bez vpichu jako kontrola. Samice byly ponechány při pokojové teplotě po dobu 6, 24 a 48 hodin a poté z nich byl vypitván komplex *vzdušnice/tukové těleso*. Z komplexu byla vyzolována RNA, která byla následně přepsána do cDNA. Exprese vybraných genů po injikaci mikrobu v různých časech byla vyhodnocena pomocí metody qPCR.

4.1.6 Izolace RNA

K izolaci RNA byl použit kit NucleoSpin RNA (Macherey Nagel) a postup probíhal podle protokolu výrobce. Ke každému vzorku bylo přidáno 3,5 μl β -merkaptoethanolu. Vzorky byly zhomogenizovány a přepipetovány do nových kolonek umístěných ve sběrných mikrozkuvkách a zcentrifugovány 1 minutu při 11.000 x g. Poté bylo k proteklému roztoku ve sběrných mikrozkuvkách přidáno 350 μl 70% ethanolu. Vzorky byly opět přepipetovány do nových kolonek a následovala centrifugace 30 vteřin při 11.000 x g. Odstranil se supernatant a kolonky se umístily do nových sběrných mikrozkuvek. Ke každému vzorku bylo přidáno 350 μl MDB pufru. Opět následovala centrifugace po dobu 1 minuty při 11.000 x g. Následně bylo ke každému vzorku přidáno 95 μl směsi rDNázy a rDNázového reakčního pufru. Vzorky se inkubovaly 15 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byly vzorky promývány postupně 200 μl pufru RAW2, 600 μl pufru RA3 a 250 μl pufru RA3. Mezi každým promytím byly vzorky centrifugovány nejprve 2x po dobu 30 vteřin při 11.000 x g a naposledy 2 minuty též při 11.000 x g. Kolonky byly umístěny do nových mikrozkuvek a následovalo přidání 40 μl RNA-free vody. Vzorky byly centrifugovány 1 minutu při 11.000 x g. Koncentrace získané RNA byla kvantifikována na NanoDropu a poté byla RNA uschována v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další použití.

4.1.7 Reverzní transkripce

K reverzní transkripci byl použit kit „High fidelity cDNA synthesized transcript“ (Roche) a postup probíhal podle protokolu výrobce.

Vzorky byly rozmrazeny na ledu. Nejprve se připravil template-primer mix do zkumavek eppendorf o objemu 0,2 ml. Do každé zkumavky byl přidán 1 μl primeru Anchored-oligo (dT)₁₈ Primer (50 pmol / μl). Následně byla přidána RNA o koncentraci 1,5 μg . Jako poslední byla přidána voda, jejíž množství se lišilo pro každý vzorek tak, aby konečný objem směsi byl 11,4 μl . Následovala inkubace v cycleru při 65 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut, čímž došlo k denaturaci možných sekundárních RNA struktur. Mezitím byl namíchán MasterMix, který obsahoval chemikálie uvedené v tabulce (Tabulka I).

Tabulka I: Reagenty použité pro reverzní transkripci.

Chemikálie	Objem na 1 vzorek
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer 5x conc.	4 μ l
Protector RNase Inhibitor, 40 U/ μ l	0,5 μ l
Deoxynucleotide Mix, 10 mM	2 μ l
DTT	1 μ l
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1,1 μ l

Ke každému vzorku bylo přidáno 8,6 μ l MasterMixu, celkový objem směsi byl tak 20 μ l. Zkumavky se směsí byly umístěny do cycleru a následovalo spuštění programu uvedeného v následující tabulce (Tabulka II).

Tabulka II: Program pro reverzní transkripci.

Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [min]
50	40
85	5
4	∞

4.1.8 Polymerázová řetězová reakce (PCR) a qPCR

4.1.8.1 PCR a elektroforéza

Funkčnost navržených primerů byla vyhodnocována pomocí PCR reakce, která byla prováděna v přístroji T100 Thermal cycler (Bio-Rad). Objem jedné PCR reakce byl 10 μ l, objemy činidel jsou uvedeny v Tabulce III. Délky trvání jednotlivých kroků a teploty jsou uvedeny v Tabulce IV. Jako templát pro PCR reakci byla použita cDNA z komplexu *vzdušnice/tukové těleso* z klíčtčích samic, které sály pět dní na hostiteli.

Výsledky amplifikace vybraných genů byly ověřeny elektroforeticky na 2% agarózovém gelu smíchaném s ethidium bromidem (1,5 μ g/ml) a připraveném rozpuštěním agarózy (VWR Chemicals) v 1x TAE pufru (40 mM Tris-acetát, 1mM EDTA, pH 8,0). Elektroforéza

probíhala při napětí 100 V po dobu 30 minut. Výsledky byly vizualizovány pod UV světlem a molekulová velikost byla určena podle 100 bp DNA ladderu (Thermo Fisher Scientific).

Tabulka III: PCR reakční směs.

Činidlo	Objem [μ l]
FastStart PCR Master (Roche)	5
primer F (10 μ M)	0,5
primer R (10 μ M)	0,5
Nuclease-free H ₂ O (Top-Bio)	3
cDNA	1

Tabulka IV: PCR amplifikační program.

Proces	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [min]	Počet cyklů
Iniciace	95	10	1x
Denaturace	95	0,50 (30 s)	40 x
Nasedání primerů	60	0,50 (30 s)	
Elongace	72	1	
Finální elongace	72	10	1x
Ochlazení	12	∞	1x

4.1.8.2 qPCR

Relativní exprese vybraných genů z komplexu *vzdušnice/tukové těleso* z klíštěte *I. ricinus* byla stanovena pomocí qPCR a vztažena k relativnímu množství klíštěcího elongačního faktoru (*ef*). Reakční směs obsahovala činidla uvedené v Tabulce V, qPCR probíhala v přístroji QuantStudio 6 (Applied Biosystems) podle programů viz Tabulka VI. Referenčním genem pro normalizaci testovaných vzorků byl gen pro klíštěcí *elongační faktor* (Tabulka VII).

Tabulka V: qPCR reakční směs.

Činidlo	Objem [μl]
LC SYBR Master (Roche)	5
<i>primer F</i> (10 μM)	0,5
<i>primer R</i> (10 μM)	0,5
Nuclease-free H ₂ O (Top-Bio)	2
cDNA	2

Tabulka VI: qPCR amplifikační program pro vybrané klíčící geny.

Proces	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Preinkubace	95	10	1x
Denaturace	95	0,33 (20 s)	50 x
Nasedání primerů	60	0,33 (20 s)	
Elongace	72	0,50 (30 s)	

Tabulka VII: Sekvence primeru pro klíčící *elongační faktor*.

Organismus	Gen	Sekvence primeru
<i>I. ricinus</i>	<i>Elongační faktor (ef)</i>	ACGAGGCTCTGACGGAAG
		CACGACGCAACTCCTTCAC

Primery použité v prvním experimentu pro relativní kvantifikaci vybraných genů byly navrženy za použití programu Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>) s nastavením: Primer size: 19-20-21; Primer Tm: 59-60-60; Product Size Ranges: 100-150; a jsou uvedeny v Tabulce VIII.

Tabulka VIII: Použité primery; F = forward primer; R = reverse primer.

Organismus	Kód	Gen	Sekvence primeru (5' - 3')	
<i>I. ricinus</i>	Irseq_2301	Ira2M-1	AGGTGAACGAAACAGCACCT	F
			CTTCCAGAAGGGCCACAA	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_2740	Ira2M-2	GAGCTGACACCCCTGACCT	F
			CGACTGATAAGCTTGCTGGA	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_7286	Ira2M-3	GGGAGTCCCGTGTCTCAGTAGA	F
			AGGTAGTCGAGCACAAAGACG	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_86235	IrC3-1	TGGATGTGGGTCTCTTGACA	F
			TCCGACGTGTCAGTTCGTAG	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_64926	IrC3-2	GGCTCTCGTAAGCAACCTCA	F
			TACTGTCAAGTCGGCCATGT	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_2599	IrC3-3	ACGAGCGCATTAAACGTGAC	F
			TGAGAACCTGGAATGCCTCT	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_35410	IrMCR-2	CAACGTGGAGACCACATCCT	F
			TGTTGAGCCACTCGACAATC	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_99963	Defensin-Ir	GGAGAAAAACAGCTCGTTTCG	F
			TTCAGAAAATTGCCGCAGTA	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_7363, Irseq_7376	Mikroplusin (Ricinusin)	GCTCTCTCGCACTCTTCGTT	F
			GCGTCATCAAGATGGCAGTA	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_11954	GILT	AGGTGCCGAGTACAAAATGG	F
			GACACTGGGGTCAGGATGAT	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_65361	ML-doménový protein	TGTTGACAAGGTCCTGGTG	F
			CTTGGCTGCACTTGACGTTT	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_93341	Ixoderin A	AGGGAACATCGGTCTATTGC	F
			TGGCCTCTGTTCTGAATAACG	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_11758	P-selektin	CTCGAACACCTGACAACCGA	F
			ATCTCTACGCGCTTGGACAC	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_33269	Lektin	ACAGCTAGGTCCCGTGTGTTG	F
			CCGAAATGTAAGGGTGGCCA	R

<i>I. ricinus</i>	seqSigP-126925	8.9 kDa protein	CATTGCAACGCGTACCTCAG	F
			CAACCTACTCCGACCCCAAC	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_1829	TIL-doménový protein	TGTGGAGAGAACGAGGTTGC	F
			ACCATGGTCACAGTAGCAGC	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_2155	CLIP-doménový protein 1	GTCCTGTTACACCCCTGACG	F
			TACTTGGCTACCCGGACGTA	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_71524	CLIP-doménový protein 2	GACGACAACACCCTTCCCAT	F
			GAGACCTCCTTGCTCAGCTC	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_7589	Faktor B	CAAAGTATGCTGAAGCCAAGG	F
			GACGACGCCCTGCATTAG	R
<i>I. ricinus</i>	Irseq_63790	LPS-indukovaný transkripci regulující TNF α	ATGGGTTGCTGCCTCATTCC	F
			AAAGTCGTCGGTAGGTGCAG	R

4.2. Experiment 2 – RNA interference Cactusu 1 a *in vitro* fagocytóza

4.2.1 Injikace dsRNA do samic *I. ricinus*

Dvouvláknová RNA (dsRNA) byla připravena podle zavedeného protokolu v naší laboratoři (Buresova et al., 2009). Pomocí mikroinjikátoru (Drummond) bylo do 25 nenasátých samic *I. ricinus* injikováno 350 nl dsRNA (3 µg/µl). Bylo použito několik skupin dsRNA: GFP jako kontrola, dsRNA pro Relish 1 (Rel1) a dsRNA pro Cactus 1. Samice byly po vpichu ponechány jeden den při pokojové teplotě ve vlhké komůrce a poté pět dní sály na morčatech.

4.2.2 Příprava bakterií pro *in vitro* fagocytární eseje

Byly vybrány tři modelové mikroorganismy – *Staphylococcus aureus* jako zástupce grampozitivních bakterií, *Escherichia coli* jako zástupce gramnegativních bakterií a *Candida albicans* jako zástupce kvasinek.

Bakterie *S. aureus* a *E. coli* byly kultivovány v 10 ml tekutého LB média, při teplotě 37 °C, 220 rpm v třepačce, přes noc. Po 24 hodinách byla bakteriální kultura centrifugována 7 minut při 3.500 x g a byl odstraněn supernatant. Pelet byl rozsuspendován v 10 ml PBS pufru a vzorky byly centrifugovány 7 minut při 3.500 x g. Supernatant byl znovu odstraněn a pelet byl zředěn v 5 ml PBS. Po zvortexování vzorků byla změřena jejich optická hustota na spektrofotometru (Bio Photometr Eppendorf). Bakterie byly naředěny na optickou hustotu (O.D. = 0,1). Přesná koncentrace bakterií v 1 ml promyté kultury byla zjištěna nanesením zředěné suspenze na agarové plotny, které byly umístěny do termostatu nastaveném na 37 °C a byly ponechány růst do druhého dne. Následně byly spočítány narostlé kolonie.

4.2.3 Fagocytární eseje

Pro odlišení adherovaných a zfagocytovaných bakterií bylo použito dvojí značení pomocí protilátek. Kvasinky *C. albicans* byly předem naznačené fluorescenčním isothiokyanátem (FITC) stejně jako v předchozích experimentech v naší laboratoři (Urbanova et al., 2015).

Polonasáté samice *I. ricinus*, u kterých byl vypnut gen pro Cactus 1 a kontrolní GFP skupina, byly omyty 70% ethanolem a po ustříhnutí končetiny jim byla odebrána hemolymfa do směsi média L15 (Biosera) a inaktivovaného bovinního séra (PAA Laboratories, koncentrace 10 %, inaktivace při 56 °C, 30 min). Následně byl spočítán počet odebraných hemocytů v Bürkerově komůrce. Na dno jamek 24 jamkové destičky se umístila kulatá krycí sklíčka. Do každé jamky bylo přidáno 2×10^4 hemocytů. Celkový objem byl doplněn do 240 µl médiem L15. Poté bylo přidáno 10 µl bakterií (OD = 0,1) nebo kvasinek (2×10^5). Hemocyty spolu s přidanými

mikroby byly inkubovány ve vlhké komůrce 2 hodiny, v případě kvasinek při 32 °C, v případě bakterií při 28 °C. Po uběhnutí inkubační doby byla provedena fixace 4% paraformaldehydem (PF), přičemž do každé jamky byl přidán objem 200 µl a vzorky byly fixovány 20 minut při pokojové teplotě na třepačce. Následně bylo vše 3x promyto PBS pufrem po 5 minutách. Nespecifické vazby byly vyblokovány inkubací v 1% BSA v PBS po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Poté bylo ke vzorkům přidáno 200 µl primární protilátky (Rb α -*E. coli*, Rb α -*S. aureus*) naředěné v PBS v poměru 1:100, se kterou byly vzorky inkubovány 1 hodinu při pokojové teplotě. Po inkubaci bylo vše 3x promyto po 7 minutách v PBS. Poté bylo do jamek přidáno 200 µl fluorescenčně značené sekundární protilátky Alexa 594 (goat anti-rabbit IgG) naředěné v poměru 1:500 v PBS a vzorky byly inkubovány 1 hodinu. Opět následovalo 2x promytí v PBS (2x5 min). Po tomto kroku se postup lišil podle daného mikrobu.

