



**UNIWERSYTET
WARMIŃSKO-MAZURSKI
W OLSZTYNIE**



**WYDZIAŁ: Biologii i Biotechnologii
Dziedzina: nauk ścisłych i przyrodniczych
Dyscyplina: nauki biologiczne**

mgr inż. Magdalena Szczotko

Rozprawa doktorska

**Obecność patogenów a ekspresja wybranych genów odporności wrodzonej
u kleszczy**

**The expression of selected innate immunity genes in ticks in the presence
of pathogens**

**Praca wykonana w Katedrze Biochemii Wydziału Biologii i Biotechnologii
pod kierunkiem
dr hab. Małgorzaty Dmitryjuk, prof. UWM,
Katedra Biochemii, Wydział Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Warmińsko-
Mazurski w Olsztynie**

Olsztyn, 2025

SPIS TREŚCI

Wykaz publikacji składających się na rozprawę doktorską.....	4
Wykaz skrótów.....	5
Streszczenie w języku polskim.....	6
Słowa kluczowe	6
Abstract.....	7
Keywords	7
1. Wstęp.....	8
<i>Ixodes ricinus</i> i <i>Dermacentor reticulatus</i>	9
Transmisja patogenów	10
Układ immunologiczny kleszczy	12
Szlak sygnałowy JAK/STAT	15
Układ immunologiczny a transmisja krętków <i>Borrelia</i>	18
Defensyny kleszczy	22
2. Cel, hipotezy i zadania badawcze.....	25
3. Materiały i metody	27
Zadanie 1.....	27
Materiał badawczy	27
Izolacja RNA/DNA.....	27
Wykrywanie patogenów <i>Borrelia</i> spp., <i>A. phagocytophilum</i> , <i>Babesia</i> spp., <i>Rickettsia</i> spp. oraz <i>N. mikurensis</i> w kleszczach <i>I. ricinus</i> i <i>D. reticulatus</i>	28
Ekspresja genów defensyn w kleszczach <i>I. ricinus</i> i <i>D. reticulatus</i>	30
Analiza statystyczna	31
Zadanie 2.....	31
Materiał badawczy	31
Izolacja RNA	31
Wykrywanie <i>B. burgdorferi</i> s. l. w materiale genetycznym	32
Ekspresja genów szlaku JAK/STAT oraz AMPs	33
Analiza statystyczna	35
4. Omówienie wyników	36
Zadanie 1.....	36
Prewalencja patogenów	36
Analiza różnic w ekspresji genów defensyn kleszczy <i>I. ricinus</i> i <i>D. reticulatus</i> ...	37

Obecność patogenów.....	37
Faza żerowania kleszcza.....	38
Stadia rozwojowe.....	39
Współwystępowanie patogenów.....	40
Zadanie 2.....	41
Wykrywanie <i>B. burgdorferi</i> s. l.	41
Ekspresja genów szlaku JAK/STAT w obecności krętków <i>B. burgdorferi</i> s. l.	42
Ekspresja genów AMPs w obecności krętków <i>B. burgdorferi</i> s. l.	43
5. Podsumowanie i wnioski.....	46
Zadanie 1.....	46
Zadanie 2.....	46
6. Literatura.....	48
Spis Rycin	63
Spis Tabel.....	65
Finansowanie.....	66
Współpraca.....	67
Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	68
Oświadczenia współautorów	102
Publikacja 1.....	102
Publikacja 2.....	107
Krótką charakterystyka dorobku naukowego	111

Wykaz publikacji składających się na rozprawę doktorską

Rozprawa doktorska składa się z dwóch oryginalnych prac opublikowanych w latach 2024 i 2025, których tematyka obejmuje badanie zmian ekspresji wybranych genów odporności wrodzonej u kleszczy w odpowiedzi na obecność patogenów.

1. **Szczotko, M.**, Antunes, S., Domingos, A., Kubiak, K., & Dmitryjuk, M. (2024). Tick-borne pathogens and defensin genes expression: A closer look at *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 160, 105231. DOI: 10.1016/j.dci.2024.105231

IF¹ = 2,7; MEiN² = 140 pkt.

2. **Szczotko, M.**, Antunes, S., Domingos, A. & Dmitryjuk, M. (2025). Investigation of genes expression of the JAK/STAT signalling pathway and AMPs in the presence of *Borrelia* spirochetes in *Ixodes ricinus*. *Scientific Reports*, 15, 2869. DOI: 10.1038/s41598-025-87506-6

IF¹ = 3,8; MEiN² = 140 pkt.

Łączna suma IF wynosi 6.5, natomiast liczba punktów MNiSW – 280.

¹ IF - wskaźnik Impact Factor czasopisma w roku publikacji

² liczba punktów na podstawie Komunikatu Ministra Nauki z dnia 5 stycznia 2024 r. w sprawie wykazu czasopism naukowych i recenzowanych materiałów z konferencji międzynarodowych

Wykaz skrótów

ACT	– aktyna / <i>actin</i>
AMPs	– peptydy przeciwdrobnoustrojowe / <i>Antimicrobial Peptides</i>
CSαβ	– α-helisa i β-harmonijka stabilizowane mostkami disiarczkowymi pomiędzy konserwatywnymi resztami cysteiny / <i>cysteine-stabilized α-helix and β-sheet</i>
def1	– defensyna 1 <i>Ixodes ricinus</i> / <i>Ixodes ricinus defensin 1</i>
def2	– defensyna 2 <i>Ixodes ricinus</i> / <i>Ixodes ricinus defensin 2</i>
defDr	– defensyna <i>Dermacentor reticulatus</i> / <i>Dermacentor reticulatus defensin</i>
DTN	– sieć dityrozyny / <i>dityrosine network</i>
Duox	– dwufunkcyjna oksydaza NADPH / <i>Dual Oxidase</i>
EF-1	– czynnik elongacyjny 1 / <i>Elongation Factor 1</i>
IFN-γ	– Interferon gamma / <i>Interferon-gamma</i>
IGTPaza	– Rho-podobna GTPaza <i>I. scapularis</i> / <i>I. scapularis Rho-like GTPase</i>
IL	– Interleukina / <i>Interleukin</i>
IMD	– szlak sygnałowy IMD / <i>Immune Deficiency signalling pathway</i>
JAK	– kinaza tyrozynowa / <i>Janus Kinase</i>
JAK/STAT	– szlak sygnałowy JAK/STAT / <i>Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription signalling pathway</i>
JNK	– szlak sygnałowy JNK / <i>Jun-N-terminal Kinase signalling pathway</i>
KZM	– kleszczowe zapalenie mózgu / <i>Tick-Borne Encephalitis</i>
LB	– borelioza z Lyme / <i>Lyme borreliosis</i>
lzs	– lizozym / <i>lysozyme</i>
MG	– jelito środkowe / <i>midgut</i>
NF-κB/Toll	– szlak sygnałowy NF-κB/Toll / <i>Nuclear Factor-Kappa B/Toll signalling pathway</i>
nPCR	– wewnętrzny, dwustopniowy PCR / <i>nested Polymerase Chain Reaction</i>
OHFV	– wirus omskiej gorączki krwotocznej / <i>Omsk Hemorrhagic Fever Virus</i>
PAMP	– wzorce molekularne związane z patogenami / <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>
PCR	– reakcja łańcuchowa polimerazy / <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIAS	– białkowy inhibitor aktywowanych STAT / <i>Protein Inhibitors of Activated STATs</i>
qPCR	– ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy / <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
REST	– pozostałe tkanki / <i>rest of the tissues</i>
RF	– nawracająca gorączka / <i>relapsing fever</i>
ric	– ricinusina / <i>ricinusin</i>
SG	– gruczoły ślinowe / <i>salivary glands</i>
RNAi	– interferencja RNA / <i>RNA interference</i>
SOCS	– supresor sygnalizacji cytokin / <i>Suppressor of Cytokine Signalling</i>
STAM	– cząsteczka adaptorowa przekazująca sygnał / <i>Signal Transducing Adaptor Molecule</i>
STAT	– czynnik transkrypcyjny / <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TBDs	– choroby przenoszone przez kleszcze / <i>Tick-Borne Diseases</i>
TBEV	– wirus kleszczowego zapalenia mózgu / <i>Tick-Borne Encephalitis Virus</i>
TBPs	– patogeny przenoszone przez kleszcze / <i>Tick-Borne Pathogens</i>
UPD	– ligand UPD regulujący aktywność transkrypcyjną szlaku JAK/STAT / <i>the Unpaired ligand</i>

Streszczenie w języku polskim

Kleszcze są pasożytami zewnętrznymi kręgowców oraz wektorem wielu patogenów. Interakcje między kleszczem, patogenem i żywicielem są niezwykle złożone. Pomimo istotnej roli kleszczy jako wektorów chorób, ich układ odpornościowy pozostaje słabo poznany. Stawonogi opierają swoją odporność głównie na mechanizmach odporności wrodzonej, w której kluczowe znaczenie odgrywają szlaki sygnalizacji immunologicznej oraz synteza peptydów przeciwdrobnoustrojowych (AMPs).

Celem badań było określenie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji wybranych genów odporności wrodzonej kleszczy *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*, a obecnością patogenów. W pracy skupiono się na porównaniu zmian ekspresji genów dwóch defensyn kleszcza *I. ricinus* (*def1* i *def2*) oraz jedynej znanej defensyny kleszcza *D. reticulatus* (*defDr*) w odpowiedzi na obecność patogenów - *Borrelia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. oraz *Neoehrlichia mikurensis*. Ponadto, ze względu na istotną rolę *I. ricinus* jako wektora *Borrelia burgdorferi* sensu lato, przeanalizowano zmiany w profilu ekspresji genów szlaku JAK/STAT oraz genów kodujących AMPs: defensynę 1 i 2, ricinusinę oraz lizozym w odpowiedzi na obecność krętków.

Uzyskane wyniki wykazały, że ekspresja genów defensyn u kleszczy może być modulowana zarówno przez pobranie krwi, jak i obecność patogenów. Zaobserwowano różnice w ekspresji analizowanych genów u obu badanych gatunków kleszczy. Stwierdzono także, że u osobników *I. ricinus*, u których potwierdzono obecność *B. burgdorferi* s. l., dochodzi do nadekspresji jedynie części genów związanych ze szlakiem JAK/STAT oraz AMPs. Wyniki sugerują prawdopodobny udział mechanizmów odporności wrodzonej w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej kleszczy, co może mieć wpływ na ich kompetencje wektorowe.

Słowa kluczowe

kleszcze, ekspresja genów, defensyny, AMPs, JAK/STAT

Abstract

Ticks are ectoparasites of vertebrates and vectors of numerous pathogens. The interactions between ticks, pathogens and hosts are extremely complex. Despite the important role that ticks play as disease vectors, their immune system is still poorly understood. Arthropods rely on innate immune mechanisms in which immune signaling pathways and the synthesis of antimicrobial peptides (AMPs) play a crucial role.

The aim of this study was to determine the correlation between the expression levels of selected innate immunity genes in the ticks *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* and the presence of pathogens. The research focused on comparing changes in the expression of two defensin genes in *I. ricinus* (*def1* and *def2*) and the only known defensin gene in *D. reticulatus* (*defDr*) in response to infection with *Borrelia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. and *Neoehrlichia mikurensis*. Due to the important role of *I. ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the changes in the expression profile of genes involved in the JAK/STAT pathway and genes encoding AMPs — defensin 1, defensin 2, ricinusin and lysozyme — were also analyzed in response to the presence of spirochetes.

The results showed that the expression of defensin genes in ticks can be modulated by both blood feeding and the presence of pathogens. Differences were found in the expression of the investigated genes between the two tick species. It was also found that in *I. ricinus* individuals infected with *B. burgdorferi* s. l., only a subset of genes related to the JAK/STAT signaling pathway and AMPs were overexpressed. The results suggest that innate immune mechanisms may be involved in modulating the immune response of ticks, which could influence their vector competence.

Keywords

ticks, genes expression, defensins, AMPs, JAK/STAT

1. Wstęp

Kleszcze to pasożytnicze stawonogi odżywiające się krwią kręgowców. Uważa się, że przenoszą największą liczbę chorobotwórczych drobnoustrojów spośród wszystkich znanych wektorów (Nuttall, 2019). Choroby przenoszone przez kleszcze (*ang.* Tick-Borne Diseases, TBDs) stanowią rosnące zagrożenie dla zdrowia ludzi: mogą powodować przewlekłe i ciężkie objawy, prowadzić do trwałego uszczerbku na zdrowiu, a w niektórych przypadkach nawet do śmierci zakażonych osób i zwierząt (Hajdušek i in., 2013; Nowak-Chmura i Siuda, 2012).

Na terenie Polski występuje na stałe 19 gatunków kleszczy. Najważniejszymi z nich są *Ixodes ricinus* (kleszcz pospolity) oraz *Dermacentor reticulatus* (kleszcz łąkowy), przy czym to *I. ricinus* odgrywa dominującą rolę jako wektor patogenów (Kubiak i in., 2018). Wśród najczęściej diagnozowanych TBDs w Polsce znajdują się borelioza z Lyme (*ang.* Lyme Boreliosis, LB) i odkleszczowe zapalenie mózgu (KZM). Rzadziej występują również inne choroby takie jak riketsjozy, babeszjoza czy tularemia (Kmieciak i in., 2016).

Jedną z najczęściej diagnozowanych chorób przenoszonych przez kleszcze jest LB. Każdego roku liczba przypadków LB wzrasta na całym świecie, przy czym najwięcej zakażeń rejestrowanych jest w Stanach Zjednoczonych (stany północno-wschodnie), Europie Środkowo-Wschodniej oraz Azji Zachodniej i Wschodniej (Skotarczak, 2015). W Polsce od 2013 r. obserwuje się stały wzrost liczby zachorowań na TBDs. Tendencje tę przypisuje się wielu czynnikom, spośród których kluczowe znaczenie mają zmiany klimatyczne. Wyższe niż dawniej temperatury w okresie letnim oraz krótsze i łagodniejsze zimy wydłużają okres aktywności kleszczy. Przyczynia się to do zwiększenia liczby zakażonych osobników (Grochowska i in., 2020; Kmieciak i in., 2016).

Rosnąca liczba ludności na świecie wiąże się z koniecznością zapewnienia coraz większych ilości żywności. Przekłada się to na intensyfikację produkcji zwierzęcej. Zwierzęta hodowlane pozostają nieustannie narażone na choroby przenoszone przez wektory, w tym kleszcze. Powszechne i długotrwałe stosowanie chemicznych akarycydów doprowadziło do rozwoju oporności w populacjach tych pasożytów. Od czasu pierwszego udokumentowanego przypadku oporności na środki chemiczne u przedstawicieli rodzaju *Rhipicephalus*, zjawisko to uległo znacznemu nasileniu. Wobec rosnącego problemu oporności istnieje pilna potrzeba poszukiwania i opracowywania alternatywnych, skutecznych metod zwalczania kleszczy (Abbas i in., 2014; Aguilar-Díaz i in., 2021).

Jednym z obiecujących kierunków jest wykorzystanie wiedzy na temat biologii kleszczy, w szczególności funkcjonowania ich układu odpornościowego. Wykazano, że układ

odpornościowy kleszczy stanowi bogate źródło potencjalnych celów do projektowania skutecznych szczepionek (Aguilar-Díaz i in., 2021). Zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za aktywację odpowiedzi immunologicznej kleszczy ma kluczowe znaczenie dla opracowania innowacyjnych strategii kontroli i zapobiegania chorobom odkleszczowym na całym świecie (Rosa i in., 2016).

Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus

Kleszcz pospolity *I. ricinus* to najbardziej rozpowszechniony gatunek kleszcza w Europie. Występuje na rozległym obszarze, od Irlandii po Ural oraz od północnej Szwecji po Afrykę Północną (Medlock i in., 2013). Gatunek ten jest wektorem co najmniej 18 patogenów, w tym wirusów, bakterii i pierwotniaków o istotnym znaczeniu medycznym i weterynaryjnym. Wśród najczęściej transmitowanych patogenów wyróżnia się: krętki *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s. l.) wywołujące LB; bakterie *Anaplasma phagocytophilum* powodujące ludzką anaplazmozę granulocytarną; *Francisella tularensis*, czynnik etiologiczny tularemii; *Rickettsia helvetica* i *Rickettsia monacensis*, wywołujące riketsjozę, inaczej gorączkę plamistą; *Babesia divergens* i *Babesia microti* powodujące babeszjozę; *Neoehrlichia mikurensis* wywołujące neoehrlichiozę oraz wirus kleszczowego zapalenia mózgu (ang. Tick-Borne Encephalitis Virus, TBEV) będący czynnikiem etiologicznym KZM (Rizzoli i in., 2014; Sprong i in., 2018).

Drugim najczęściej występującym gatunkiem kleszcza w Polsce jest *D. reticulatus*. Od lat 90. XX wieku obserwuje się wzrost liczebności i rozszerzanie zasięgu występowania tego gatunku. W ciągu ostatnich kilku dziesięcioleci rozmieszczenie *D. reticulatus* uległo istotnym zmianom. Gatunek ten skolonizował nowe terytoria, wcześniej uznawane za nieodpowiednie do jego przetrwania i ukończenia cyklu życiowego. Ponadto, na przestrzeni lat zwiększyło się zagęszczenie populacji na terenach wcześniej przez niego niezajmowanych (Zajac i in., 2020). Wpływ na to miały zmiany średnich temperatur latem i zimą w Europie, a także przekształcenia w strukturze oraz użytkowaniu gruntów rolnych i obszarów leśnych. Istotnym czynnikiem były również przesunięcia w rozmieszczeniu i liczebności ssaków będących głównymi żywicielami dorosłych stadiów kleszczy. Wzrost liczebności populacji żywicieli koreluje z późniejszym wzrostem liczby kleszczy oraz ekspansją ich populacji na nowe tereny (Bilbija i in., 2023; Karbowski, 2021). Ponadto, *D. reticulatus* wykazuje wysoką tolerancję na brak pokarmu, niską śmiertelność, wysoki współczynnik reprodukcji i zdolność do przetrwania w niesprzyjających warunkach środowiskowych (Földvári i in., 2016). Wraz z jego rozprzestrzenianiem się wzrosło również znaczenie weterynaryjno-medyczne tego gatunku, wynikające z przenoszenia różnorodnych mikroorganizmów chorobotwórczych (Kubiak i in., 2024). *D. reticulatus* jest

uważany za głównego wektora pierwotniaka *Babesia canis*, czynnika etiologicznego babeszjozy psów, a także bakterii z rodzaju *Rickettsia*, wirusa omskiej gorączki krwotocznej (ang. Omsk Hemorrhagic Fever Virus, OHFV) oraz TBEV (Földvári i in., 2016). Chociaż materiał genetyczny bakterii *B. burgdorferi*, *N. mikurensis* i *A. phagocytophilum* bywa wykrywany w materiale genetycznym kleszczy *D. reticulatus*, gatunek ten nie jest kompetentnym wektorem tych patogenów (Grubhoffer i in., 2005; Kubiak i in., 2024; Mierzejewska i in., 2015; Szczotko i in., 2023).

Transmisja patogenów

Pojęcia „zdolność wektorowa” (ang. vectorial capacity) oraz „kompetencja wektorowa” (ang. vector competence) są często używane w literaturze w odniesieniu do zdolności organizmów do przenoszenia patogenów. Choć bywają stosowane zamiennie, nie są to pojęcia tożsame. Zdolność wektorowa odnosi się do efektywności transmisji patogenu przez populację danego wektora i stanowi miarę ilościową, na którą wpływają takie czynniki jak: gęstość populacji wektora, jego długość życia, częstość kontaktu z żywicielem oraz kompetencja wektorowa. Szacunki zdolności wektorowej uwzględniają szeroki zakres czynników: środowiskowych, behawioralnych, biochemicznych i komórkowych – które kształtują relacje pomiędzy wektorem, przenoszonym patogenem a żywicielem. Zarówno środowiskowe jak i behawioralne aspekty mogą w istotny sposób modyfikować skuteczność transmisji. Na przykład, nawet jeśli dany gatunek pasożyta posiada biologiczne i genetyczne predyspozycje do przenoszenia określonego patogenu, nie będzie skutecznym wektorem, jeżeli nie współwystępuje przestrzennie i czasowo z zakażonym żywicielem lub jeśli żywiciel ten nie należy do jego preferowanych źródeł pokarmu. Kompetencja wektorowa natomiast, stanowi składową zdolności wektorowej i jest determinowana przez czynniki wewnętrzne (genetyczne), które wpływają na zdolność wektora do transmisji patogenu. Jest to cecha biologiczna, zależna od interakcji między wektorem a patogenem (Beerntsen i in., 2000; Black IV i Moore, 1996). Determinanty genetyczne wpływają na cechy, takie jak preferencje żywiciela, długość przyczepienia się kleszcza do żywiciela, interakcje kleszcz-żywiciel-patogen i kleszcz-mikrobiom-patogen, oraz podatność na infekcję patogenem (de la Fuente i in., 2016). Różnice w zdolności do transmisji patogenów między gatunkami kleszczy można prawdopodobnie powiązać z różnymi mechanizmami odporności wrodzonej (Taylor, 2006).