U vzorků s *C. albicans* následovalo obavení buněčných jader – inkubace 7 minut v DAPI barvivo 10.000x naředěném v PBS. Preparáty byly nakonec promyty v PBS 2x po 3 minutách.

U *S. aureus* a *E. coli* byly buňky permeabilizovány pomocí 1% BSA v 0,5% PBS-Tritonu 100 (PBS-Tx), při 4 °C, přes noc. Následující den byla přidána primární protilátka (viz výše) ředěná v poměru 1:200 v 0,1% PBS-Tx a vzorky byly ponechány 1 hodinu na třepačce, 220 rpm. Vše bylo promyto pomocí 0,1% PBS-Tx 3x po 7 minutách. Poté byla přidána sekundární protilátka (Alexa 488, 1:500 v 0,1% PBS-Tx), inkubace 1 hodinu. Následovalo promytí sklíček pomocí 0,1% PBS-Tx. Jádra buněk byla dobarvena pomocí DAPI po dobu 7 minut.

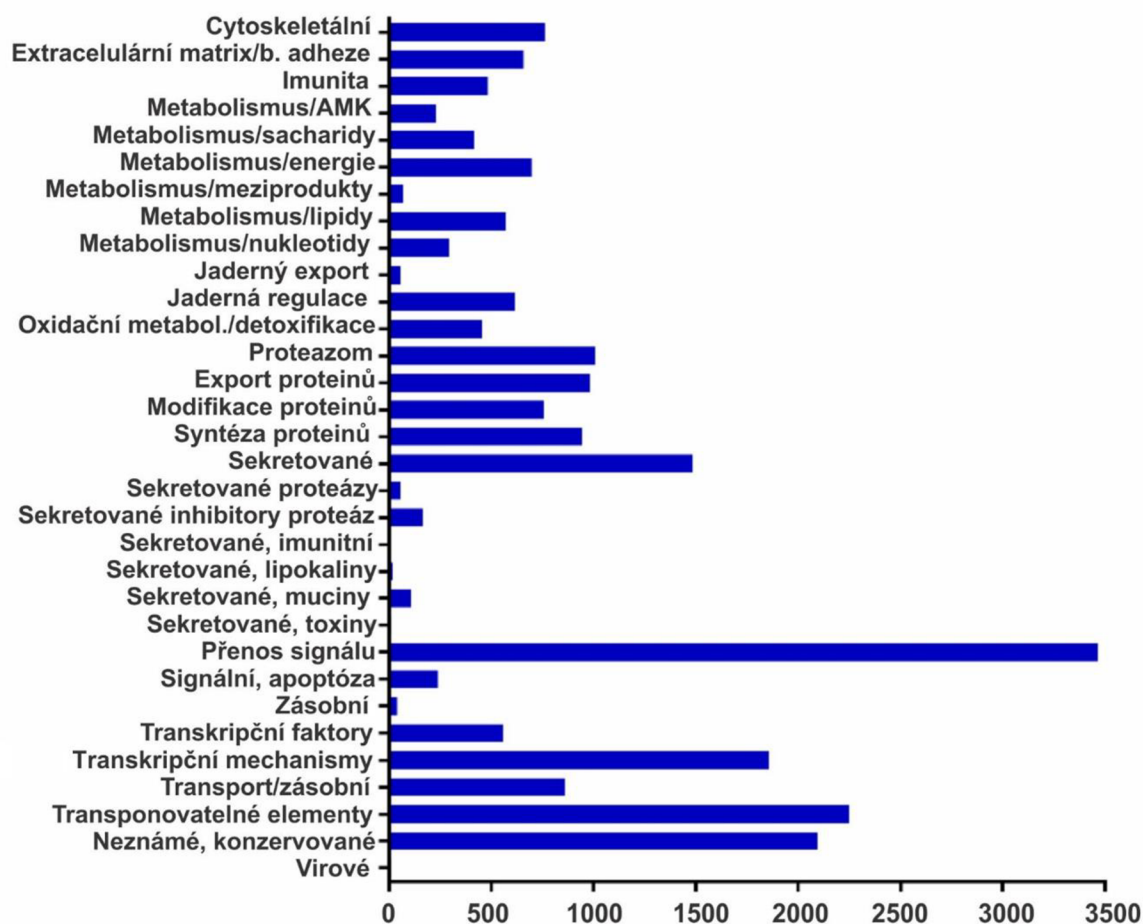
Krycí sklíčka byla vyjmuta z destičky, zalita médiem Fluoromount (Sigma-Aldrich) a umístěna na podložní sklíčko. Preparáty byly vyhodnoceny na fluorescenčním mikroskopu (Olympus BX53) za použití příslušných filtrů. Fotografie byly pořízeny kamerou DP73 v programu CellSens a případně upraveny v programu Adobe Photoshop CS6. Na každém sklíčku bylo počítáno 100 hemocytů. Pro každou skupinu bylo hodnoceno nejméně 16 vzorků pro GFP skupinu a 25 pro skupinu s umlčeným genem pro Cactus 1. Fagocytární eseje byly provedeny ve třech nezávislých opakováních.

5 Výsledky a diskuze

5.1 Experiment 1: Detekce a charakterizace imunitních genů v komplexu vzdušnice/tukové těleso

5.1.1 Výsledky transkriptomové analýzy

Transkriptomovou analýzu provedla laboratoř North Carolina State Genomic Sciences Laboratory (Raleigh, NC, USA). Dr. José M. Ribeiro a Dr. Larissa Martins (Laboratory of Malaria and Vector Research, NIAID, NIH, Bethesda, Maryland, USA) zpracovali v rámci spolupráce hrubá data a poskytli upravené soubory pro finální výběr kandidátních genů. Celkem bylo identifikováno přibližně 45.000 kontigů, z nichž asi 1 % (celkem 484) bylo označeno jako geny související s imunitou (Obrázek 3).



Obrázek 3: Funkční klasifikace transkriptů z komplexu vzdušnice/tukové těleso klíštěte *I. ricinus*; Na ose x je znázorněno množství kontigů, na ose y funkční klasifikace; Graf neobsahuje všechny skupiny transkriptů nalezené v transkriptomu.

K další analýze bylo vybráno dvacet nejvíce exprimovaných imunitních genů v komplexu *vzdušnice/tukové těleso* z různých skupin. Velké množství z nich patří do skupiny genů souvisejících s komplementem (celkem 8). V transkriptomu se nacházel hojně zastoupený jeden AMP ze skupiny defensinů. V různých tkáních klíštěte je exprimováno mnoho dalších defensinů. Dále byl z AMP vybrán jeden mikroplusin – ricinusin, jehož průměrná hodnota TPM byla jedna z nejvyšších. Ve výběru se též ocitli tři kandidáti ze skupiny lektinů, dvě serinové proteázy (CLIP-doménový protein 1 a 2), ML-doménový protein a další geny anotované jako imunitní. Vybrané geny jsou vypsány v následující tabulce (Tabulka IX).

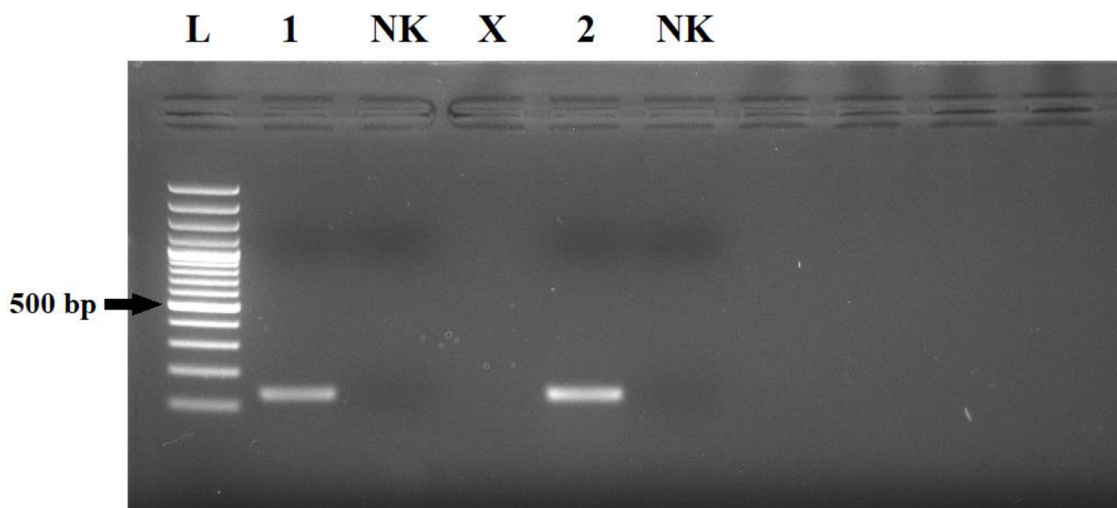
Tabulka IX: Seznam vybraných imunitních genů z transkriptomu *vzdušnice/tukové těleso*.

Skupina	Název	Hodnota Avg TPM
Proteiny obsahující thioester (TEP) a proteiny spojené s komplementem	Ir α 2M-1	338,01
	Ir α 2M-2	291,73
	Ir α 2M-3	19,11
	IrMcr-2	6,45
	IrC3-1	182,12
	IrC3-2	35,34
	IrC3-3	17,86
	Faktor B/C2 (IrC2/Bf)	80,90
AMP	Mikroplusin (Ricinusin)	4706,18
	Defensin-Ir	47,07
Lektiny	Ixoderin A	4,58
	P-selektin	54,99
	Lektin	36,97
Pravděpodobně imunitní geny	ML-doménový protein	683,55
	LPS-indukovaný transkripci regulující TNF α	15,29
	GILT super rodina	16,21
	CLIP-doménový protein 1	92,90
	CLIP-doménový protein 2	11,78
Ostatní hojně	TIL-doménový protein	19750,30
	8,9 kDa protein, SVWC rodina	8310,41

Hodnota TPM (Transcripts Per Milion) v tabulce je relativní hodnotou exprese, která umožňuje porovnání mezi skupinami, a Avg TPM představuje průměr ze čtyř TPM hodnot. Mezi kandidáty s nejvyšší hodnotou Avg TPM v transkriptomu patřili: TIL-doménový protein, 8,9 kDa protein a mikroplusin.

5.1.2 Experimentální infekce patogeny

Funkčnost navržených primerů pro jednotlivé geny byla otestována pomocí PCR amplifikace a gelové elektroforézy. Na následujícím obrázku (Obrázek 4) je znázorněna exprese genu pro TIL-doménový protein v komplexu *vzdušnice/tukové těleso* v částečně nasátých samicích *I. ricinus*.



Obrázek 4: Ověření exprese TIL-doménového proteinu v komplexu *vzdušnice/tukové těleso*; Fotografie elektroforetického gelu znázorňující funkční primery pro TIL-doménový protein.; L = ladder (100 bp), 1,2 = cDNA z komplexu *vzdušnice/tukové těleso* z 5denních samic, NK = negativní kontrola, X = žádný vzorek. Velikost získaného produktu je 130 bp.

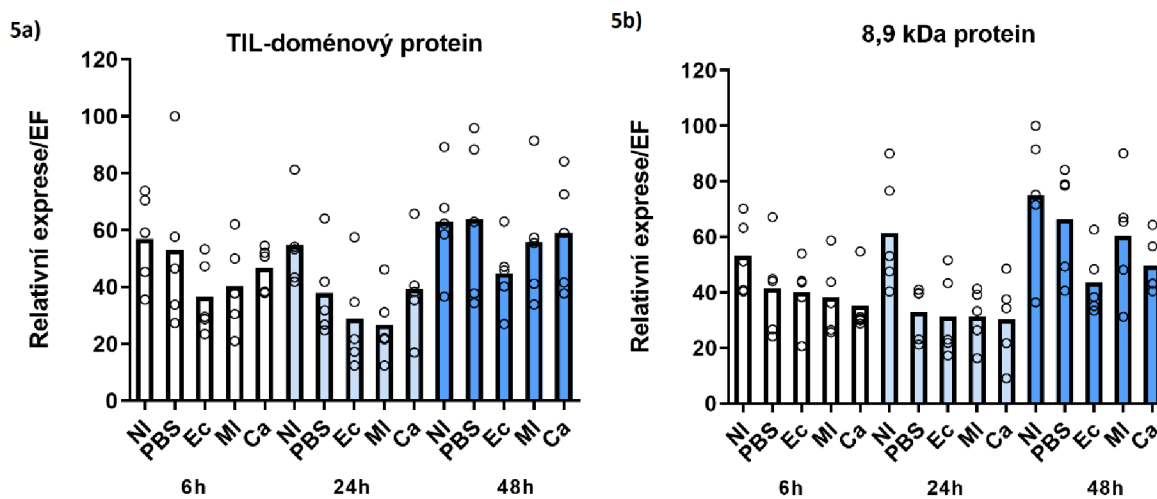
Infekce modelovými patogeny byla provedena za účelem ověření role vybraných genů v imunitě. Imunitní odpověď na infekci modelovými mikroby znázorňuje tabulka níže (Tabulka X). Exprese jednotlivých genů v komplexu *vzdušnice/tukové těleso* v různých časových intervalech a po infekci různými mikroby byla vyhodnocena pomocí qPCR metody. Výsledná relativní exprese vybraného genu byla vztažena k expresi genu pro klíčecí elongační faktor (*ef*).

Tabulka X: Míra exprese vybraných genů po infekci modelovými patogeny.

Skupina	Název	6 h					24 h					48 h					Graf
		NI	PBS	E.c.	M.I.	C.a.	NI	PBS	E.c.	M.I.	C.a.	NI	PBS	E.c.	M.I.	C.a.	
Ostatní hojně	TIL-doménový protein																Obr. 5
	8.9 kDa protein, SVWC rodina																Obr. 5
Pravděpodobně imunitní geny	ML-doménový protein																Obr. 6
	LPS-indukovaný transkr. regulující TNF α			■		■			■	■	■						Obr. 6
	CLIP-doménový protein 1			■					■								Obr. 6
	CLIP-doménový protein 2			■	■												Obr. 6
	GILT super rodina																Obr. 6
AMP	Defensin-Ir			■	■				■								Obr. 7
	Mikroplusin (Ricinusin)																Obr. 7
Lektiny	Ixoderin A								■								Obr. 8
	P-selektin																Obr. 8
	Lektin																Obr. 8
Proteiny obsahující thioester (TEP) a proteiny spojené s komplementem	Ir α 2M-1								■								Obr. 9
	Ir α 2M-2								■								Obr. 9
	Ir α 2M-3			■										■	■		Obr. 9
	IrC3-1								■					■			Obr. 9
	IrC3-2								■		■						Obr. 9
	IrC3-3								■								Obr. 9
	IrMCR-2			■													Obr. 9
	Faktor B (IrC2/Bf)								■					■			Obr. 9

Světle červeně je označená signifikantní změna exprese s $p < 0,05$; červeně je označená signifikantní změna exprese s $p < 0,01$; tmavě červeně je označená signifikantní změna exprese s $p < 0,001$; NI = neinjikovaná klíšťata; PBS = skupina injikovaná pouze PBS pufrem; E.c. = *E. coli*; M.l. = *M. luteus*; C.a. = *C. albicans*. Míra exprese vybraného genu v dané skupině byla vždy porovnávána s injikační PBS kontrolou za použití t-testu.

Nejvíce genů reagovalo zvýšením exprese 24 hodin po injikaci mikrobů, značná část již po šesti hodinách. Jen některé reagovaly změnou exprese v pozdější fázi infekce (po 48 hodinách). Nejvyšší imunitní odpověď byla detekována po bakteriální infekci *E. coli*, a to u 13 z 20 vybraných genů zejména 24 hodin po injikaci. Po bakteriální stimulaci *M. luteus* byla výrazně zvýšená exprese u čtyř genů, a po infekci *C. albicans* byla zaznamenána zvýšená míra exprese pouze u tří genů. Expres sedmi imunitních genů nebyla ovlivněna žádným mikroblem. Podrobnější výsledky znázorňují jednotlivé grafy (Obrázek 5-9).



Obrázek 5: Relativní kvantifikace genů pro TIL-doménový protein a 8,9 kDa protein, vztažená ke genu pro klíštěcí *ef*; Na ose x je znázorněno 5 skupin ve třech časových úsecích (6 h, 24 h a 48 h po injikaci), osa y znázorňuje relativní míru exprese; Každý bod představuje skupinu 5 samic; NI = neinjikovaná skupina; PBS = skupina injikovaná PBS; Ec = skupina injikovaná *E. coli*; MI = skupina injikovaná *M. luteus*; Ca = skupina injikovaná *C. albicans*.

U žádného z obou transkriptů výše (Obrázek 5a, 5b) nebyla zaznamenána signifikantní změna exprese po infekci mikroby. Gen pro TIL-doménový protein byl nezávisle na době od infekce a použitým mikrobu exprimován v podobné míře (Obrázek 5a).

Protein CRVP379 ze skupiny TIL-doménových proteinů byl studovaný u komára *A. aegypti* (Tikhe et al., 2022). V dospělých samicích byl nejsilněji exprimovaný ve vaječnicích 2 dny po

sání krve. Expres v tukovém tělese nebyla u tohoto druhu komára detekována. Kromě toho bylo zjištěno, že různé proteiny sdílející TIL doménu se od sebe poměrně výrazně lišily, a jen u zlomku z nich byla skutečně prokázána inhibiční aktivita. Z klíštěcích inhibitorů serinových proteáz s TIL doménou byl studovaný Ixodidin, u něhož byla prokázána antimikrobiální aktivita vůči *E. coli* a *M. luteus* (Fogaca et al., 2006).

U genu pro 8,9 kDa protein (Obrázek 5b) jsme nepozorovali žádnou zvýšenou expresi jako reakci na vpich či na infekci daným mikroblem.

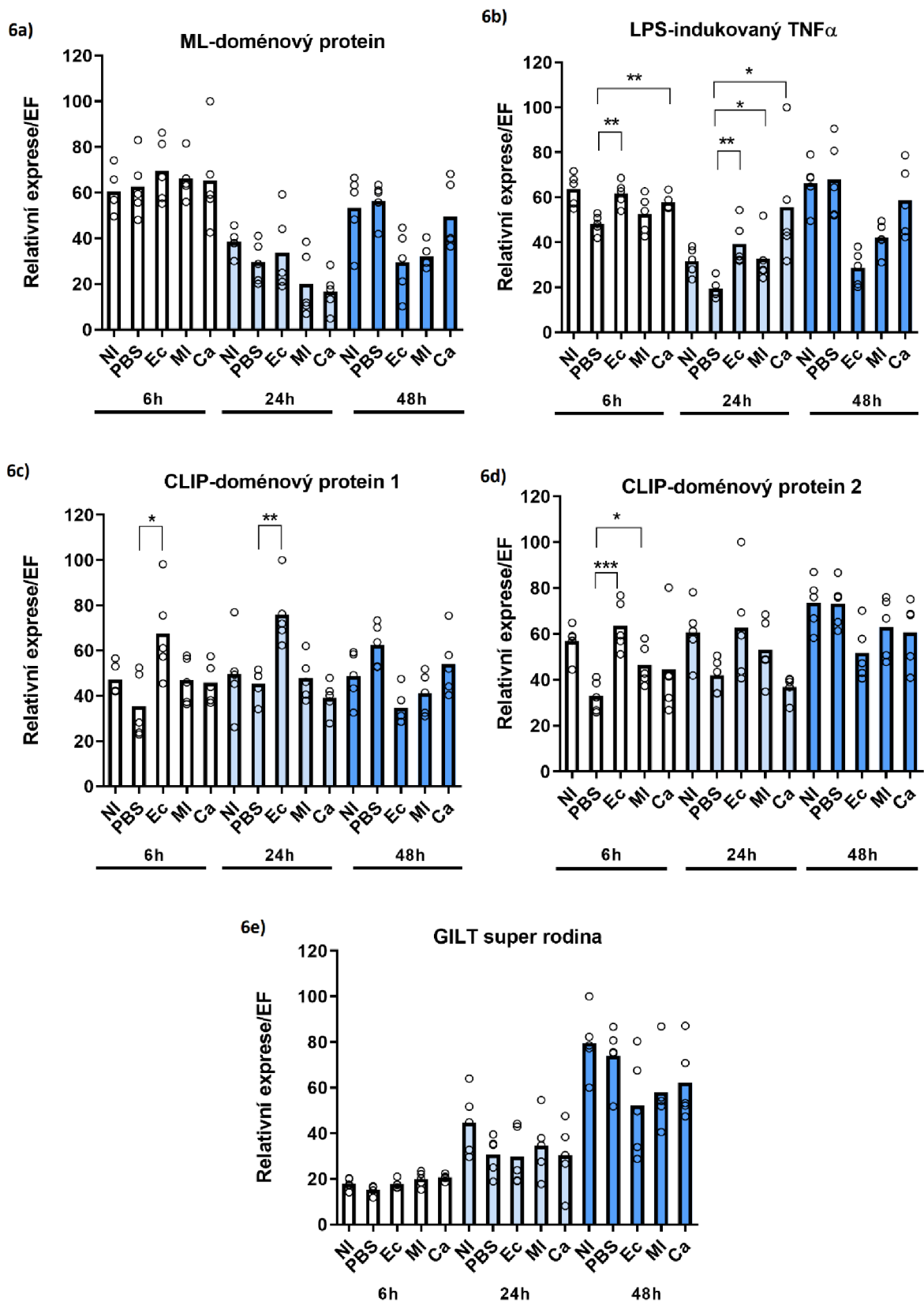
U kraba říčního *Eriocheir sinensis* byla věnována pozornost proteinu EsSVWC ze SVWC rodiny (stejně rodiny jako u 8,9 kDa proteinu) (Qin et al., 2022). Byla pozorována jeho vysoká exprese ve střevě a slinivkojaterní žláze, která se mimo jiné podílí na imunitní obraně organismu (Roszer, 2014). Domněnka, že by EsSVWC mohl mít imunitní funkci, byla potvrzena experimentem, ve kterém vzrostla exprese EsSVWC v hemocytech po bakteriální stimulaci patogeny *S. aureus* a *Vibrio parahaemolyticus*. Dalším studovaným proteinem ze SVWC rodiny je MjVago-L, který vykazoval antivirovou aktivitu a indukoval expresi genu pro MjFicolin a aktivaci JAK/STAT dráhy, což vedlo ke zvýšené odolnosti proti infekci WSSV (white spot syndrome) u krevety *M. japonicus* (Gao et al., 2021).

U genu pro ML-doménový protein (Obrázek 6a) nebyla zaznamenána změna exprese po infekci patogeny, zatímco u genu LPS-indukovaného transkripční regulujícího TNF α (Obrázek 6b) byla signifikantně zvýšená odpověď hned v několika případech, přičemž nejvýraznější změna exprese byla 6 hodin po infekci *E. coli* (1,2x) a *C. albicans* (1,2x) a 24 hodin po infekci *E. coli* (2x).

ML-doménový protein IrML u klíštěte *I. ricinus* byl studovaný Dr. Horáckovou (Horackova et al., 2010). Expres genu pro IrML byla silně stimulována po sání krve u všech vývojových stádií. Gen pro IrML byl exprimovaný především ve střevě, slinných žlázách a v hemolymfě. Ovšem je nutné podotknout, že v publikovaném článku nestudovali expresi tohoto genu v komplexu *vzdušnice/tukové těleso*. ML-doménové proteiny patřily mezi nejabundantnější transkripty ve střevě klíštěte *D. variabilis* (Anderson et al., 2008), rovněž byly detekovány ve střevě *R. microplus* (Kongsuwan et al., 2010), slinných žlázách *O. parkeri* (Francischetti et al., 2008) a v těle *I. scapularis* (de la Fuente et al., 2008b). K objasnění funkce ML-doménových proteinů v imunitě, popřípadě v metabolismu lipidů v různých tkáních klíšťat, bude potřeba dalších studií.

U obou genů kódujících serinové proteázy byla detekována výrazná změna exprese 6 hodin po infekci *E. coli*. Exprese genu pro CLIP-doménový protein 1 zůstala rovněž zvýšena (1,7x) i 24 hodin po infekci (Obrázek 6c). U genu pro CLIP-doménový protein 2 byl pozorován významný nárůst exprese (1,9x) u *E. coli* (6 hodin po injikaci). Exprese byla rovněž mírně zvýšená (1,9x) 6 hodin od infekce bakterií *M. luteus* (Obrázek 6d). Exprese genu pro GILT nebyla ovlivněna žádným mikroblem, nicméně s časem infekce měla vzrůstající tendenci (Obrázek 6e).

CLIP-doménové proteiny byly objeveny a studovány například u komára *A. aegypti* (Wang et al., 2021). Gen pro Ae-CLIPB15 byl nejvíce exprimovaný v tukovém tělese a thoraxu, Ae-CLIP22 především ve střevě. Po infekci *E. coli*, *S. aureus* a *B. bassiana* byla pozorována zvýšená exprese genu pro Ae-CLIPB15 a Ae-CLIPB22. Průkazné bylo i zvýšení exprese těchto dvou genů u skupiny komárů, která byla pouze poraněna, ale nebyla infikována žádným patogenem (po 6 hodinách). K potvrzení imunitní funkce těchto genů, byl proveden další experiment, kdy bylo porovnáváno přežití skupin komárů, u nichž byly pomocí RNAi umlčeny geny pro Ae-CLIPB15 a Ae-CLIPB22 s kontrolní skupinou. Jedinci s umlčenými geny pro CLIP-doménové proteiny měli výrazně sníženou odolnost vůči bakteriální infekci a měli zvýšenou mortalitu. Serinovým proteázám byla též věnována pozornost u ploštice *Rhodnius prolixus* (Salcedo-Porras et al., 2022). Ve studii provedli transkriptomovou analýzu tukového tělesa a identifikovali celkem 66 serinových proteáz, z toho však pouze 9 z nich obsahovalo CLIP doménu. Následně byla analyzována diferenciální exprese genů v tukovém tělese po infekci gramnegativní (*Enterobacter cloacae*) nebo grampozitivní bakterií (*S. aureus*) ve dvou časových bodech (8 hodin a 24 hodin po infekci). Nejvýraznější změna exprese genů tukového tělesa byla detekována 24 hodin po infekci gramnegativní i grampozitivní bakterií. Infekce gramnegativní bakterií vyvolala vyšší expresi AMP souvisejících s IMD signální dráhou a PRR receptorů. Ze serinových proteáz vykazovala změnu exprese pouze rpSP30.