Kleszcze z rodziny Ixodidae w ciągu swojego cyklu życiowego trzykrotnie żerują, pobierając jednorazowo ilość krwi nawet 100 razy większą od własnej masy (Rana i in., 2023). Obecność materiału genetycznego patogenu w materiale genetycznym kleszcza nie oznacza

automatycznie, że dany kleszcz jest jego wektorem. Aby uznać gatunek kleszcza za wektor konkretnego patogenu muszą zostać spełnione określone warunki. Kleszcz musi być zdolny do nabycia patogenu podczas żerowania w stadium larwalnym lub nimfalnym na zakażonym żywicielu. Następnie patogen musi przetrwać w organizmie kleszcza podczas jego przeobrażania się w kolejne stadia rozwojowe – zjawisko to określa się jako transmisję transstadialną. Ostatecznie kleszcz powinien być w stanie przekazać patogen kolejnemu, niezakażonemu żywicielowi podczas kolejnego żerowania (Eisen, 2020). Transmisja transowarialna polega na przeniesieniu patogenu z samicy kleszcza do jej potomstwa - przez stadium jaja do larw kolejnego pokolenia (Ravindran i in., 2023).

Patogeny przenoszone przez kleszcze (*ang.* Tick-Borne Pathogens, TBP) są pobierane przez te pasożyty podczas żerowania na zakażonych żywicielach. W trakcie żerowania kleszcze na przemian wstrzykują ślinę wytwarzaną przez gruczoły ślinowe i pobierają pokarm tą samą drogą. Z tego względu ślina oraz gruczoły ślinowe odgrywają kluczową rolę w transmisji TBP (Khogali i in., 2024; Nuttall, 2019; Šimo i in., 2017). Patogen, który dostaje się do organizmu kleszcza wraz z krwią zakażonego żywiciela musi pokonać kilka barier fizycznych: jelito środkowe, hemocel wypełniony hemolimfą i gruczoły ślinowe oraz przeciwstawić się wrodzonej odpowiedzi immunologicznej kleszcza, aby później mógł zostać skutecznie przekazany kolejnemu żywicielowi. Układ odpornościowy kleszczy, podobnie jak innych bezkręgowców, opiera się wyłącznie na mechanizmach wrodzonych i jest znacznie mniej złożony niż układ immunologiczny kręgowców (Hajdušek i in., 2013; Kopáček i in., 2012; Rosa i in., 2016). Wrodzona odporność kleszczy opiera się na skoordynowanym działaniu odpowiedzi komórkowej i humoralnej. W trakcie żerowania na zakażonym żywicielu patogeny obecne we krwi trafiają najpierw do jelita środkowego kleszcza. Aby mogły zostać przeniesione na kolejnego żywiciela muszą przemieścić się z jelita przez hemolimfę do gruczołów ślinowych (Rosa i in., 2016).

Jelito środkowe jest pierwszą tkanką kleszcza mającą kontakt z krwią żywiciela oraz pobranymi wraz z nią mikroorganizmami, w tym patogenami. To właśnie w jelicie środkowym krew jest przechowywana i trawiona. Białka pochodzące z krwi dostarczają składników odżywczych niezbędnych do rozwoju i reprodukcji kleszcza. Jelito środkowe uznawane jest za najważniejszą tkankę umożliwiającą przeżycie i namnażanie się patogenów, ponieważ wiele z nich musi tam przetrwać aż do linienia i kolejnego żerowania pajęczaka (Hajdušek i in., 2013). Po pobraniu z zakażonego żywiciela, patogen kolonizuje komórki nabłonka jelita środkowego kleszcza i/lub penetruje barierę jelitową, po czym przedostaje się do hemocelu –

otwartej jamy ciała wypełnionej hemolimfą. Hemolimfa, będąca płynem ustrojowym obmywającym narządy wewnętrzne, pełni funkcję transportową dla składników odżywczych oraz metabolitów komórkowych. Oprócz tego odgrywa istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej, chroniąc organizm przed infekcjami co zostanie omówione dalej (Bonnet i in., 2018; Khogali i in., 2024). Następnie patogen musi dotrzeć do ślinianek. Kompetentne wektory przenoszą patogeny na kolejnych żywicieli właśnie poprzez ślinę, którą wstrzykują podczas żerowania. Niektóre mikroorganizmy chorobotwórcze mają również zdolność do inwazji jajników samic, dlatego mogą być przenoszone na potomstwo (Hajdušek i in., 2013; Khogali i in., 2024; Šimo i in., 2017).

W drodze z jelita środkowego do tkanek obwodowych patogeny napotykać zarówno komórkowe jak i humoralne mechanizmy obronne. Zdolność patogenu do przeciwdziałania odpowiedzi immunologicznej kleszcza lub jej unikania ma kluczowe znaczenie dla skutecznej transmisji. W każdym z narządów kleszcza patogen musi pokonać kolejne mechanizmy odpornościowe, aby móc zostać skutecznie przeniesiony do żywiciela kręgowca, za pomocą śliny podczas kolejnego żerowania (Fogaça i in., 2021; Hajdušek i in., 2013). Złożoność procesów immunologicznych zachodzących w ciele kleszcza ma istotny wpływ na efektywność przenoszenia TBPów (Khogali i in., 2024).

Interakcje kleszcz-żywiciel-patogen ewoluowały przez ponad 300 milionów lat, a jedynie nieliczne drobnoustroje były w stanie pokonać wrodzoną odporność kleszcza (Barker i Murrell, 2004). Duża liczba gatunków kleszczy świadczy o sprawności ich układu odpornościowego, mimo, że jest on znacznie prostszy niż u kręgowców. W związku z powyższym wyjaśnienie mechanizmów działania czynników immunologicznych uczestniczących w interakcjach pomiędzy kleszczami a przenoszonymi przez nie patogenami jest niezbędne do pełnego zrozumienia etiologii chorób odkleszczowych. Lepsze poznanie mechanizmów odpornościowych może również przyczynić się do identyfikacji nowych celów molekularnych dla strategii mających na celu zablokowanie transmisji patogenów (Fogaça i in., 2021; Sonenshine i Macaluso, 2017).

Układ immunologiczny kleszczy

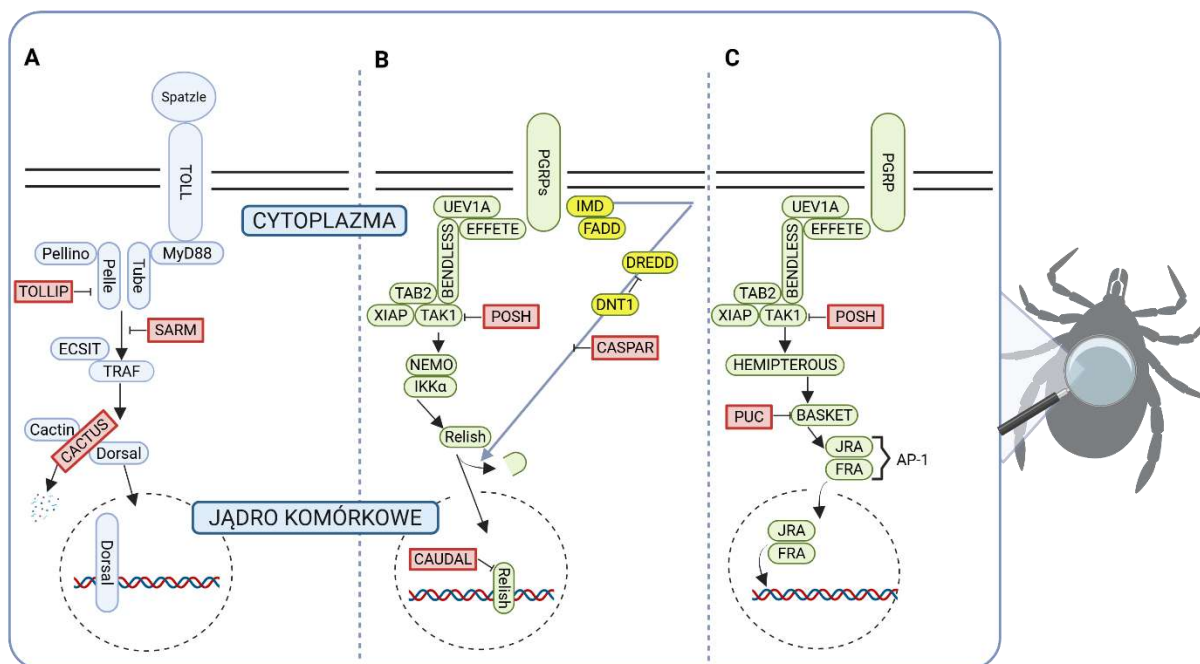
Immunobiologia kleszczy odgrywa istotną rolę w transmisji wielu patogenów na ich żywicieli (Aguilar-Díaz i in., 2021). Niektóre gatunki kleszczy zmieniają żywiciela na każdym etapie swojego rozwoju, od larwy przez nimfę aż po postać dorosłą, co zwiększa prawdopodobieństwo na nabycie, jak i transmisję patogenu. Oprócz patogenów przenoszonych wraz z krwią, kleszcze pozostają w bliskim kontakcie z mikrobiotą skóry żywiciela, która

również może zostać pobrana w trakcie żerowania. Ponadto, w trakcie niepasżytnicznych faz cyklu życiowego, kleszcze są narażone na kontakt z mikroorganizmami obecnymi w środowisku, co dodatkowo wpływa na ich mikrobiom i potencjalną ekspozycję na nowe czynniki zakaźne. W związku z tym układ odpornościowy kleszczy musi być stale aktywny, aby zapewnić ochronę przed infekcjami. Patogeny z kolei modyfikują odpowiedź immunologiczną wektora, by ułatwić swoją transmisję i namnażanie. Przykładowo, infekcja wywołana przez *A. phagocytophilum* powoduje zmiany w proteomie i transkryptomie zarówno komórek kleszcza, jak i kręgowca, na którym kleszcz żeruje (de la Fuente i in., 2016, 2017). Dotychczasowa wiedza o reakcjach immunologicznych stawonogów pochodzi głównie z badań nad owadami, w szczególności muszką owocową (*Drosophila*) oraz komarami z rodzajów *Aedes* i *Anopheles* (Fogaça i in., 2021; Verhulst i in., 2018). Obecnie wiadomo, że układ odpornościowy stawonogów jest bardzo zróżnicowany, a znajomość mechanizmów immunologicznych kleszczy jest wciąż ograniczona i wiele aspektów pozostaje niezbadanych (Fogaça i in., 2021; Palmer i Jiggins, 2015). Dotychczasowe badania pozwalają stwierdzić, że układ odpornościowy kleszczy różni się istotnie od opisanego u owadów (Shaw i in., 2017).