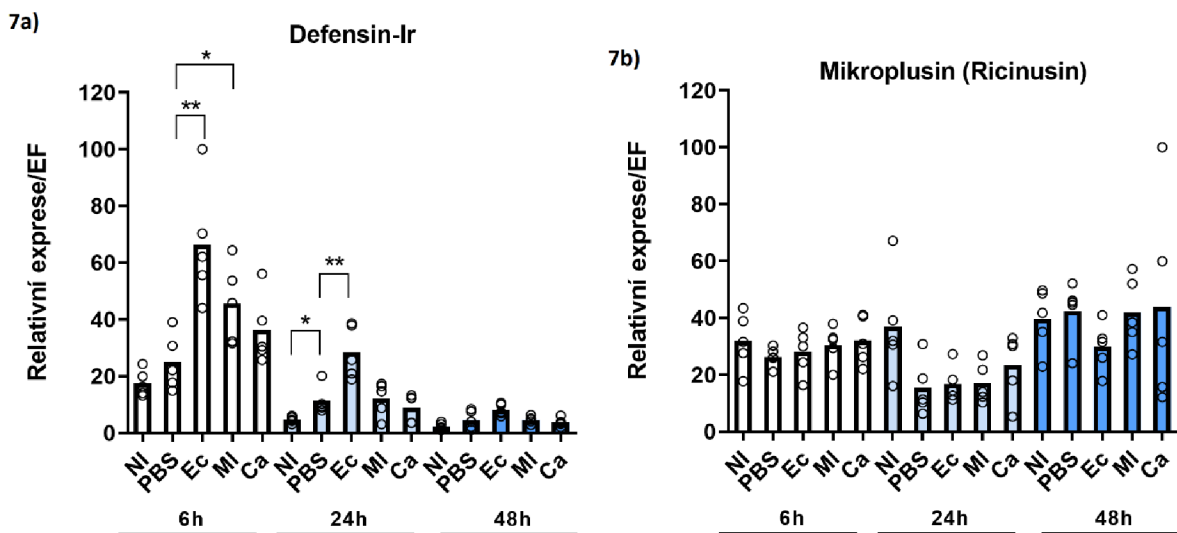
Obrázek 6: Relativní kvantifikace genů anotovaných jako pravděpodobně imunitní, vztažená ke genu pro klíčící *ef*; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,001$; Na ose x je znázorněno 5 skupin ve třech časových úsecích (6 h, 24 h a 48 h po injikaci), osa y znázorňuje**

relativní míru exprese; Každý bod představuje skupinu 5 samic; NI = neinjikovaná skupina; PBS = skupina injikovaná PBS; Ec = skupina injikovaná *E. coli*; Ml = skupina injikovaná *M. luteus*; Ca = skupina injikovaná *C. albicans*.

Ke zvýšení exprese genu pro defensin došlo především po injikaci *E. coli*, a to 6 hodin (2,6x) a 24 hodin (2,5x) od infekce (Obrázek 7a). Exprese byla rovněž zvýšená (1,8x) 6 hodin po infekci *M. luteus*. Taktéž bylo u genu pro defensin detekováno signifikantní zvýšení exprese (2,4x) u PBS skupiny 24 hodin po injikaci oproti neinjikované kontrolní skupině (NI). Tato změna mohla být vyvolána jako odpověď na zranění.

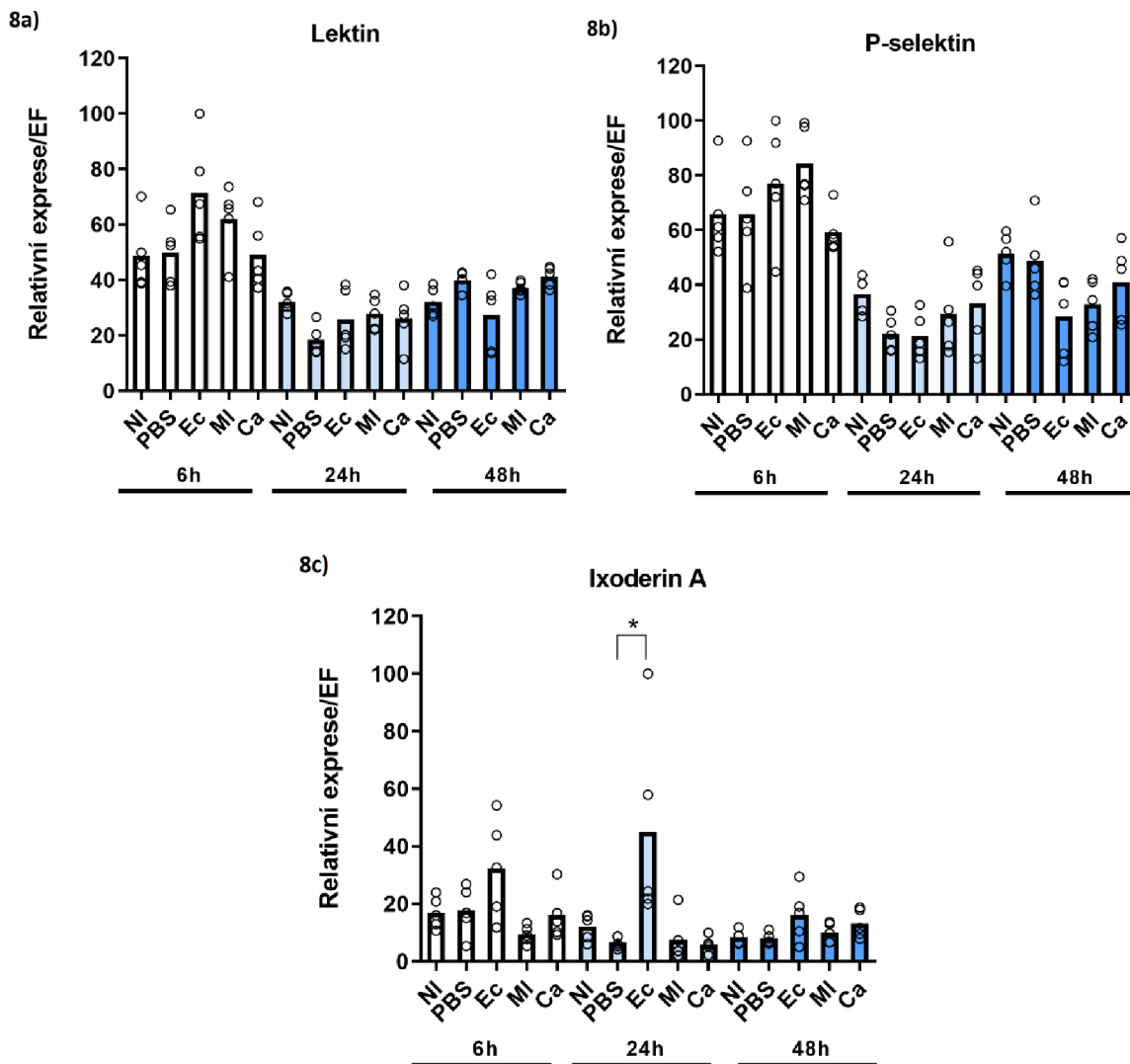
Vliv infekce gramnegativní bakterií *Rickettsia montanensis* na expresi dvou typů defensinů 1 a 2 byl studován u klíštěte *D. variabilis* (Ceraul et al., 2007). Na rozdíl od našeho přístupu (injikace mikrobů do hemolymfy) byla infekce klíšťat provedena pomocí kapilárního sání a významné zvýšení exprese defensinu 2 v tukovém tělese bylo pozorováno až po 72 hodinách. U dospělců ploštice *Coridius chinensis* analýza genové exprese odhalila, že gen pro defensin CcDef2 byl nejhojněji exprimován v tukovém tělese (Gong et al., 2022). Exprese CcDef2 genu byla v tukovém tělese výrazně zvýšená po injikaci směsi bakterií *S. aureus* a *E. coli*. Nejvyšší nárůst exprese (57x) byl detekován 12 hodin po infekci. Tyto výsledky potvrzují, že defensiny jsou vysoce účinné antibakteriální peptidy ve vrozené imunitě.

Oproti defensinu, u ricinusinu nedošlo k významné změně exprese v žádném ze sledovaných časových intervalů (Obrázek 7b). Exprese mikroplusinu byla prokázána ve tkáni tukového tělesa, ale též v hemocytech a vaječnicích klíšťat (Fogaca et al., 2004). Mikroplusin je též exprimovaný ve vajíčkách *R. microplus*, což naznačuje, že může mít obranou funkci nejen v dospělých, ale i ve vajíčkách a během vývoje (Esteves et al., 2009). Je potřeba přiznat, že na rozdíl od mikroplusinů či hebraeinů nebyla dosud u ricinusinů z *I. ricinus* antimikrobiální či bakteriostatická aktivita experimentálně prokázána.



Obrázek 7: Relativní kvantifikace genů pro AMP, vztažená ke genu pro klíčtější *ef*; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; Na ose x je znázorněno 5 skupin ve třech časových úsecích (6 h, 24 h a 48 h po injikaci), osa y znázorňuje relativní míru exprese; Každý bod představuje skupinu 5 samic; Každý bod představuje skupinu 5 samic; NI = neinjikovaná skupina; PBS = skupina injikovaná PBS; Ec = skupina injikovaná *E. coli*; MI = skupina injikovaná *M. luteus*; Ca = skupina injikovaná *C. albicans*.

U genů pro lektin a P-selektin nedošlo k průkazné změně exprese (Obrázek 8a, 8b). U genu pro Ixoderin A (Obrázek 8c) byla míra exprese obecně nižší než u zbytku genů, což je v souladu s hodnotami TPM z transkriptomu, které byly jedny z nejnižších mezi vybranými kandidáty. Nicméně došlo k téměř sedminásobnému (6,8x) nárůstu exprese 24 hodin po infekci *E. coli*. V naší dřívější studii (Honig Mondekova et al., 2017) zaměřené na expresi ixoderinů v klíčtější *I. ricinus*, vzrostla 3,4x exprese Ixoderinu A po injikaci PBS, zřejmě jako reakce na vpich. Avšak exprese v této studii byla měřena 12 hodin po infekci v nenasátých samicích (celá těla). Lehké zvýšení exprese bylo pozorováno také po infekci *C. albicans* a gramnegativní *Borrelia*. Významné zvýšení exprese po injikaci *E. coli* bylo pozorováno u Ixoderinu B, který je exprimován ve slinných žlázách. (Honig Mondekova et al., 2017).



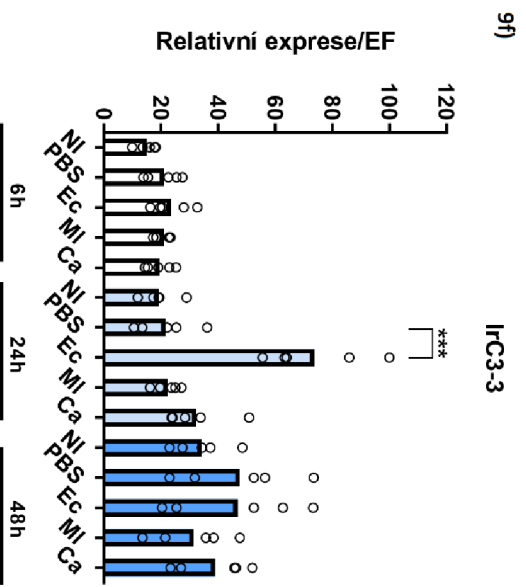
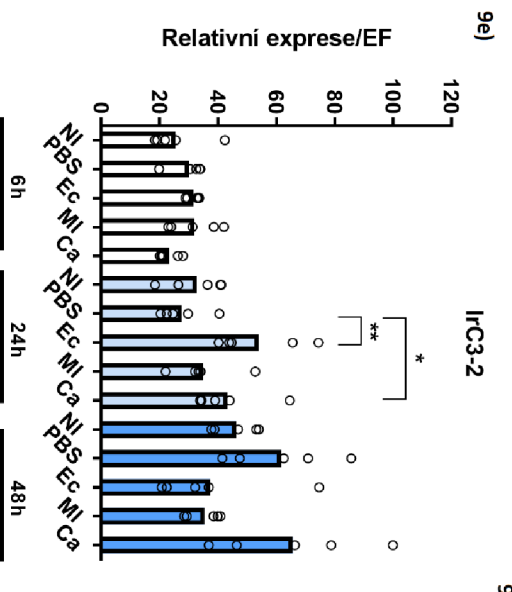
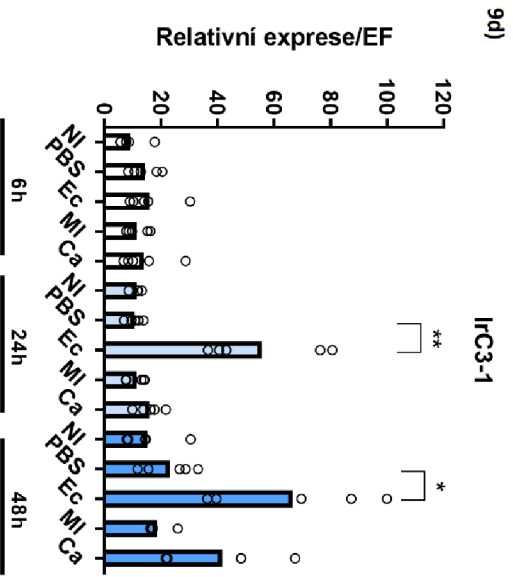
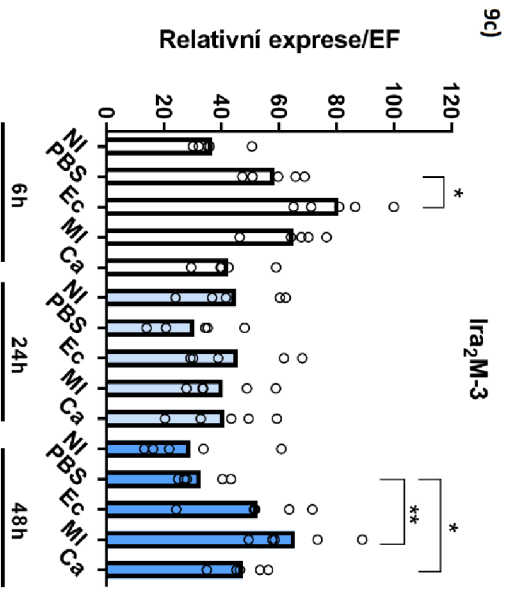
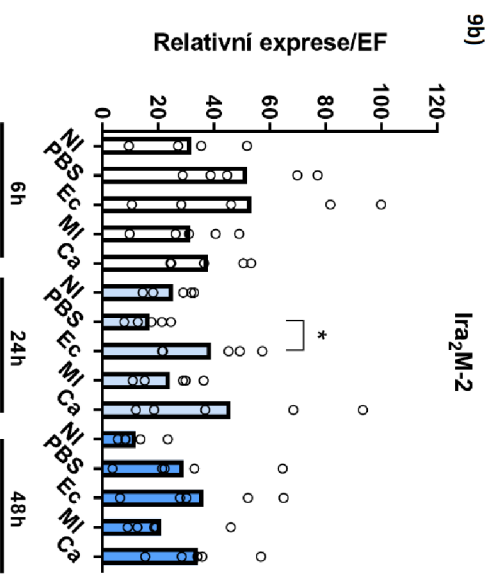
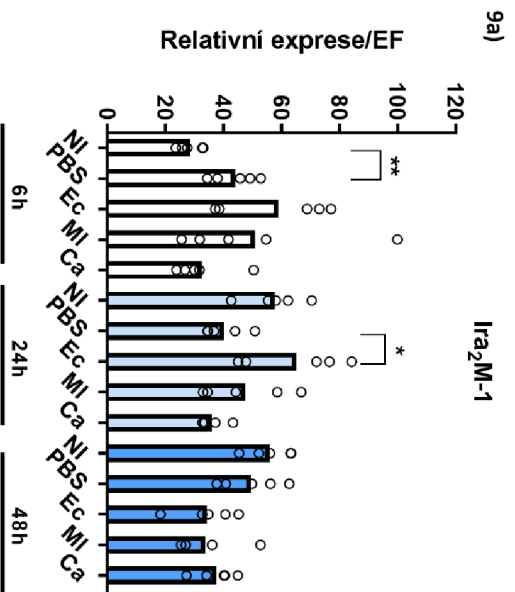
Obrázek 8: Relativní kvantifikace genů pro lektiny, vztažená ke genu pro klíčecí *ef*; * = $p < 0,05$; Na ose x je znázorněno 5 skupin ve třech časových úsecích (6 h, 24 h a 48 h po injikaci), osa y znázorňuje relativní míru exprese; Každý bod představuje skupinu 5 samic; NI = neinjikovaná skupina; PBS = skupina injikovaná PBS; Ec = skupina injikovaná *E. coli*; MI = skupina injikovaná *M. luteus*; Ca = skupina injikovaná *C. albicans*.

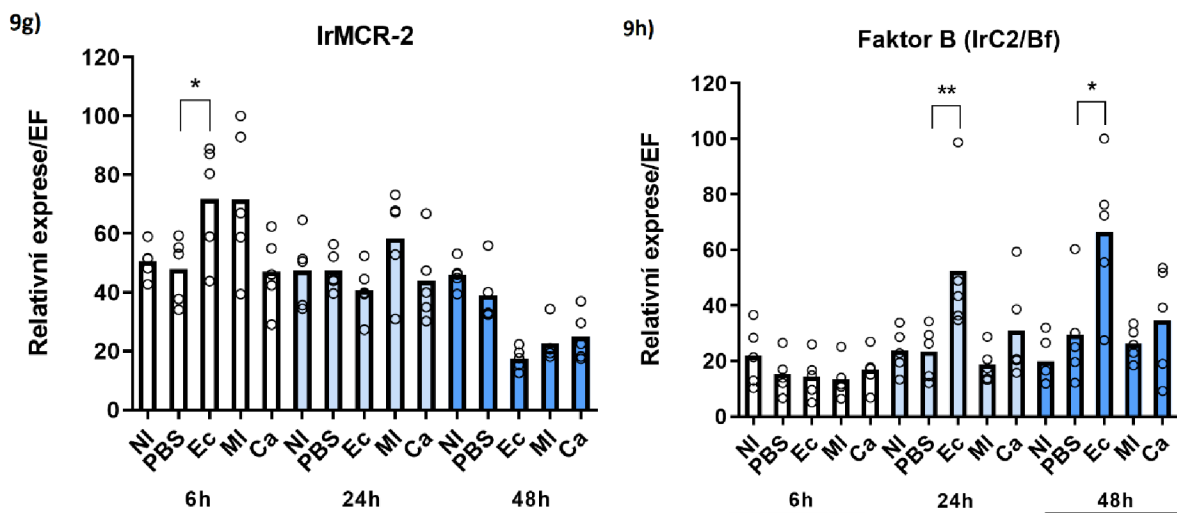
U genů pro *Irα2M-1* a *2* bylo zaznamenáno mírné zvýšení exprese (1,6x a 2,3x) 24 hodin po infekci bakterií *E. coli* (Obrázek 9a, 9b). Gen pro *Irα2M-1* byl navíc exprimován i po vpichu PBS (1,5x), tedy jako reakce na zranění. U genu pro *Irα2M-3* došlo k mírnému nárůstu (1,4x) exprese 6 hodin po infekci *E. coli*, v pozdější fázi infekce (48 hodin) bylo detekováno signifikantní zvýšení exprese u *M. luteus* (2x) a *C. albicans* (1,4x) (Obrázek 9c). U genu pro *IrC3-1* byla detekována změna exprese též v pozdějších fázích infekce (24 a 48 hodin – nárůst 5,2x a 2,9x), ale pouze u *E. coli* (Obrázek 9d). U genu pro *IrC3-2* vzrostla míra exprese 24 hodin po infekci *E. coli* (2x) a *C. albicans* (1,6x) (Obrázek 9e). Nejsignifikantnější zvýšení

exprese (3,4x) bylo pozorováno u genu pro IrC3-3 24 hodin po infekci *E. coli* (Obrázek 9f). Gen kódující IrMCR-2 vykazoval průkaznou změnu exprese (zvýšení 1,5x) 6 hodin po injikaci *E. coli* (Obrázek 9g). Exprese Faktoru B (IrC2/Bf) byla zvýšená 24 hodin (2,3x) a 48 hodin od infekce *E. coli* (Obrázek 9h). Obecně lze říci, že u všech proteinů souvisejících s komplementem se projevila signifikantní změna exprese, a to především jako reakce na infekci *E. coli*.

Velmi zajímavé je porovnání s výsledky z naší dřívější studie (Urbanova et al., 2015), která kromě dalších experimentů také zkoumala expresi klíčových TEP proteinů po injikaci stejných modelových mikrobů. Ve zmíněném experimentu bylo největší zvýšení exprese pozorováno u Ir α 2M-1 a IrC3-1 po infekci kvasinkou *C. albicans*. Mírné zvýšení exprese bylo též pozorováno u Ir α 2M-2 po vpichu a jako reakci na infekci *C. albicans*. Na kvasinku také reagoval zvýšením exprese gen pro IrC3-1. Oproti tomu v našich výsledcích u IrC3-1 byla obecně nižší míra exprese, která významně vzrostla jako reakce výhradně na *E. coli*. Dalším rozdílem mezi studiemi je reakce IrC3-2, kdy v předchozí studii naší laboratoře (Urbanova et al., 2018) byla pozorována jen mírná neprůkazná vyšší exprese u PBS skupiny jako reakce na vpich. IrC2/Bf po infekci kvasinkou *C. albicans* vykazoval zvýšenou expresi, což není v souladu s našimi výsledky, jelikož u infekce *C. albicans* nebyla detekovaná vyšší míra exprese tohoto genu. Je však třeba zmínit, že ve studii Urbanové se analýza exprese těchto genů týkala nenasátých samic po 12 hodinách od injikace a exprese byla měřena v celých tělech *I. ricinus*, což může být důvodem získání odlišných výsledků.

Naše výsledky lze rovněž porovnat s transkriptomovou studií na *D. variabilis* od Dr. Jaworski (Jaworski et al., 2010). Práce se věnovala expresi imunitních genů po infekci různými bakteriemi a kvasinkami. Exprese obou α 2M proteinů byla zvýšená po infekci *E. coli* a ze zástupců grampozitivních bakterií – *Bacillus subtilis* a *M. luteus*. Podobná situace byla pozorována i u ostatních vybraných genů, např. Factor D-like proteinu a defensinu Varisinu B. Nicméně transkriptomová analýza byla v této studii také provedena z celých klíšat, a ne z konkrétní tkáně.





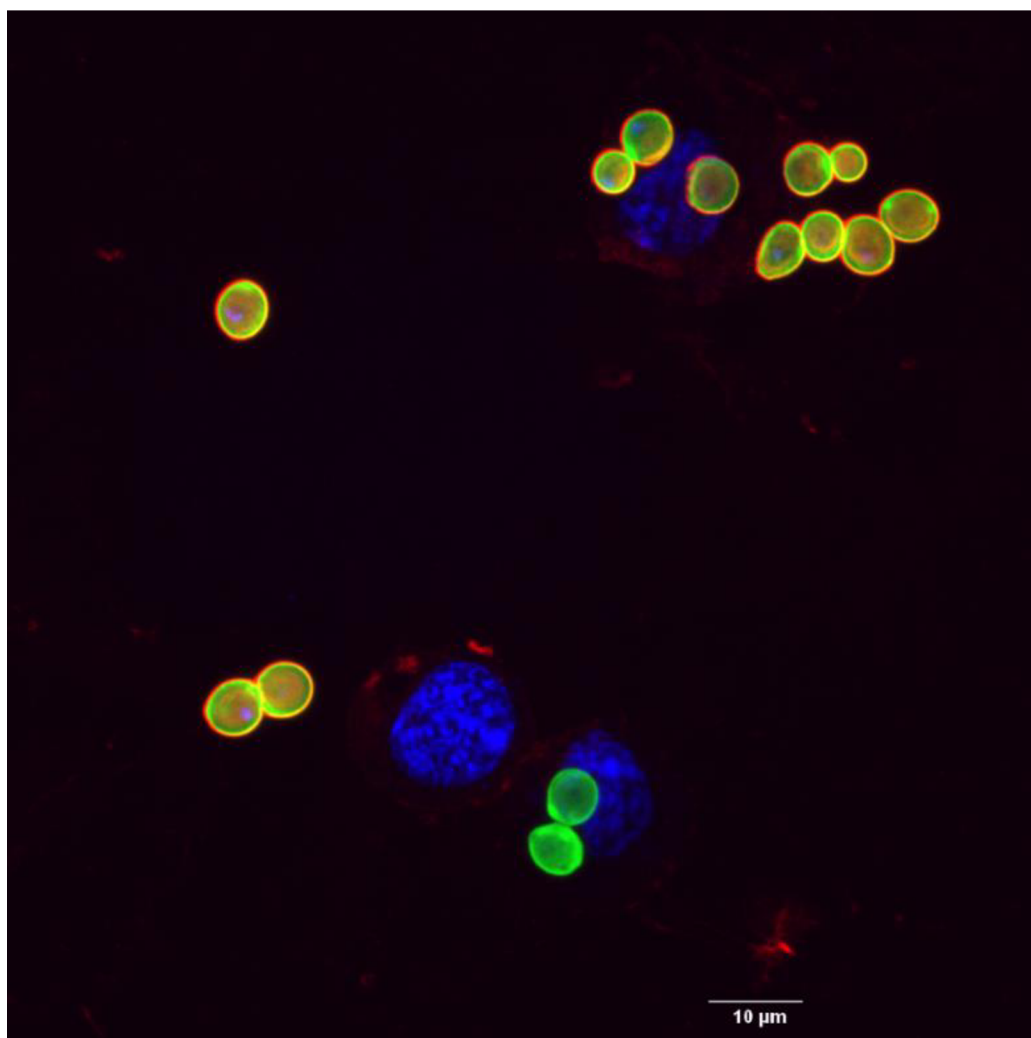
Obrázek 9: Relativní kvantifikace genů pro proteiny související s komplem a proteiny obsahující thioester, vztažená ke genu pro klíčecí *ef*; * = $p < 0,05$; Na ose x je znázorněno 5 skupin ve třech časových úsecích (6 h, 24 h a 48 h po injikaci), osa y znázorňuje relativní míru exprese; Každý bod představuje skupinu 5 samic; NI = neinjikovaná skupina; PBS = skupina injikovaná PBS; Ec = skupina injikovaná *E. coli*; MI = skupina injikovaná *M. luteus*; Ca = skupina injikovaná *C. albicans*.