Wrodzona odporność kleszczy opiera się na skoordynowanym działaniu odpowiedzi komórkowej i humoralnej (Rosa i in., 2016). Odpowiedź komórkowa obejmuje mechanizmy takie jak fagocytoza, enkapsulacja i nodulacja (Fogaça i in., 2021; Hajdušek i in., 2013). Z kolei odpowiedź humoralna kleszczy jest realizowana przez cząsteczki efektorowe, których ekspresja jest indukowana w odpowiedzi na inwazję mikroorganizmów. Zalicza się do nich liczne peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs) wśród których wyróżnia się lizozymy, defensyny, lektyny, proteazy i inhibitory proteaz, takie jak serpiny i cystatyny (Sonenshine, 2008). Ważną rolę w układzie odpornościowym stawonogów odgrywają również inhibitory proteinazy serynowej. Uczestniczą one w procesach krzepnięcia hemolimfy, melanizacji oraz syntezy AMPs, ponadto wykazują bezpośrednie działanie przeciwdrobnoustrojowe. Ich funkcja polega prawdopodobnie na hamowaniu aktywności proteaz bakteryjnych, które mikroorganizmy wykorzystują do kolonizacji tkanek gospodarza i unikania jego układu odpornościowego. Kleszcze wykorzystują te inhibitory jako silne cząsteczki przeciwdrobnoustrojowe (Ceraul i in., 2008; Fogaça i in., 2021; Gulley i in., 2013). Podobnie jak u innych eukariontów, u kleszczy występują szlaki sygnałowe regulujące wrodzoną odpowiedź immunologiczną (Gulia-Nuss i in., 2016). Odpowiedź humoralną regulują cztery główne szlaki przekazywania sygnału: NF- κ B/Toll (*ang.* Nuclear Factor-Kappa B/Toll), IMD

(ang. Immune Deficiency), JNK (ang. Jun-N-terminal Kinase), JAK/STAT (ang. Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) (Paulino i in., 2022).

Patogeny w organizmach owadów są rozpoznawane poprzez interakcje z tzw. wzorcami molekularnymi związanymi z patogenami (ang. Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs). Ich obecność aktywuje szlaki sygnałowe NF- κ B/Toll i IMD, które regulują aktywność czynników transkrypcyjnych homologicznych do ludzkiego czynnika NF- κ B (Jalovecka i in., 2024; Gliški i in., 2011). Szlak Toll u *Drosophila* jest aktywowany głównie w odpowiedzi na infekcje wywołane przez grzyby i bakterie Gram-dodatnie (Gram+). Odgrywa on kluczową rolę w regulacji odporności wrodzonej, zarówno u tego organizmu modelowego, jak i u owadów żywiących się krwią. Jednym z głównych efektów jego aktywacji jest kontrola ekspresji AMPs. Analizy genomu przeprowadzone *in silico* wykazały, że genom kleszczy koduje większość elementów szlaku Toll. Co więcej, badania funkcjonalne sugerują, że szlak ten nie tylko uczestniczy w odpowiedzi immunologicznej kleszczy, ale także odgrywa ważną rolę w rozwoju embrionalnym tych pajęczaków (Ryc. 1A) (Fogaça i in., 2021; Gulia-Nuss i in., 2016; Rosa i in., 2016; Smith i in., 2016).

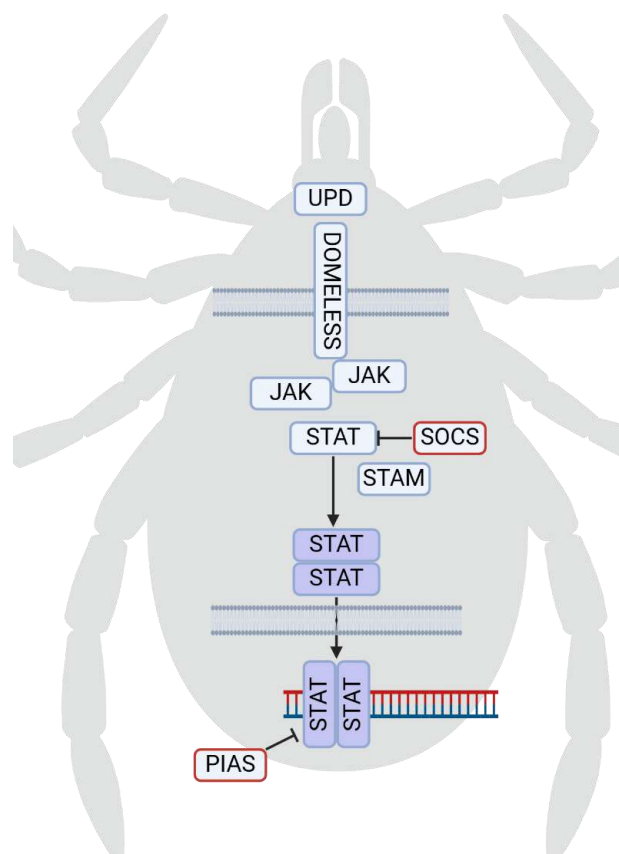


Rycina 1. Schemat trzech z czterech głównych szlaków sygnałowych regulujących odpowiedź immunologiczną kleszczy. **A** - szlak NF- κ B/Toll, **B** - szlak IMD (brakujące składniki tego szlaku w kleszczach są zaznaczone kolorem żółtym), **C** - szlak JNK. Składniki w kolorze czerwonym to inhibitory szlaków sygnałowych. Rysunek został stworzony za pomocą programu BioRender (<https://app.biorender.com/>). Źródło: Fogaça i in. (2021), Paulino i in. (2022).

U *Drosophila* zakażenia wywołane przez bakterie Gram-ujemne (Gram-) i niektóre bakterie Gram+, takie jak *Bacillus* i *Listeria*, są kontrolowane głównie przez szlak IMD. Dotychczasowe analizy *in silico* oraz badania genomowe wykazały, że kleszcze nie posiadają wielu ortologów kluczowych elementów tego szlaku (Ryc. 1B). Pomimo ich braku, szlak IMD w kleszczach pozostaje w pełni funkcjonalny i jest wrażliwy na obecność różnych patogenów, podobnie jak szlak Toll bierze udział w kontroli ekspresji AMPs. Wykazano, że szlak IMD chroni organizm kleszcza przed kolonizacją przez *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* i *Anaplasma marginale* (Capelli-Peixoto i in., 2017; Shaw i in., 2017). Szlak JNK, będący odgałęzieniem szlaku IMD, może zostać aktywowany poprzez kompleks TAK1/TAB2. Wykazano, że u *Drosophila* szlak JNK bierze udział w szerokim zakresie procesów biologicznych, w tym w komórkowej odpowiedzi immunologicznej i odpowiedzi na stres (Ryc. 1C) (Rosa i in., 2016; Silverman i in., 2003).

Szlak sygnałowy JAK/STAT

Szlak sygnałowy JAK/STAT odgrywa kluczową rolę w odpowiedzi przeciwwirusowej oraz w zwalczaniu bakterii u *Drosophila* i komarów *Aedes aegypti* (Boutros i in., 2002; Dostert i in., 2005; Souza-Neto i in., 2009). Choć szlak JAK/STAT u kleszczy wciąż pozostaje bardzo słabo poznany dostępne dane wskazują, że jest funkcjonalny i odgrywa istotną rolę w kontroli patogenów. Szlak ten jest szczególnie wrażliwy na infekcje wirusowe i jest uważany za szlak pomocniczy dla szlaków Toll i IMD (Dostert i in., 2005). JAK/STAT reguluje także wiele procesów biologicznych, w tym transkrypcję genów zaangażowanych w naprawę i przebudowę nabłonka jelita (Buchon i in., 2009; Narasimhan i in., 2014). Wpływa na ekspresję genów odpowiedzi immunologicznej oraz bierze udział w regulacji ekspresji AMPs (Ryc. 2) (Capelli-Peixoto i in., 2017; Liu i in., 2012; Smith i in., 2016; Szczotko i in., 2025).

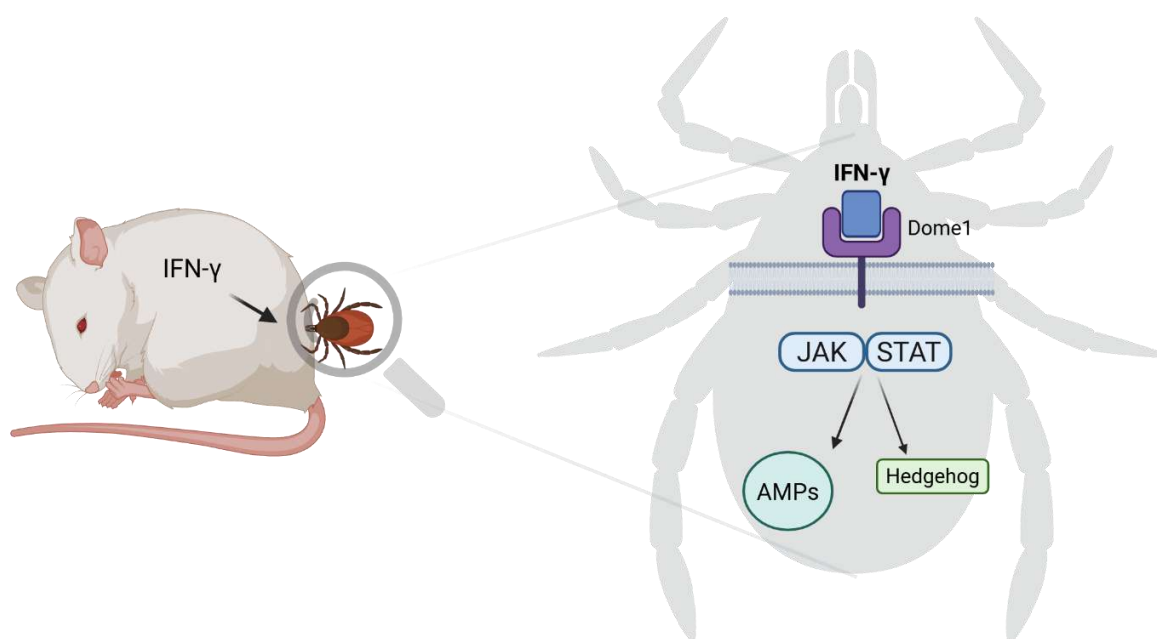


Rycina 2. Schemat szlaku sygnałowego JAK/STAT regulującego odpowiedź humoralną kleszczy. Składniki oznaczone na czerwono to inhibitory szlaków sygnałowych. Rysunek został stworzony za pomocą programu BioRender (<https://app.biorender.com/>). Źródło: Fogaça i in. (2021), Paulino i in. (2022).

Szlak JAK/STAT indukuje silne reakcje przeciwbakteryjne, ograniczające proliferację patogenów przenoszonych przez kleszcze. U wielu stawonogów szlak ten jest aktywowany przez cząsteczki podobne do cytokin, takie jak Unpaired (UPD). Ligand UPD wiąże się z receptorem transbłonowym Dome, co prowadzi do aktywacji szlaku JAK/STAT, który może wspierać zarówno odporność stawonogów, jak i ich rozwój (Rana i in., 2023). Podczas gdy *Drosophila* koduje wiele ligandów UPD zdolnych do aktywacji Dome, dotychczas nie znaleziono ortologów UPD w genomie *Ixodes* (Gulia-Nuss i in., 2016; Herrera i Bach, 2019; Miller i in., 2018; Rana i in., 2023).

Udowodniono, że kleszcze *I. scapularis* wykorzystują interferon gamma (IFN- γ) pochodzący od żywiciela do stymulacji szlaku odpornościowego JAK/STAT. Rana i in. (2023) zidentyfikowali u tego gatunku receptor – Dome1. Analizy przeprowadzone *in silico* wykazały, że cechuje się on wysoką selektywnością i powinowactwem do IFN- γ pochodzącego od kręgowców, takich jak ludzie, myszy i ptaki. W przeciwieństwie do ortologów Dome obecnych

u innych stawonogów, w tym kleszczy nienależących do rodzaju *Ixodes*, Dome1 zawiera unikalne regiony zewnątrzkomórkowe, strukturalnie przypominające receptory cytokin kręgowców. Receptor ten zlokalizowany jest na luminalnej powierzchni nabłonka jelitowego kleszcza (Ryc. 3). IFN- γ pochodzący od żywiciela ułatwia aktywację szlaku JAK/STAT *I. scapularis* za pośrednictwem receptora Dome1, regulując w ten sposób reakcje bakteriobójcze. Szlak Dome1–JAK/STAT jest potencjalnie funkcjonalny u większości gatunków kleszczy, na co wskazuje obecność odpowiednich genów w ich genomach. Odgrywa on kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy jelitowej, mikrobiomu jelitowego, a także w regeneracji oraz proliferacji komórek jelita w tym komórek macierzystych. Szlak kontroluje proces metamorfozy kleszczy i rozwój ich narządów poprzez sieci sygnałowe Hedgehog i Notch–Delta. Eksperymentalne obniżenie ekspresji Dome1, utrzymujące się od stadiów młodocianych (larwalnych i nimfalnych) aż po dorosłe samice oraz ich potomstwo, prowadziło do istotnych zaburzeń płodności i rozwoju kleszczy. Obserwowano brak linienia, utratę symetrii dwubocznej oraz poważne wady morfogenezy narządów wewnętrznych i przydatków. Obejmujące m.in. brak odnóży, części aparatów gębowych oraz struktur porów odbytowych. Zakłócenie rozwoju i metamorfozy kleszczy poprzez wyciszenie ekspresji genów Dome1, kinazy tyrozynowej (*ang.* Janus Kinase, JAK), czynnika transkrypcyjnego (*ang.* Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT) uniemożliwiało przenoszenie patogenów z zakażonych osobników na ssaczych żywicieli. Sugeruje to, że białka te mogą stanowić potencjalne cele dla nowych środków przeciwkleszczowych (Rana i in., 2023).



Rycina 3. Aktywacja szlaku JAK/STAT przez IFN- γ . Grafika została wykonana w programie BioRender (<https://app.biorender.com/>).

Liu i in. (2012) wykazali, że szlak sygnałowy JAK/STAT odgrywa kluczową rolę w kontrolowaniu infekcji *A. phagocytophilum* u kleszczy *I. scapularis* poprzez udział w regulacji ekspresji genów kodujących AMPs o masie cząsteczkowej 5,3 kDa. Zahamowanie aktywności szlaku JAK/STAT prowadziło do zwiększenia poziomu zakażenia *A. phagocytophilum* w gruczołach ślinowych oraz hemolimfie kleszczy. Rosa i in. (2016) wykazali, że patogen *A. marginale* powoduje obniżenie ekspresji genów związanych z odpornością wrodzoną kleszczy *Rhipicephalus microplus*. Dane te sugerują, że patogen może manipulować układem odpornościowym wektora, aby wspierać jego przetrwanie i kolonizację w organizmie kleszcza.

Podczas pobierania krwi patogeny muszą najpierw pokonać barierę utworzoną przez błonę perytroficzną, która chroni nabłonek jelita przed potencjalnym uszkodzeniem przez połknięte cząstki stałe lub patogeny podczas posiłku. Szlak JAK/STAT reguluje jej powstawanie poprzez kontrolę ekspresji glikoproteiny peritrofiny-1, która tworzy błonę perytroficzną u stawonogów (Narasimhan i in., 2014; Rana i in., 2023).

Układ immunologiczny a transmisja krętków Borrelia

Krętki z rodzaju *Borrelia* zaliczane są do bakterii Gram–. Charakteryzują się ruchliwością dzięki obecności rzęsek peryplazmatycznych na biegunach komórki. Mimo podobieństwa morfologicznego, mikroorganizmy te różnią się pod względem biologicznym, klinicznym oraz epidemiologicznym. Na podstawie cech genetycznych oraz rodzaju wektorów przenoszących, bakterie z rodzaju *Borrelia* podzielono na dwie główne grupy. Pierwsza obejmuje 20 gatunków, w tym kompleks *B. burgdorferi* s. l., wywołujący LB, który coraz częściej klasyfikowany jest jako *Borrelia* (Barbour i Gupta, 2021). Gatunki te przenoszone są przez kleszcze twarde z rodzaju *Ixodes*. Druga grupa obejmuje 25 gatunków krętków wywołujących gorączki powrotne (*ang.* relapsing fever, RF), które są zazwyczaj przenoszone przez kleszcze miękkie Argasidae, a także przez wszy oraz niektóre gatunki kleszczy twardych. Wśród przedstawicieli tej grupy wymienia się nowo pojawiający się patogen - *Borrelia miyamotoi*. Choć należy on do tej drugiej grupy krętków, stanowi on wyjątek, ponieważ jako jedyny przenoszony jest przez kleszcze twarde z rodzaju *Ixodes* – te same, które odpowiadają za transmisję boreliozy (Kubiak i in., 2021; Stanek i Reiter, 2011).

Kiedy kleszcz żeruje na zakażonym kręgowcu, krętki *Borrelia* są przyciągane do miejsca wkłucia przez sygnały chemotaktyczne. Jelito kleszcza jest początkowym miejscem kolonizacji tego patogenu. Aby przetrwać w organizmie wektora, krętki muszą przezwyciężyć mechanizmy odpornościowe oraz procesy trawienia endocytarnego zachodzące w komórkach

nabłonka jelita. Większość krętków pozostaje w świetle jelita przez cały czas trwania procesu linienia kleszcza. Później migrują przez hemolimfę w kierunku gruczołów ślinowych pasożyta. Aby ułatwić kolonizację i przetrwanie w jelicie, *B. burgdorferi* wyewoluował złożone mechanizmy modulujące środowisko jelita. Krętki znajdujące się w gruczołach ślinowych kleszcza jeszcze przed rozpoczęciem żerowania nie wykazują zdolności do zakażenia. Bakterie zdolne do infekcji zazwyczaj docierają do gruczołów ślinowych dopiero po około 60–72 godzinach od momentu wkłucia się kleszcza w skórę żywiciela. Stamtąd są transmitowane do organizmu żywiciela (Franta i in., 2010; Gilmore i Piesman, 2000; Kurokawa i in., 2020; Murfin i in., 2019).

Podczas żerowania kleszcza niektóre cząsteczki pochodzące od żywiciela mogą oddziaływać z układem odpornościowym pasożyta. Plazminogen pochodzący od żywiciela pomaga krętkom unikać odpowiedzi immunologicznej kleszcza i ułatwia ich migrację przez nabłonek jelitowy. Niedawno wykazano, że aktywność szlaku JAK/STAT może być modulowana przez cząsteczki żywiciela. IFN- γ nabyty podczas pobierania krwi myszy zakażonej *Borrelia*, aktywuje STAT, co prowadzi do indukcji ekspresji peptydu przeciwdrobnoustrojowego Dae2. Peptyd ten kontroluje populację *Borrelia* w jelicie zakażonego kleszcza (Coleman i in., 1997; Smith i in., 2016).

Badania prowadzone na kleszczach *I. scapularis* wykazały, że wraz z krwią zakażonych żywicieli pobierane są zarówno krętki, jak i IFN- γ . W świetle jelita kleszcza, IFN- γ pobrany od żywiciela indukuje ekspresję Rho-podobnej GTPazy *I. scapularis* (ang. Rho-like GTPase, IGTPazy) oraz indukuje w sposób zależny od STAT ekspresję peptydu Dae2. Działa on jako pośrednik, który sygnalizuje nadchodzącą infekcję *B. burgdorferi*. Co ciekawe, ekspresja IGTPazy była indukowana tylko podczas nabywania patogenu od myszy zakażonych. Odkrycie to sugeruje istnienie mechanizmu koewolucyjnego, który pozwala stawonogom-wektorom identyfikować zakażonych żywicieli i inicjować mechanizmy obronne, ograniczające proliferację połkniętych patogenów w środowisku wektora. Wyniki te wskazują na istnienie konserwatywnej komunikacji międzygatunkowej, w których IFN- γ oraz IGTPazy odgrywają kluczową rolę w aktywacji mechanizmów odporności kleszczy w odpowiedzi na infekcję występującą u ssaczego żywiciela (Smith i in., 2016). Rodzina małych GTPaz, w tym Rho-GTPazy, reguluje krytyczne funkcje we wszystkich organizmach eukariotycznych. Kontrolują one podstawowe procesy, takie jak morfogeneza, migracja i podział komórek oraz odpowiedź immunologiczna. Wykazano, że część IGTPaz odgrywa kluczową rolę w fagocytozie. U stawonogów Rho-GTPazy pośredniczą w licznych procesach komórkowych, w tym

w mechanizmach obronnych, a także wpływają na ścieżki sygnałowe prowadzące do zmian ekspresji genów (Jaffe i Hall, 2005, Shandala i Brooks, 2012, Smith i Pal, 2014, Smith i in., 2016). Genom *I. scapularis* koduje co najmniej 14 domniemanych i pokrewnych genów Rho. Spośród nich tylko IGTPaza jest indukowana u kleszczy żywiących się na zakażonych myszach, co sugeruje udział tego genu w odporności *Ixodes* przeciwko krętkom. Ekspresja genu IGTPazy pozostawała podwyższona w organizmach kleszczy trakcie żerowania na zakażonych żywicielach oraz po ich nasyceniu krwią. Wyciszenie genu IGTPazy zwiększa podatność kleszczy na infekcje krętkami, co potwierdza jej ważne znaczenie immunologiczne. Dostępne informacje na temat regulacji transkrypcyjnej Rho-GTPaz u kleszczy oraz ich udziału w odporności i fizjologii pozostaje ograniczona (Smith i in., 2016).