Jak bylo zmíněno v literárním přehledu, vypitvání samotného tukového tělesa nebylo možné, jelikož nelze účinně oddělit od vzdušnic. Naše vzorky tedy obsahovaly i tkáň vzdušnic. Nelze vyloučit, že tento fakt mohl mít vliv na dosažené výsledky, jelikož vzdušnice jsou slizniční tkání, která je v kontaktu s vnějším prostředím. Nicméně v podobné studii od Dr. Urbanové (Urbanova et al., 2015) byla pro vyloučení vlivu vzdušnic provedena *in situ* hybridizace u exprese *Ira2M-1*. Výsledky prokázaly, že exprese *Ira2M-1* pocházela výlučně z buněk tukového tělesa. Lze tedy předpokládat stejnou situaci minimálně u některých TEP proteinů.

Zmapováním transkriptomu klíčete *I. ricinus* z komplexu *vzdušnice/tukové těleso* přispívá tato práce do potenciální budoucí databáze klíčecích transkriptomů. V budoucích výzkumech by též mohlo být zajímavé porovnání proteomu z hemolymfy s proteomem z komplexu *vzdušnice/tukové těleso*, a ověřit, zda by došlo k získání obdobných výsledků.

5.2 Experiment 2 – RNA interference Cactus 1 a *in vitro* fagocytóza

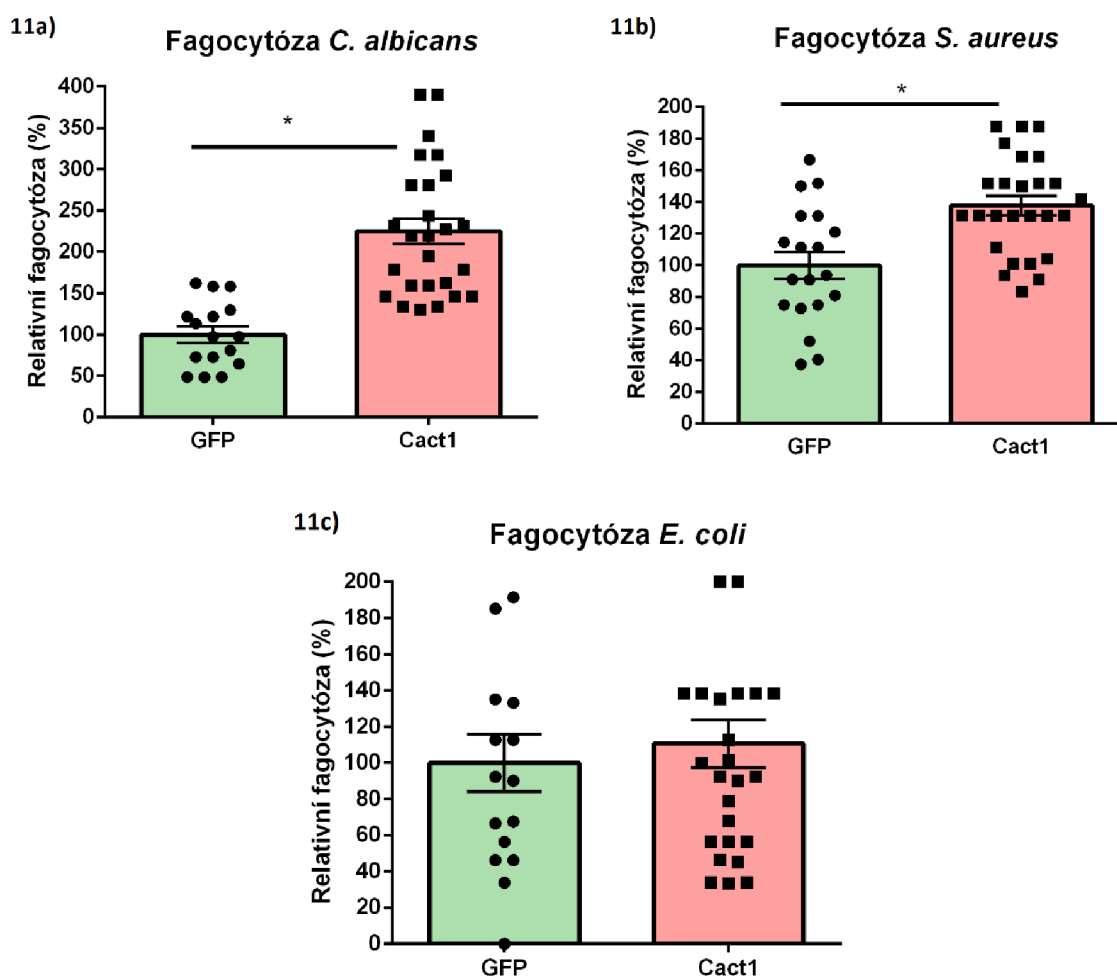
Fagocytární eseje byly použité ke zkoumání funkce vybraného genu pro Cactus 1 (negativní inhibitor Toll dráhy) ve fagocytóze. Gen byl umlčen pomocí RNA interference a fagocytóza hemocytů byla studována v *in vitro* podmínkách. Počet fagocytujících hemocytů v jednotlivých experimentech je vyjádřen jako relativní fagocytóza, kdy kontrolní GFP skupina (injikovaná *gfp* dsRNA) představuje hodnotu 100 %. Data byla statisticky vyhodnocena pomocí t-testu. Metoda dvojího značení mikrobů pomocí protilátek, nám umožnila rozlišit zfagocytované a pouze adherované mikroby, čímž se značně zpřesnily získané výsledky (Obrázek 10). Pokud není metoda dvojího značení použita, nelze adherované a zfagocytované mikroby rozlišit.



Obrázek 10: Fagocytóza kvasinky *C. albicans* hemocyty klíštěte *I. ricinus*; Kvasinky byly značené fluorescenčním isothiokyanátem (FITC) – zeleně; značení kvasinek pomocí primární anti-*C. albicans* protilátky a fluorescenčně značené sekundární protilátky Alexa 549 –

červeně; díky dvojitému značení bylo možné rozpoznat adherované (žluté) od zfagocytovaných kvasinek (zelené); jádra buněk – modře (DAPI).

U esejí s *C. albicans* a *S. aureus* mělo umlčení genu pro Cactus 1 vliv na jejich fagocytózu hemocyty. Množství fagocytujících hemocytů bylo signifikantně vyšší u vzorků s umlčeným genem pro Cactus 1, kdy oproti GFP skupině vzrostla fagocytóza *C. albicans* o 125 % (Obrázek 11a). Fagocytóza grampozitivní bakterie *S. aureus* u Cactus 1 skupiny vzrostla oproti GFP o 38 % (Obrázek 11b). Umlčení genu pro Cactus 1 nemělo vliv na fagocytózu gramnegativní bakterie *E. coli* (Obrázek 11c).



Obrázek 11: RNA interference spojená s *in vitro* fagocytózou u *C. albicans*, *S. aureus* a *E. coli*; Hodnota GFP představuje 100 % fagocytujících hemocytů (relativní fagocytóza); * = $p < 0,001$.

Tyto výsledky ukazují, že po vypnutí negativního inhibitoru Toll dráhy genu pro Cactus 1 pomocí RNA interference, došlo ke zvýšení fagocytózy kvasinky *C. albicans* a grampozitivní bakterie *S. aureus*.

V dřívějších studiích naší laboratoře byl zkoumán vliv vybraných molekul na fagocytózu různých mikrobů. Například byly umlčeny geny pro jednotlivé IrTEP proteiny, Ixoderiny, IrC2/Bf a v *in vitro* podmínkách byla pozorována fagocytóza kvasinek *C. albicans*, gramnegativní bakterie *E. coli* a spirochét *Borrelia afzelii* (Buresova et al., 2011; Urbanova et al., 2015; Urbanova et al., 2017; Urbanova et al., 2018). Umlčení těchto imunitních genů vedlo ve většině případů ke snížení fagocytózy studovaných mikrobů (oproti GFP kontrole). V našem experimentu naopak došlo po umlčení imunitního genu (Cactus 1) ke zvýšení fagocytózy hemocytů. To může naznačovat, že došlo k aktivaci genů, které ovlivňují fagocytózu mikrobů hemocyty.

Ve studiích provedených na myších a lidských buňkách byla prokázána TLR stimulace fagocytózy (Doyle et al., 2004). Výsledky této studie naznačují, že TLR přenášejí signály přes MyD88, IRAK4 a p38, což vede k upregulaci scavengerových receptorů. To vede k významnému zvýšení fagocytózy makrofágů/monocytů gramnegativních a grampozitivních bakterií. Je zajímavé, že jednotlivé TLR podporují fagocytózu v různé míře, přičemž TLR3 je nejslabším a TLR9 je nejsilnějším induktorem tohoto procesu (Doyle et al., 2004).

Dále bylo prokázáno, že TLR signalizace ovlivňuje fagocytózu na více úrovních. TLR mohou fungovat přímo jako fagocytární receptory, signalizace TLR má také vliv na účinnost tvorby fagozomů a může ovlivnit zrání nově vytvořených fagozomů. TLR navíc mohou zprostředkovávat transkripční reakce, které mohou ovlivnit geny spojené s fagocytózou (Underhill & Gantner, 2004).

Vliv Toll dráhy byl rovněž studován v hemolymfě komárů. Výzkumná práce Dr. Morejon a Dr. Michel pozorovala zvýšenou antimikrobiální aktivitu v hemolymfě komárů *A. gambiae* po umlčení genu pro Cactus (Morejon & Michel, 2023). Pro měření antimikrobiální aktivity hemolymfy ve své studii použili tzv. „zone of inhibition“ metodu, kdy ponechali hemolymfu z komárů inkubovat na agaru obsahujícím *M. luteus* a následně byla hemolymfa testována. Po RNAi Cactusu se u samic komára zvýšila genová exprese několika AMP, včetně DEF1, fagocytóza zde bohužel nebyla studována.

Výsledky našeho experimentu naznačují, že umlčením genu pro Cactus 1 mohlo dojít k aktivaci Toll imunitní dráhy. Tuto domněnku, že Toll signální dráha má vliv na imunitní procesy u klíšťat bude třeba potvrdit dalšími experimenty a novými přístupy.

Výsledky této práce mohou pomoci lépe porozumět imunitním procesům a jejich regulaci u klíšťat. Pokroky v porozumění imunitě klíšťat lze využít k vývoji nových kontrolních strategií a přístupů ke snížení míry přenosu nemocí přenášených těmito vektory.

6 Závěr

- Byla provedena a zpracována transkriptomová analýza z komplexu *vzdušnice/tukové těleso* klíštěte *I. ricinus*.
- Byly identifikovány a ověřeny nejhojnější (imunitní) geny exprimované v tomto komplexu.
- Byla studována exprese vybraných genů po infekci různými druhy patogenů.
- U všech genů kódujících TEP proteiny a proteiny souvisejících s komplementem se projevila průkazná změna exprese – především po infekci gramnegativní bakterií *E. coli*.
- Nejsignifikantnější nárůst exprese (3,4x) byl pozorován u genu pro IrC3-3, a to 24 hodin po infekci *E. coli*, také u genu pro CLIP-doménový protein 2 (1,9x), a to 6 hodin po infekci *E. coli*. Nejvýraznější nárůst exprese vykazoval gen pro Ixoderin A (6,8x) 24 hodin po injikaci *E. coli*.
- V *in vitro* fagocytárních esejích mělo u *C. albicans* a *S. aureus* vypnutí genu pro Cactus 1 vliv na jejich fagocytózu klíštěcími hemocyty – značně vzrostl počet fagocytujících buněk.
- Umlčení genu pro Cactus 1 nemělo vliv na fagocytózu bakterie *E. coli*.

7 Literatura

- ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A.; (2008) Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*. 22, 195–215. doi:10.1016/j.idc.2007.12.006.
- ANDERSON, J. M.; SONENSHINE, D. E.; VALENZUELA, J. G.; (2008) Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC genomics*. 9, 552. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-552>.
- ARMSTRONG, P. B.; (2001) The contribution of proteinase inhibitors to immune defense. *Trends in Immunology*. 22 (1), 47–52. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(00\)01803-2](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(00)01803-2).
- ARRESE, E. L.; SOULAGES, J. L.; (2010) Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*. 55, 207-225. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085356.
- AZAGI, T.; HOORNSTRA, D.; KREMER, K.; HOWIUS, J. W. R.; SPRONG, H.; (2020) Evaluation of Disease Causality of Rare *Ixodes ricinus*-Borne Infections in Europe. *Pathogens*. 9 (2), 150.
- BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L.; (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological reviews*. 198, 169–184. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0124.x>.
- 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*. *Developmental and comparative immunology*. 33 (4), 489–498. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.09.011>.
- 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 (6), 623–630. <https://doi.org/10.1159/000328851>.
- CAPELLI-PEIXOTO, J.; CARVALHO, D. D.; JOHNSON, W. C.; SCOLES, G. A.; FOGACA, A. C.; DAFFRE, S.; UETI, M. W.; (2017) The transcription factor Relish controls *Anaplasma marginale* infection in the bovine tick *Rhipicephalus microplus*. *Developmental and Comparative Immunology*. 74, 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.04.005>.