Wykazano, że zaburzenie równowagi mikrobioty jelitowej larw kleszczy *I. scapularis* prowadzi do obniżenia ekspresji STAT oraz do ograniczonej kolonizacji oraz osłabionej adhezji *B. burgdorferi* do światła jelita. Spadek poziomu STAT skutkuje zmniejszoną ekspresją perytrofiny – kluczowego składnika strukturalnego błony perytroficznej, oddziela światło jelita od nabłonka. Zachowanie integralności tej błony jest niezbędne dla skutecznej kolonizacji nabłonka jelitowego przez *B. burgdorferi*. Dane sugerują na funkcjonalne powiązanie pomiędzy mikrobiotą jelitową, sygnalizacją STAT oraz kolonizacją patogenu (Narasimhan i in., 2014).

Wyniki badań zespołu Shaw i in. (2017) wskazują, że infekcja *B. burgdorferi* prowadzi do aktywacji szlaku IMD, jednak szczegóły tej odpowiedzi pozostają nie do końca poznane. Konieczne są dodatkowe badania w celu identyfikacji efektorowych AMPs, które potencjalnie zaangażowane są w eliminowanie i hamowanie namnażania *B. burgdorferi*. Ponadto, zastosowanie interferencji RNA (ang. RNA interference, RNAi) w celu wyciszenia genów kleszczy zaangażowanych w szlak sygnalizacyjny IMD (takich jak *caspar*, *relish*, *uev1a* i *bendless*; Ryc. 1C) prowadziło do zwiększenia poziomu kolonizacji kleszczy przez *B. burgdorferi* po żerowaniu na zakażonych myszach (Kurokawa i in., 2020; McClure Carroll i in., 2019; Shaw i in., 2017). Mimo tego, że *B. burgdorferi* aktywuje szlaki JAK/STAT i IMD, mechanizmy te nie są w stanie wyeliminować krętków z organizmu kleszcza. Niewiele wiadomo na temat tego, w jaki sposób *B. burgdorferi* omija te szlaki sygnałowe w jelicie kleszcza. Lepsze zrozumienie molekularnych podstaw wrodzonej odpowiedzi immunologicznej kleszczy, interakcji między wektorem a patogenem oraz ich wpływu na przetrwanie drobnoustrojów może przyczynić się do opracowania nowych celów

molekularnych, których modulacja pozwoliłaby zakłócić cykl życiowy *B. burgdorferi* (Kurokawa i in., 2020).

Wiadomo, że genom *B. burgdorferi* koduje kilka białek kontrolujących aktywację odpowiedzi immunologicznej u ssaków podczas transmisji patogenu (Bernard i in., 2018). Nie wiadomo jednak czy bakteria ta koduje białka, które upośledzają szlaki odpowiedzi immunologicznej kleszczy. Możliwym mechanizmem tłumienia aktywacji układu immunologicznego kleszczy jest tworzenie bezkomórkowej bariery jelitowej, zwanej „siecią dityrozyny” (*ang.* dityrosine network, DTN) zależnej od aktywacji dwufunkcyjnej oksydazy NADPH o aktywności oksydazowej i peroksydazowej (*ang.* dual oxidase, duox). Podobnie jak u innych stawonogów, udowodniono, że genom *I. scapularis* koduje duox oraz co najmniej 16 potencjalnych białek peroksydazy, z których jedno wraz z duox zostało uznane za niezbędne do tworzenia DTN. U komarów *Anopheles gambiae* tworzenie DTN podczas pobierania krwi ogranicza odpowiedź immunologiczną, co może chronić pożyteczną mikroflorę jelitową przed zaburzeniami. Wyciszenie genów duox lub genu kodującego peroksydazę upośledza tworzenie DTN, co powoduje aktywację odpowiedzi immunologicznej kleszczy i zmniejszenie kolonizacji przez *B. burgdorferi* (Kumar i in., 2010; Kurokawa i in., 2020; Yang i in., 2014). Obecność lub brak DTN wpływa zatem na przeżywalność patogenów w jelicie kleszcza. Niewykształcenie tej bariery prowadzi do aktywacji ekspresji specyficznych genów wrodzonej odporności kleszczy, co potencjalnie skutkuje obniżeniem liczebności krętków. Wyciszenie duox zwiększa również aktywność syntazy tlenku azotu. Produkcja reaktywnych form azotu to dodatkowy mechanizm ochronny, którego kleszcze używają do kontrolowania patogenów, takich jak *B. burgdorferi* (Kurokawa i in., 2020; Yang i in., 2014).

Patogeny są przenoszone na żywiciela wraz ze śliną kleszczy podczas żerowania. Żerowanie to dynamiczny proces, który obejmuje penetrację naskórka, trawienie tkanek, rozszerzanie naczyń włosowatych, zapobieganie krzepnięciu i tłumienie odpowiedzi immunologicznej w miejscu wkłucia. Istotną rolę w tych procesach biorą białka wstrzykiwane do ciała żywiciela obecne w ślinie kleszczy (Anderson i Magnarelli, 2008; Francischetti, 2009). Skład śliny zmienia się w zależności od etapu życia kleszcza, rodzaju żywiciela, a także podczas karmienia, aby dostosować się do zmieniających się warunków napotykanych podczas żerowania (Ribeiro i in., 2006; Valenzuela i in., 2002). Wrodzone mechanizmy obronne skóry żywiciela stanowią główną przeszkodę, którą kleszcze muszą pokonać, aby skutecznie pobrać krew. Dlatego kleszcze rozwinęły strategie modulowania reakcji immunologicznej żywiciela (Anderson i Magnarelli, 2008; Kurokawa i in., 2020). Pierwszymi komórkami rekrutowanymi

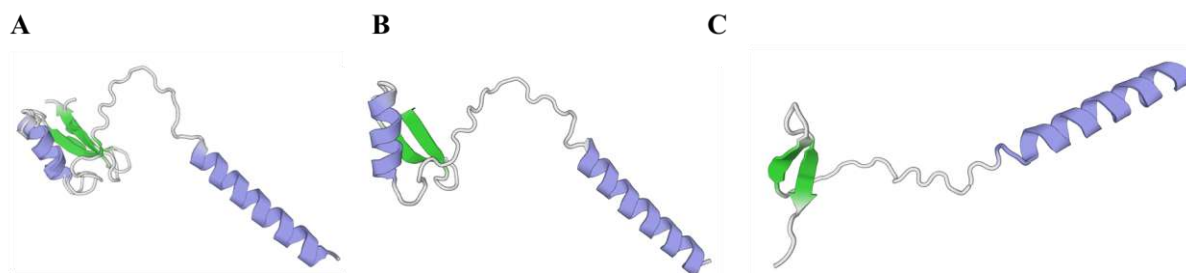
do ogniska ostrego stanu zapalnego są neutrofile. Udowodniono, że kleszcz wstrzykuje do skóry żywiciela białko ślinowe SALP25D (*ang.* salivary protein 25D), które tłumi miejscowy stan zapalny. Ponadto autorzy badania wykazali, że SALP25D jest białkiem antyoksydacyjnym, które neutralizuje reaktywne formy tlenu wytwarzane przez aktywowane neutrofile (Das i in., 2001). Badania te wykazały również, że wyciszenie białka SALP25D w *I. scapularis* upośledzało nabywanie *B. burgdorferi* (Narasimhan i in., 2007). Ponadto, dwa wydzielane białka ślinowe, ISL929 i ISL1373, zmniejszają napływ neutrofili, co zapewnia korzystne warunki transmisji *B. burgdorferi*, stanowiąc kolejny przykład transmisji wspomaganej przez ślinę (Guo i in., 2009). Innym unikalnym przykładem jest białko SALP15, które promuje transmisję *B. burgdorferi* poprzez bezpośrednie wiązanie się z krętkiem. SALP15 wiąże się również z limfocytami T CD4+ i hamuje ich aktywację oraz szlaki sygnalizacyjne zależne od interleukiny 2 (IL-2) (Anguita i in., 2002).

Defensyny kleszczy

Defensyny, wśród AMPs, są najlepiej poznaną i najszerzej opisaną grupą, zarówno u różnych gatunków kleszczy twardych (Ixodidae), jak i kleszczy miękkich (Argasidae) (Wu i in., 2022). Pierwszą opisaną defensynę oczyszczono z hemolimfy kleszcza *Ornithodoros moubata*. Jej częściowa sekwencja wykazała 100% homologii z defensyną skorpiona o masie cząsteczkowej 4 kDa (van der Goes van Naters-Yasui i in., 2000). Ekspresję defensyn potwierdzono w różnych tkankach przedstawicieli wielu gatunków tych pajęczaków (Pelc i in., 2014). Stanowią one jedną z najbardziej zróżnicowanych grup AMPs u kleszczy. Defensyny i ich izoformy zostały już scharakteryzowane u wielu rodzajów kleszczy, w tym *Ixodes* (Cabezas-Cruz i in., 2019; Hynes i in., 2005) i *Dermacentor* (Chrudimská i in., 2014; Johns, Sonenshine, i in., 2001). Do tej pory poznano jedynie jedną izoformę genu kodującego defensynę u *D. reticulatus*. Natomiast w przypadku *I. ricinus* zidentyfikowano aż osiem różnych defensyn: Def1, Def2 and DefMT2-7 (Chrudimská i in., 2014; Tonk, Cabezas-Cruz, Valdés, Rego, Rudenko, i in., 2014).

Defensyny syntetyzowane są w formie nieaktywnych propeptydów, których funkcja biologiczna nie jest znana (Tonk, 2014). Dojrzałe defensyny to bogate w cysteinę, cykliczne peptydy o masie cząsteczkowej 3-6 kDa. Większość z nich wykazuje charakter kationowy, choć opisano również nieliczne formy anionowe. Zbudowane są z 38–39 reszt aminokwasowych, z czego 6–8 to reszty cysteinowe. Cząsteczki posiadają 3-4 mostki disiarczkowe, przy czym pary: Cys1-Cys4, Cys2-Cys5 i Cys3-Cys6 tworzą wysoce konserwatywny motyw strukturalny CSαβ (α-helisa i β-harmonijka stabilizowane mostkami disiarczkowymi pomiędzy

konserwatywnymi resztami cysteiny, ang. cysteine-stabilized α -helix and β -sheet), który jest kluczowy dla ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych (Ryc. 4) (Chrudimská i in., 2010, 2011; Isogai i in., 2011; Taylor, 2006; Tonk, Cabezas-Cruz, Valdés, Rego, Chrudimská, i in., 2014; Wang i Zhu, 2011).