- CERAUL, S. M.; DREHER-LESNICK, S. M.; GILLESPIE, J. J.; RAHMAN, M. S.; AZAD, A. F.; (2007) New tick defensin isoform and antimicrobial gene expression in response to *Rickettsia montanensis* challenge. *Infection and immunity*. 75 (4), 1973–1983. <https://doi.org/10.1128/IAI.01815-06>.
- CHAN, Y. S.; NG, T. B.; (2013) Northeast red beans produce a thermostable and pH-stable defensin-like peptide with potent antifungal activity. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 66 (3), 637–648. <https://doi.org/10.1007/s12013-012-9508-1>.
- CHOI, I. K.; HYUN, S.; (2012) Conserved microRNA miR-8 in fat body regulates innate immune homeostasis in *Drosophila*. *Developmental and Comparative Immunology*. 37 (1), 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.12.008>.
- CHRISTOPHIDES, G. K.; VLACHOU, D.; KAFATOS, F. C.; (2004) Comparative and functional genomics of the innate immune system in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Immunological Review*. 198, 127-148.
- CHRUDIMSKA, T.; CHRUDIMSKY, T.; GOLOVHCENKO, M.; RUDENKO, N.; GRUBHOFFER, L.; (2010) New defensins from hard and soft ticks: similarities, differences, and phylogenetic analyses. *Veterinary Parasitology*. 167 (2-4), 298–303. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.032>.
- CLAYTON, A. M.; DONG, Y.; DIMOPOULOS, G.; (2014) The *Anopheles* innate immune system in the defense against malaria infection. *Journal of Innate Immunity*. 6 (2), 169–181. <https://doi.org/10.1159/000353602>.
- DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J. M.; KOCAN, K. M.; SONENSHINE, D. E.; (2008a) Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience*. 13, 6938-6946.
- DE LA FUENTE, J.; MARITZ-OLIVIER, C.; NARANJO, V.; AYOUBI, P.; NIJHOF, A. M.; ALMAZAN, C.; CANALES, M.; PEREZ DE LA LASTRA, J. M.; GALINDO, R. C.; BLOUIN, E. F.; GORTAZAR, C.; JONGEJAN, F.; KOCAN, K. M.; (2008b) Evidence of the role of tick subolesin in gene expression. *BMC genomics*. 9, 372. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-372>.
- DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; MATHIAS, M. I.; (2008) New morphological data on fat bodies of semi-engorged females of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Micron*. 39 (7), 875–883. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.12.002>.

- DEVIATKIN, A. A.; KHOLODILOV, I. S.; VAKULENKO, Y. A.; KARGANOVA, G. G.; LUKASHEV, A. N.; (2020) Tick-Borne Encephalitis Virus: An Emerging Ancient Zoonosis? *Viruses*. 12 (2), 247.
- DOSTERT, C.; JOUANGUY, E.; IRVING, P.; TROXLER, L.; GALIANA-ARNOUX, D.; HETRU, C.; HOFFMANN, J. A.; IMLER, J. L.; (2005) The Jak-STAT signaling pathway is required but not sufficient for the antiviral response of *Drosophila*. *Nature Immunology*. 6 (9), 946–953. <https://doi.org/10.1038/ni1237>.
- DOYLE, S. E.; O'CONNELL, R. M.; MIRANDA, G. A.; VAIDYA, S. A.; CHOW, E. K.; LIU, P. T.; SUZUKI, S.; SUZUKI, N.; MODLIN, R. L., YEH, W-C.; LANE, T. F.; CHENG G.; (2004) Toll-like Receptors Induce a Phagocytic Gene Program through p38. *Journal of Experimental Medicine*. 199 (1), 81–90. doi:10.1084/jem.20031237.
- ESTEVEES, E.; FOGACA, A. C.; MALDONADO, R.; SILVA, F. D.; MANSO, P. P.; PELAJO-MACHADO, M.; VALLE, D.; DAFFRE, S.; (2009) Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. *Developmental and comparative immunology*. 33 (8), 913–919. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.02.009>.
- FOGACA, A. C.; LORENZINI, D. M.; KAKU, L. M.; ESTEVES, E.; BULET, P.; DAFFRE, S.; (2004) Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Developmental and Comparative Immunology*. 28 (3), 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.08.001>.
- FOGACA, A. C.; ALMEIDA, I. C.; EBERLIN, M. N.; TANAKA, A. S.; BULET, P.; DAFFRE, S.; (2006) Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides*, 27 (4), 667–674. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.07.013>.
- FOGACA, A. C.; SOUSA, G.; PAVANELO, D. B.; ESTEVES, E.; MARTINS, L. A.; URBANOVA, V.; KOPACEK, P.; DAFFRE, S.; (2021) Tick Immune System: What Is Known, the Interconnections, the Gaps, and the Challenges. *Frontiers in Immunology*. 12, 628054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.628054>.
- FRANCISCHETTI, I. M.; MANS, B. J.; MENG, Z.; GUDDERRA, N., VEENSTRA, T. D., PHAM, V. M.; RIBEIRO, J. M.; (2008) An insight into the sialome of the soft tick, *Ornithodoros parkeri*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 38 (1), 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.09.009>.

- FROLET, C.; THOMA, M.; BLANDIN, S.; HOFFMANN, J. A.; LEVASHINA, E. A.; (2006) Boosting NF-kappaB-dependent basal immunity of *Anopheles gambiae* aborts development of *Plasmodium berghei*. *Immunity*. 25 (4), 677–685. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.019>.
- FUJITA, T.; MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; (2004) The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunological Reviews*. 198, 185-202.
- GANZ, T.; (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature reviews. Immunology*. 3 (9), 710–720. <https://doi.org/10.1038/nri1180>.
- GAO, J.; ZHAO, B. R.; ZHANG, H.; YOU, Y. L.; Li, F.; Wang, X. W.; (2021) Interferon functional analog activates antiviral Jak/Stat signaling through integrin in an arthropod. *Cell reports*. 36 (13), 109761. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109761>.
- GARVER, L. S.; BAHIA, A. C.; DAS, S.; SOUZA-NETO, J. A.; SHIAO, J.; DONG, Y.; DIMOPOULOS, G.; (2012) *Anopheles* Imd pathway factors and effectors in infection intensity-dependent anti-*Plasmodium* action. *PLoS Pathogens*. 8 (6), e1002737. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002737>.
- GOKUDAN, S.; MUTA, T.; TSUDA, R.; et al. (1999) Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 96, 10086-10091.
- GONG, T.; DU, J.; LI, S. W.; HUANG, H.; Qi, X. L.; (2022) Identification and Functional Analysis of a Defensin CcDef2 from *Coridius chinensis*. *International journal of molecular sciences*. 23 (5), 2789. <https://doi.org/10.3390/ijms23052789>.
- GRUBHOFFER, L.; VERES, J.; DUSBABEK, F.; (1991) *Lectins as the molecular factors of recognition and defense reaction of ticks*. F. Dusbabek & V. Bukva (Eds.), *Modern Acarology*, Vol. 2. Prague: Academia, 381–388.
- GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C.; (2010) The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*. 2528, 1-28.
- GULIA-NUSS, M.; NUSS, A. B.; MEYER, J. M.; SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M.; WATERHOUSE, R. M.; SATTELLE, D. B.; DE LA FUENTE J.; RIBEIRO, J. M.; et al.

- (2016) Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nature Communications*. 7, 10507. <https://doi.org/10.1038/ncomms10507>.
- GULLEY, M. M.; ZHANG, X.; MICHEL, K.; (2013) The roles of serpins in mosquito immunology and physiology. *Journal of insect physiology*. 59 (2), 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2012.08.015>.
- HAJDUSEK, O.; ALMAZAN, C.; LOOSOVA, G.; VILLAR, M.; CANALES, M.; GRUBHOFFER, L.; KOPACEK, P.; DE LA FUENTE, J.; (2010) Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. *Vaccine*. 28 (17), 2993–2998. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.02.008>.
- HAJDUSEK, O.; SIMA, R.; AYLLON, N.; JALOVECKA, M.; PERNER, J.; DE LA FUENTE, J.; KOPACEK, P.; (2013) Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3, 26. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00026>.
- HETRU, C.; TROXLER, L.; HOFFMANN, J. A.; (2003) *Drosophila melanogaster* antimicrobial defense. *The Journal of Infectious Diseases*. 187 Suppl 2, S327–S334. <https://doi.org/10.1086/374758>.
- HILLYER, J. F.; (2016) Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental and Comparative Immunology*. 58, 102–118. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>.
- HOFFMANN, J. A.; REICHHART, J. M.; (2002) *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nature Immunology*. 3 (2), 121–126. <https://doi.org/10.1038/ni0202-121>.
- HOFFMANN, J. A.; (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature*. 426 (6962), 33–38. <https://doi.org/10.1038/nature02021>.
- HONIG MONDEKOVA, H.; SIMA, R.; URBANOVA, V.; KOVAR, V.; REGO, R. O. M.; GRUBHOFFER, L.; KOPACEK, P.; HAJDUSEK, O.; (2017) Characterization of *Ixodes ricinus* Fibrinogen-Related Proteins (Ixoderins) Discloses Their Function in the Tick Innate Immunity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7, 509. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00509>.
- HORACKOVA, J.; RUDENKO, N.; GOLOVCHENKO, M.; HAVLIKOVA, S.; GRUBHOFFER, L.; (2010) IrML - a gene encoding a new member of the ML protein family

from the hard tick, *Ixodes ricinus*. *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology*, 35(2), 410–418. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2010.00100.x>.

INOHARA, N.; NUNEZ, G.; (2002) ML - a conserved domain involved in innate immunity and lipid metabolism. *Trends in biochemical sciences*. 27 (5), 219–221. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(02\)02084-4](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(02)02084-4).

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R.; (2002) Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, 20, 197–216. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>.

JAWORSKI, D. C.; ZOU, Z.; BOWEN, C. J.; WASALA, N. B.; MADDEN, R.; WANG, Y.; KOCAN, K. M.; JIANG, H.; DILLWITH, J. W.; (2010) Pyrosequencing and characterization of immune response genes from the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (L.). *Insect molecular biology*. 19 (5), 617–630. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01037.x>.

JIANG, H.; KANOST, M. R.; (2000) The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. *Insect biochemistry and molecular biology*. 30 (2), 95–105. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(99\)00113-7](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(99)00113-7).

JOHNS, R.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L.; (2001) Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31 (9), 857–865. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(01\)00031-5](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(01)00031-5).

JONES, K. E.; PATEL, N. G.; LEVY, M. A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J. L.; DASZAK, P.; (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 451 (7181), 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>.

KANOST, M. R.; JIANG, H.; (1996) *Protease inhibitors in invertebrate immunity*. In K. Soderhall, S. Iwanaga, and G. Vanta (Eds.), *New Directions in Invertebrate Immunology*. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 155–173.

KAWABATA, S.; TSUDA, R.; (2002) Molecular basis of non-self recognition by the horseshoe crab tachylectins. *Biochimica et biophysica acta*. 1572 (2-3), 414–421. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(02\)00322-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00322-7).

KONGSUWAN, K.; JOSH, P.; ZHU, Y.; PEARSON, R.; GOUGH, J.; COLGRAVE, M. L.; (2010) Exploring the midgut proteome of partially fed female cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). *Journal of insect physiology*. 56 (2), 212–226. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.10.003>.

- KOPACEK, P.; HAJDUSEK, O.; BURESOVA, V.; DAFFRE, S.; (2010) Tick innate immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 708, 137–162.
- KOVAR, V.; KOPACEK, P.; GRUBHOFFER, L.; (2000) Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect biochemistry and molecular biology*. 30 (3), 195–205. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(99\)00107-1](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(99)00107-1).
- KUHN, K. H.; UHLIR, 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). *Parasitology research*. 82 (3), 215–221. <https://doi.org/10.1007/s004360050098>.
- LAI, R.; TAKEUCHI, H.; LOMAS, L. O.; JONCZY, J.; RIGDEN, D. J.; REES, H. H.; TURNER, P. C.; (2004) A new type of antimicrobial protein with multiple histidines from the hard tick, *Amblyomma hebraeum*. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 18 (12), 1447–1449. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1154fje>.
- LEHANE, M. J.; AKSOY, S.; LEVASHINA, E.; (2004) Immune responses and parasite transmission in blood-feeding insects. *Trends in Parasitology*. 20 (9), 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.002>.
- LI, S.; YU, X.; FENG, Q.; (2019) Fat Body Biology in the Last Decade. *Annual Review of Entomology*. 64, 315–333. doi:10.1146/annurev-ento-011118-112007.
- MAEMOTO, A.; QU, X.; ROSENGREN, K. J.; TANABE, H.; HENSCHEN-EDMAN, A.; CRAIK, D. J.; OUELLETTE, A. J.; (2004) Functional analysis of the alpha-defensin disulfide array in mouse cryptdin-4. *The Journal of biological chemistry*. 279 (42), 44188–44196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406154200>.
- MARTINS, L. A.; GALLETTI, M. F. B. M.; RIBEIRO, J. M.; FUJITA, A.; COSTA, F. B.; LABRUNA, M. B.; DAFFRE, S.; FOGACA, A. C.; (2017) The Distinct Transcriptional Response of the Midgut of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma aureolatum* Ticks to *Rickettsia rickettsii* Correlates to Their Differences in Susceptibility to Infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 7, 129. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00129>.
- MATEOS-HERNANDEZ, L.; OBREGON, D.; MAYE, J.; BORNERES, J.; VERSILLE, N.; DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PENA, A.; HODZIC, A.; SIMO, L.; CABEZAS-CRUZ, A.;

- (2020) Anti-Tick Microbiota Vaccine Impacts *Ixodes ricinus* Performance during Feeding. *Vaccines*. 8, 702. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040702>.
- MATSUYAMA, K.; NATORI, S.; (1988) Molecular cloning of cDNA for sapecin and unique expression of the sapecin gene during the development of *Sarcophaga peregrina*. *The Journal of biological chemistry*. 263 (32), 17117–17121.
- MC CLURE CARROLL, E. E.; WANG, X.; SHAW, D. K.; O'NEAL, A. J.; OLIVA CHAVEZ, A. S.; BROWN, L. J.; BORADIA, V. M.; HAMMOND, H. L., PEDRA, J. H. F.; (2019) p47 licenses activation of the immune deficiency pathway in the tick *Ixodes scapularis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 116 (1), 205–210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808905116>.
- MC EVER, R. P.; (1994) Selectins. *Current opinion in immunology*. 6 (1), 75–84. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(94\)90037-x](https://doi.org/10.1016/0952-7915(94)90037-x).
- MOREJON, B.; MICHEL, K.; (2023) A zone-of-inhibition assay to screen for humoral antimicrobial activity in mosquito hemolymph. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 13, 891577. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.891577>.
- MORISATO, D.; ANDERSON, K. V.; (1995) Signaling Pathways that Establish the Dorsal-Ventral Pattern of the *Drosophila* Embryo. *Annual Review of Genetics*. 29 (1), 371–399. doi:10.1146/annurev.ge.29.120195.
- MORRIS, R.; KERSHAW, N.J.; BABON, J.J.; (2018) The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *Protein Science*. 27, 1984–2009. <https://doi.org/10.1002/pro.3519>.
- 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 Biochemistry and Molecular Biology*. 31 (8), 747–751. [https://doi.org/10.1016/s0965-1748\(01\)00066-2](https://doi.org/10.1016/s0965-1748(01)00066-2).
- NAKAJIMA, Y.; TAYLOR, D.; MINORU, Y.; (2002) Involvement of antibacterial peptide defensin to tick midgut defense. *Experimental and Applied Acarology*. 28, 135–140.
- NARASIMHAN, S.; RAJEEVAN, N.; LIU, L.; ZHAO, Y. O.; HEISIG, J.; PAN, J.; EPPLER-EPSTEIN, R.; DEPONTE, K.; FISH, D., FIKRIG, E.; (2014) Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. *Cell host & microbe*. 15 (1), 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.12.001>.

NOBLE, R. E.; NOBLE, G. A.; (1976) *Parasitology: The Biology of Animal Parasites*. London: Lea & Febiger Philadelphia, 4th edition. ISBN 0-8121-.0543-5.

OSMAN, D.; BUCHON, N.; CHAKRABARTI, S.; HUANG, Y. T.; SU, W. C.; POIDEVIN, M.; TSAI, Y. C.; LEMAITRE, B.; (2012) Autocrine and paracrine unpaired signaling regulate intestinal stem cell maintenance and division. *Journal of Cell Science*, 125 (24), 5944–5949. <https://doi.org/10.1242/jcs.113100>.

PAROLA, P.; RAOULT, D.; (2001) Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clinical Infectious Diseases*. 32 (6), 897-928.

POLANOWSKI, A.; WILUSZ, T.; (1996) Serine proteinase inhibitors from insect hemolymph. *Acta biochimica Polonica*. 43 (3), 445–453.

QIN, Y.; LUO, Z.; ZHAO, K.; NAN, X.; GUO, Y.; LI, W.; Wang, Q.; (2022) A new SVWC protein functions as a pattern recognition protein in antibacterial responses in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Fish & shellfish immunology*. 131, 1125–1135. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.11.004>.

RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G.; (2010) The toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes. *Developmental and Comparative Immunology*. 34 (6), 625–629. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.01.006>.

REGO, R. O. M.; (2005) Identification and comparative analysis of innate immune proteins in ticks. Ph.D. thesis. Faculty of Science, University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic.

REGO, R.O. M.; HAJDUSEK, O.; KOVAR, V.; KOPACEK, P.; GRUBHOFFER, L.; HYPISA, V.; (2005) Molecular cloning and comparative analysis of fibrinogen-related proteins from the soft tick *Ornithodoros moubata* and the hard tick *Ixodes ricinus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 35, 991-1004. doi: 10.1016/j.ibmb.2005.04.001.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D.; (2010) Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*. 11 (9), 785–797. <https://doi.org/10.1038/ni.1923>.

thesis. Faculty of Science, University of South Bohemia, Ceske Budejovice, Czech Republic.

ROSA, R. D.; CAPELLI-PEIXOTO, J.; MESQUITA, R. D.; KALIL, S. P.; POHL, P. C.; BRAZ, G. R.; FOGACA, A. C.; DAFFRE, S.; (2016) Exploring the immune signalling

- pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: From molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge. *Developmental and Comparative Immunology*. 59, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.018>.
- ROSZER, T.; (2014) The invertebrate midintestinal gland (“hepatopancreas”) is an evolutionary forerunner in the integration of immunity and metabolism. *Cell and Tissue Research*. 358, 685–695. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1985-7>.
- ROY, S.; SAHA, T. T.; ZOU, Z.; RAIKHEL, A. S.; (2018) Regulatory Pathways Controlling Female Insect Reproduction. *Annual Review of Entomology*. 63, 489–511. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043258>.
- RUDENKO, N.; GOLOVCHENKO, M.; EDWARDS, M. J.; GRUBHOFFER, L.; (2005) Differential expression of *Ixodes ricinus* tick genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection. *Journal of medical entomology*. 42 (1), 36–41. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.1.36>.
- RUDENKO, N.; GOLOVCHENKO, M.; GRUBHOFFER, L.; (2007) Gene organization of a 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 molecular biology*. 16 (4), 501–507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00745.x>.
- SAITO, Y.; KONNAI, S.; YAMADA, S.; IMAMURA, S.; NISHIKADO, H.; ITO, T.; ONUMA, M.; OHASHI, K.; (2009) Identification and characterization of antimicrobial peptide, defensin, in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. *Insect molecular biology*. 18 (4), 531–539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00897.x>.
- SEKIGUCHI, R.; NONAKA, M.; (2015) Evolution of the complement system in protostomes revealed by de novo transcriptome analysis of six species of Arthropoda. *Developmental and Comparative Immunology*. 50 (1), 58–67. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.12.008>.
- SALCEDO-PORRAS, N.; OLIVEIRA, P. L.; GUARNERI, A. A.; LOWENBERGER, C.; (2022) A fat body transcriptome analysis of the immune responses of *Rhodnius prolixus* to artificial infections with bacteria. *Parasites & vectors*. 15 (1), 269. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05358-9>.
- SEMENZA, J. C.; SUK, J. E.; (2018) Vector-borne diseases and climate change: a European perspective. *FEMS Microbiology Letters*. 365 (2), 244. doi: 10.1093/femsle/fnx244.

- SHAFEE, T. M.; LAY, F. T.; PHAN, T. K.; ANDERSON, M. A.; HULETT, M. D.; (2017) Convergent evolution of defensin sequence, structure and function. *Cellular and molecular life sciences*. CMLS, 74 (4), 663–682. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2344-5>.
- SILVA, F. D.; REZENDE, C. A.; ROSSI, D. C.; ESTEVES, E.; DYSZY, F. H.; SCHREIER, S.; GUEIROS-FILHO, F.; CAMPOS, C. B.; PIRES, J. R.; DAFFRE, S.; (2009) Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *The Journal of biological chemistry*. 284 (50), 34735–34746. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016410>.
- SIMSER, J. A.; MULENGA, A.; MACALUSO, K. R.; AZAD, A. F.; (2004) An immune responsive factor D-like serine proteinase homologue identified from the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect molecular biology*. 13 (1), 25–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00455.x>.
- SMITH, A. A.; PAL, U.; (2014) Immunity-related genes in *Ixodes scapularis*--perspectives from genome information. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4, 116. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00116>.
- SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L.; (2008) Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 13, 7046–7063. <https://doi.org/10.2741/3209>.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, M. R.; (2014a) *Biology of Ticks: Volume 1*. New York: Oxford University Press, 2nd edition. ISBN 978-0-19-974405-3.
- SONENSHINE, D. E.; ROE, M. R.; (2014b) *Biology of Ticks: Volume 2*. New York: Oxford University Press, 2nd edition. ISBN 978-0-19-974406-0.
- TIKHE, C. V.; CARDOSO-JAIME, V.; DONG, S.; RUTKOWSKI, N.; DIMOPOULOS, G.; (2022) Trypsin-like Inhibitor Domain (TIL)-Harboring Protein Is Essential for *Aedes aegypti* Reproduction. *International journal of molecular sciences*. 23 (14), 7736. <https://doi.org/10.3390/ijms23147736>.
- UNDERHILL, D. M.; GANTNER, B.; (2004) Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes and infection*. 6 (15), 1368–1373. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.08.016>.
- URBANOVA, V.; SIMA, R.; SAUMAN, I.; HAJDUSEK, O.; KOPACEK, P.; (2015) Thioester-containing proteins of the tick *Ixodes ricinus*: gene expression, response to

microbial challenge and their role in phagocytosis of the yeast *Candida albicans*. *Developmental and Comparative Immunology*. 48 (1), 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.09.004>.

URBANOVA, V.; HAJDUSEK, O.; HONIG MONDEKOVÁ, H.; SIMA, R.; KOPACEK, P.; (2017) Tick Thioester-Containing Proteins and Phagocytosis Do Not Affect Transmission of *Borrelia afzelii* from the Competent Vector *Ixodes ricinus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 7, 73. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00073>.

URBANOVA, V.; HAJDUSEK, O.; SIMA, R.; FRANTA, Z.; HONIG MONDEKOVA, H.; GRUNCLOVA, L.; BARTOSOVA SOJKOVA, P.; JALOVECKA, M.; KOPACEK, P.; (2018) IrC2/Bf - A yeast and *Borrelia* responsive component of the complement system from the hard tick *Ixodes ricinus*. *Developmental and Comparative Immunology*. 79, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.10.012>.

VASTA, G. R.; MARCHALONIS, J. J.; (1984) Summation: immunobiological significance of invertebrate lectins. *Progress in Clinical Biological Research*. 154, 177-191.

VASTA, G. R.; AHMED, H.; FINK, N. E.; ELOLA, M. T.; MARSH, A. G.; SNOWDEN, A.; ODOM, E. W.; (1994) Animal lectins as self/non-self recognition molecules: biochemical and genetic approaches to understanding their roles and evolution. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 712, 55-73.

VASTA, G. R.; QUESENBERRY, M.; AHMED, H.; O'LEARY, N.; (1999) C-type lectins and galectins mediate innate and adaptive immune functions: their roles in the complement activation pathway. *Developmental and Comparative Immunology*. 23 (4-5), 401–420. [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(99\)00020-8](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(99)00020-8).

WANG, X.; ROCHELEAU, T. A.; FUCHS, J. F.; HILLYER, J. F.; CHEN, C. C.; CHRISTENSEN, B. M.; (2004) A novel lectin with a fibrinogen-like domain and its potential involvement in the innate immune response of *Armigeres subalbatus* against bacteria. *Insect molecular biology*, 13 (3), 273–282. <https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00484.x>.

WANG, J. L.; SAHA, T. T.; ZHANG, Y.; ZHANG, C.; RAIKHEL, A. S.; (2017) Juvenile hormone and its receptor methoprene-tolerant promote ribosomal biogenesis and vitellogenesis in the *Aedes aegypti* mosquito. *The Journal of Biological Chemistry*. 292 (24), 10306–10315. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.761387>.

- WANG, H. C.; WANG, Q. H.; BHOWMICK, B.; LI, Y. X.; HAN, Q.; (2021) Functional characterization of two clip domain serine proteases in innate immune responses of *Aedes aegypti*. *Parasites & vectors*. 14 (1), 584. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05091-9>.
- WIGGLESWORTH, V. B.; (1972) *The Principles of Insect Physiology*. Chapman and Hall Ltd, London. 7th edition. ISBN: 978-94-009-5973-6.
- WILLADSEN, P.; RIDING, G.A.; MCKEENA, R.V.; KEMP, D.; TELLAM, R.; NIELSEN, J.; GOUGH, J.; (1989) Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *Journal of Immunology*. 143 (4), 1346-1351.
- WU, J.; ZHOU, X.; CHEN, Q.; CHEN, Z.; ZHANG, J.; YANG, L.; SUN, Y.; WANG, G.; DAI, J.; FENG, T.; (2022) Defensins as a promising class of tick antimicrobial peptides: a scoping review. *Infectious Diseases of Poverty*. 11. <https://doi.org/10.1186/s40249-022-00996-8>.
- XIA, X.; YOU, M.; RAO, X. J.; YU, X. Q.; (2018) Insect C-type lectins in innate immunity. *Developmental and comparative immunology*. 83, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.11.020>.
- YI, H. Y.; CHOWDHURY, M.; HUANG, Y. D.; YU, X. Q.; (2014) Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98 (13), 5807–5822. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6>.
- ZHENG, H.; YANG, X.; XI, Y.; (2016) Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*. *Life Sciences*. 167, 22-31.
- ZHU, Y.; THANGAMANI, S.; HO, B.; DING, J. L.; (2005) The ancient origin of the complement system. *The EMBO journal*. 24 (2), 382–394. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600533>.