Rycina 4. Struktury trzeciorzędowe defensyn: A – defensyna 1 *I. ricinus* (Q7YXK5), B – defensyna 2 *I. ricinus* (Q2HY9) i C – defensyna *D. reticulatus* (ACJ04434). Modele wygenerowano przy użyciu Swiss-Model Protein Modeling Server (<http://swiss-model.expasy.org>). Charakterystyczne α -helisy i β -harmonijki stabilizowane mostkami disiarczkowymi pomiędzy konserwatywnymi resztami cysteiny (motywy CS $\alpha\beta$), które są kluczowe dla ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych zaznaczone są odpowiednio kolorem fioletowym i zielonym.

Badania wykazały, że prawidłowe fałdowanie defensyn ma bardzo istotne znaczenie dla ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych. Liniowa postać defensyny kleszczy *I. persulcatus* wykazywała niższą aktywność przeciwbakteryjną niż jej prawidłowo sfałdowana, trójwymiarowa forma (Isogai i in., 2011). Dodatkowo, obecność mostków disiarczkowych nadaje tym peptydom wysoką stabilność termiczną, odporność na zmiany pH i proteolizę (Shafee i in., 2017; Wu i in., 2022). Wiadomo, że budowa, mechanizm działania i regulacja syntezy defensyn różnią się pomiędzy poszczególnymi gatunkami kleszczy (Ryc. 4) (Tonk, 2014).

Defensyny kleszczy mają szerokie spektrum działania przeciwdrobnoustrojowego, atakują głównie bakterie Gram⁺. Niektóre izoformy są również aktywne przeciwko bakteriom Gram⁻, grzybom, wirusom i pierwotniakom (Cabezas-Cruz i in., 2016; Li i in., 2021). Ponadto, defensyny *I. ricinus* wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową również wobec *Plasmodium falciparum*, czynnika etiologicznego malarii (Cabezas-Cruz i in., 2016). Celem kationowych AMPs są błony cytoplazmatyczne bakterii. Początkowe wiązanie tych peptydów

opiera się na drodze oddziaływań elektrostatycznych, co prowadzi do rozerwania błony, a w konsekwencji do lizy komórki i śmierci bakterii. Przypuszcza się, że defensyny oraz inne kationowe AMPs mogą oddziaływać również z innymi biomolekułami, takimi jak enzymy lub kwasy nukleinowe (Wu i in., 2022). Innym wyjaśnieniem działania przeciwbakteryjnego jest depolaryzacja błony cytoplazmatycznej mikroorganizmu (Chrudimská i in., 2010). Ponadto wykazano, że kationowe AMPs selektywnie modulują odpowiedź immunologiczną żywiciela (Mookherjee i Hancock, 2007).

Longicyna, defensyna zidentyfikowana u kleszczy *Haemaphysalis longicornis* hamuje proliferację merozoitów obecnych w erytrocytach podczas infekcji *Babesia equi*. *Babesia* spp. są czynnikiem etiologicznym babeszjozy – choroby odkleszczowej atakującej zwierzęta gospodarskie. Badania *in vivo* wykazały, że longicyna indukuje redukcję parazytemii u zwierząt podczas zakażenia *B. microti* (Galay i in., 2012; Tsuji i in., 2007). Transmisyjna mikroskopia elektronowa *Micrococcus luteus* traktowanych defensyną kleszczy wykazała lizę błony cytoplazmatycznej i wyciek zawartości cytoplazmy komórkowej. Odkrycia sugerują, że głównym mechanizmem działania tych peptydów jest liza bakteryjnej błony cytoplazmatycznej (Nakajima i in., 2003). Kleszcze *Dermacentor marginatus* nie transmitują krętków z kompleksu *B. burgdorferi* s. l. Defensyna tego kleszcza ma działanie przeciwbakteryjne przeciwko *Borrelia*, co sugeruje jej rolę w eliminacji krętków pobranych wraz z krwią (Chrudimská i in., 2014). Badanie przeprowadzone przez Rudolf i Hubálek (2003) wykazało, że ekstrakty z gruczołów ślinowych i jelita środkowego kleszcza *D. reticulatus* wpływają na krętki *Borrelia garinii* w warunkach *in vitro*. Oba ekstrakty oddziałują na ruchliwość krętków, natomiast ekstrakt z gruczołów ślinowych dodatkowo zmienia ich morfologię. Wyniki te sugerują istnienie potencjalnego mechanizmu regulacyjnego w interakcji między kleszczem a patogenem.

Pomimo znaczenia defensyn, dostępnych jest niewiele informacji na temat mechanizmów regulacji ich syntezy, jak omówiono powyżej. W związku z tym niezbędne są dalsze badania nad AMPs kleszczy, aby lepiej zrozumieć ich rolę w kontroli różnych patogenów (Fogaça i in., 2021).

2. Cel, hipotezy i zadania badawcze

Pierwszym celem szczegółowym niniejszej pracy było określenie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji wybranych genów odporności wrodzonej kleszczy a obecnością patogenów chorobotwórczych u *I. ricinus* i *D. reticulatus*. Organizmy kleszczy, podobnie jak wszystkich innych organizmów wielokomórkowych, muszą skutecznie eliminować lub ograniczać namnażanie się patogenów w swoim ciele. Dla kleszczy jest to szczególnie trudne, ponieważ podczas odżywiania się pobierają one duże ilości krwi, potencjalnie zawierającej mikroorganizmy chorobotwórcze. W obronie przed infekcjami stawonogi polegają na mechanizmach odporności wrodzonej, w której kluczową rolę odgrywają szlaki sygnalizacji immunologicznej oraz synteza licznych AMPs, spośród których defensyny odgrywają szczególnie istotną rolę.

W związku z powyższym, w Publikacji 1 skupiono się na porównaniu poziomu ekspresji genów kodujących dwie najlepiej poznane defensyny kleszcza *I. ricinus* (*def1* i *def2*) oraz jedynej dotychczas poznanej defensyny kleszcza *D. reticulatus* (*defDr*) w obecności patogenów: *Borrelia* spp. *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp. *Rickettsia* spp. oraz *N. mikurensis* (**Publikacja 1:** Szczotko i in. 2024).

Ekspresja peptydów AMPs jest kontrolowana przez określone szlaki sygnałowe. Choć szlak JAK/STAT u kleszczy pozostaje słabo poznany, dostępne dane sugerują jego funkcjonalność i istotną rolę w odpowiedzi immunologicznej przeciwko patogenom (Narasimhan i in., 2014; Smith i in., 2016). Kleszcze *I. ricinus* są wektorami patogenów o znaczeniu medycznym i weterynaryjnym, w tym krętków *B. burgdorferi* s. l.

W niniejszych badaniach, w ramach realizacji drugiego celu szczegółowego, podjęto próbę określenia zmian profilu ekspresji genów szlaku JAK/STAT w wybranych tkankach kleszczy *I. ricinus* w obecności krętków wywołujących LB. W związku z tym, że szlak JAK/STAT reguluje ekspresję AMPs, a defensyny są zaliczane do najważniejszych elementów odporności wrodzonej kleszczy, przedmiotem badań było określenie zmian ekspresji genów trzech AMPs zaliczanych do grupy defensyn: defensyny 1, defensyny 2 i ricinusiny w ważnych immunologicznie tkankach kleszczy: śliniankach i jelicie. Zbadano również ekspresję genu kodującego lizozym. Wykazano, że kompleks defensyny kleszczy *D. variabilis* i kurzego lizozymu posiada działanie przeciwdrobnoustrojowe wobec krętków *Borrelia* spp. Peptydy zastosowane oddzielnie nie wykazywały takiego efektu. Interesującym jest jaką rolę pełni lizozym kleszczy w odpowiedzi na patogeny (Johns, Ohnishi, i in., 2001; Johns, Sonenshine, i in., 2001) (**Publikacja 2:** Szczotko i in. 2025).

Badania miały na celu zbadanie mechanizmów ekspresji genów odporności wrodzonej kleszczy będącej istotnym elementem odporności bezkręgowców. Fragmentaryczne dane literaturowe pozwoliły na sformułowanie następującej hipotez badawczych:

1. Poziom ekspresji genów defensyn wzrasta wraz z obecnością patogennych bakterii w ciele kleszczy (**Publikacja 1:** Szczotko i in. 2024).
2. Poziom ekspresji genów AMPs i JAK/STAT wzrasta i różni się pomiędzy wybranymi tkankami kleszczy, w których wykryto obecność *B. burgdorferi* s. l. a tymi, w których ich nie stwierdzono (**Publikacja 2:** Szczotko i in. 2025).

W celu weryfikacji postawionych hipotez zaplanowano następujące zadania badawcze:

1. Określenie poziomu ekspresji genów wybranych defensyn w kleszczach *I. ricinus* i *D. reticulatus* w obecności *Borrelia* spp., *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. oraz *N. mikurensins* (**Publikacja 1:** Szczotko i in. 2024).
2. Określenie poziomu ekspresji wybranych genów AMPs i genów szlaku JAK/STAT w tkankach kleszczy *I. ricinus* w obecności krętków *B. burgdorferi* s. l. (**Publikacja 2:** Szczotko i in. 2025).

3. Materiały i metody

Zadanie 1

Określenie poziomu ekspresji genów wybranych defensyn w kleszczach *I. ricinus* i *D. reticulatus* w obecności *Borrelia spp.*, *A. phagocytophilum*, *Babesia spp.*, *Rickettsia spp.* oraz *N. mikurensins* (**Publikacja 1:** Szczotko i in. 2024):

Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły kleszcze *I. ricinus* i *D. reticulatus* zebrane ze środowiska metodą flagowania (Espada i in., 2021) oraz kleszcze pasożytujące na psach przebywających w schronisku w Tomarynach. Kleszcze wolnożyjące pozyskiwano w latach 2021 i 2022 w okresie od kwietnia do października na terenach miejskich i podmiejskich województwa Warmińsko-Mazurskiego w północno-wschodniej Polsce. Wszystkie badane osobniki zostały oznaczone stosując klucz taksonomiczny (Nowak-Chmura, 2013). Łącznie zbadano 428 kleszczy (Tabela 1). Do momentu dalszych analiz materiał badawczy był przechowywany w buforze StayRNA™ (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska) (Ryc. 5).

Izolacja RNA/DNA

Kwasy nukleinowe z kleszczy wolnożyjących ekstrahowano z całych osobników przy użyciu odczynnika NZYol (NZYTech, Lizbona, Portugalia) zgodnie z instrukcją producenta. Kleszcze napelnione krwią przecinano wzdłuż ciała sterylnym skalpelem i dzielono na dwie części. Następnie RNA i DNA izolowano oddzielnie z uzyskanych części ciała kleszcza, stosując zestawy Total RNA Mini Plus (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) i Genomic Micro AX Tissue Gravity (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Ilość oraz stopień czystości uzyskanego RNA i DNA określono spektrofotometrycznie przy użyciu NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Dla potwierdzenia uzyskanych wyników zastosowano również Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Szwajcaria). Dodatkowo, w celu oceny jakości uzyskanego DNA i wykrycia potencjalnej inhibicji przeprowadzona została reakcja łańcuchowa polimerazy (*ang.* polymerase chain reaction, PCR) genu 16S rDNA kleszczy przy użyciu PCR Mix Plus Green (A&A Biotechnology, Gdańsk Polska) zgodnie z warunkami opisanymi przez Black i Piesmant (1994).

Tabela 1. Ilość osobników poddanych analizie w Zadaniu 1

Kleszcze wolnożyjące				
Gatunek	Samice	Samce	Nimfy	Suma
<i>I. ricinus</i>	61	45	23	129
<i>D. reticulatus</i>	44	52	-	96
Suma	105	97	23	225
Kleszcze zebrane z psów				
Gatunek	Samice	Samce	Nimfy	Suma
<i>I. ricinus</i>	77	7	-	84
<i>D. reticulatus</i>	104	15	-	119
Suma	181	22		203

Wykrywanie patogenów *Borrelia* spp., *A. phagocytophilum*, *Babesia* spp., *Rickettsia* spp. oraz *N. mikurensis* w kleszczach *I. ricinus* i *D. reticulatus*

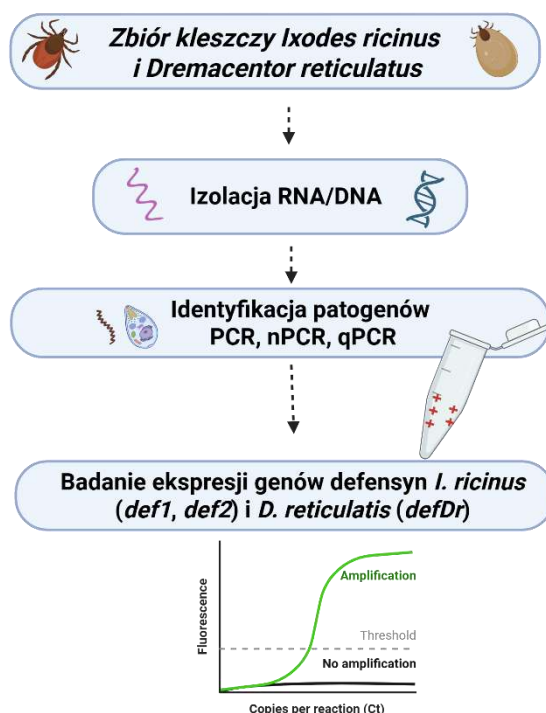
Wykrywanie *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp. przeprowadzono przy użyciu jednostopniowej reakcji PCR. W celu detekcji *A. phagocytophilum* zastosowano wewnętrzny, dwustopniowy PCR (ang. nested Polymerase Chain Reaction, nPCR) z zastosowaniem dwóch par starterów. Obecność *N. mikurensis* została zbadana za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR). W celu wyznaczenia optymalnego stężenia matrycy, granicy wykrywalności materiału genetycznego jak również potencjalnej interferencji w PCR i obecności inhibitorów każdą z przytoczonych metod zweryfikowano poprzez przeprowadzenie amplifikacji z serią rozcieńczeń matrycy (od 1 µg do 0,1 pg) przy użyciu odpowiednich starterów. Niezależnie od reakcji, mieszanina reakcyjna o objętości 25 µl zawierała: 12,5 µl PCR Mix Plus Green (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska), 10,5 µl wody wolnej od nukleaz, 0,5 µl każdego startera (10 µM) i 1 µl (100 ng) matrycy. W przypadku kontroli negatywnej zamiast DNA wyizolowanego z kleszczy dodawano 1 µl wody wolnej od nukleaz. Dla każdej reakcji zastosowano kontrolę pozytywną, którą stanowił oczyszczony produkt reakcji PCR, w którym potwierdzono obecność patogenu za pomocą metody sekwencjonowania. Detekcję *Borrelia* spp. prowadzono za pomocą starterów SL1/SL2 specyficznych do fragmentu genu białka powierzchniowego (*ospA*) na podstawie warunków reakcji opisanych przez Demaerschalck i in. (1995). Do wykrycia materiału genetycznego *Rickettsia* spp. zastosowano startery CS409/Rp1258 komplementarne do fragmentu genu syntazy cytrynianowej (*gltA*), zgodnie z protokołem opisanym przez Roux i in.

(1997). Obecność *Babesia* spp. potwierdzono przy użyciu starterów BJ1/BN2 specyficznych do fragmentu genu kodującego 18S rRNA według protokołu opisanego przez Casati i in. (2006). Detekcję *A. phagocytophilum* w materiale genetycznym kleszczy potwierdzono metodą nPCR z użyciem dwóch zestawów starterów komplementarnych do fragmentu genu 16S rRNA - ge3a/ge10r oraz ge9f/ge2 zgodnie z warunkami reakcji opisanymi przez Massung i in. (1998). Każda reakcja była przeprowadzana z zastosowaniem zarówno próby negatywnej w której zamiast matrycy dodawano wodę jak i pozytywnej. Kontrolę pozytywną stanowiły próby, w których wykryto obecność docelowego patogenu, a specyficzność uzyskanego produktu została potwierdzona metodą sekwencjonowania. *Szczegółowe dane dotyczące zastosowanych starterów dostępne są w Tabeli 1 w publikacji 1.*

Detekcja produktów amplifikacji DNA bakterii przeprowadzona została w 2% żelu agarozowym, z dodatkiem SimplySafe™ (EURx, Gdańsk, Polska). Rozdział elektroforetyczny prowadzono przy napięciu 60 V przez 10 minut, a następnie przy napięciu 100V przez 35 minut w urządzeniu firmy w aparacie firmy BIO-RAD.

Reakcje qPCR (*N. mikurensis*) przeprowadzono w systemie QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System firmy Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Mieszanina reakcyjna o objętości 10 µl zawierała: 5 µl SYBR Green Mix (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone), po 0,2 µl każdego ze starterów (10 µM), 1 µl matrycy cDNA (100 ng) i 3,6 µl wody wolnej od nukleaz. Krzywe wzorcowe zostały wygenerowane przy użyciu ośmiokrotnych seryjnych rozcieńczeń z komercyjnie zsyntetyzowanym fragmentem genu 16S rRNA *N. mikurensis*, gBlocks® (IDT-Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgia). *N. mikurensis* u kleszczy zebranych ze środowiska i napitych krwią przeprowadzono odpowiednio przy użyciu cDNA i DNA. Reakcje qPCR przeprowadzono w warunkach opisanych w poprzednim badaniu (Szczotko i in., 2023), stosując startery NEO_16S_F/NEO_16S_R opracowane przez Sandelin i in. (2015) w celu amplifikacji sekwencji genu 16S rRNA.

W celu potwierdzenia otrzymanych wyników, wybrane produkty oczyszczono przy użyciu zestawu Clean-up (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska), zgodnie z procedurą producenta. Oczyszczone próby poddane zostały sekwencjonowaniu w firmie MacroGen (Amsterdam, Holandia). Po złożeniu sekwencji porównano je z danymi zarejestrowanymi w bazie danych GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank>) za pomocą programu BLAST-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Ryc. 5).



Rycina 5. Schemat badawczy *Zadania 1*. Grafika została opracowana w programie BioRender (<https://app.biorender.com/>).

Ekspresja genów defensyn w kleszczach I. ricinus i D. reticulatus

Ekspresję genów kodujących defensyny *I. ricinus* (*def1* i *def2*) oraz *D. reticulatus* (*defDr*) w materiale genetycznym kleszczy, w którym wykryto obecność jednego lub więcej patogenów, określono za pomocą metody Real-Time PCR. Jako kontrolę wykorzystano materiał genetyczny, w którym nie stwierdzono obecności żadnego z analizowanych patogenów.

Pierwszy etap stanowiła odwrotna transkrypcja przeprowadzona przy użyciu zestawu RT PCR Mix SYBR® (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska), zgodnie z instrukcją producenta. Uzyskane cDNA posłużyło jako matryca reakcji qPCR. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziło: 1 µl (100 ng) cDNA, 5 µl SYBR Green PCR-MIX i 0,15 µl ROX, 3,85 µl wody wolnej od nukleaz. Wszystkie próby poddano analizie w trzech powtórzeniach w systemie QuantStudio™ 3 Real-Time PCR firmy Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

W badaniach jako geny referencyjne posłużyły: gen aktyny (*ACT*) oraz gen czynnika elongacyjnego 1 (*EF-1*). Optymalizacja reakcji została przeprowadzona przy użyciu metody krzywej standardowej, opracowanej na podstawie prób z rozcieńczeniami całkowitego RNA o znanym stężeniu. Uzyskane wyniki zostały znormalizowane w stosunku do poziomu

ekspresji dwóch genów referencyjnych oraz w stosunku do kontroli, którą stanowił materiał genetyczny kleszczy, w którym nie potwierdzono obecności żadnego z badanych patogenów. Wyniki zostały przedstawione w jednostkach umownych stosując metodę $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak i Schmittgen, 2001).

Szczegółowe dane dotyczące zastosowanych starterów dostępne są w Tabeli 2 w publikacji 1.

Analiza statystyczna

Grupy liczące mniej niż 10 osobników zostały wykluczone z analizy statystycznej i nie zostały uwzględnione na wykresach. Analiza porównawcza ekspresji genów defensyn została przeprowadzona w odniesieniu do obecności konkretnych gatunków patogenów, stadiów rozwojowych kleszczy, fazy żerowania, a także w zależności od liczby wykrytych patogenów – porównano osobniki zakażone jednym patogenem z tymi, u których stwierdzono obecność dwóch lub więcej patogenów. Dane analizowano przy użyciu GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Kalifornia, USA) i Statistica 13.3 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Uzyskane wartości ΔCq poddano analizie statystycznej. Normalność uzyskanych wartości ΔCq potwierdzono za pomocą testu Shapiro–Wilka (Shapiro i Wilk, 1965). Do oceny różnicy pomiędzy średnimi porównywanych grup wykorzystano analizę wariancji (ANOVA) lub jej nieparametryczny odpowiednik. Wartości $P < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

Zadanie 2

Określenie poziomu ekspresji wybranych genów AMPs i genów szlaku JAK/STAT w tkankach kleszczy I. ricinus w obecności krętków B. burgorferi s. l. (Publikacja 2: Szczotko i in. 2025):

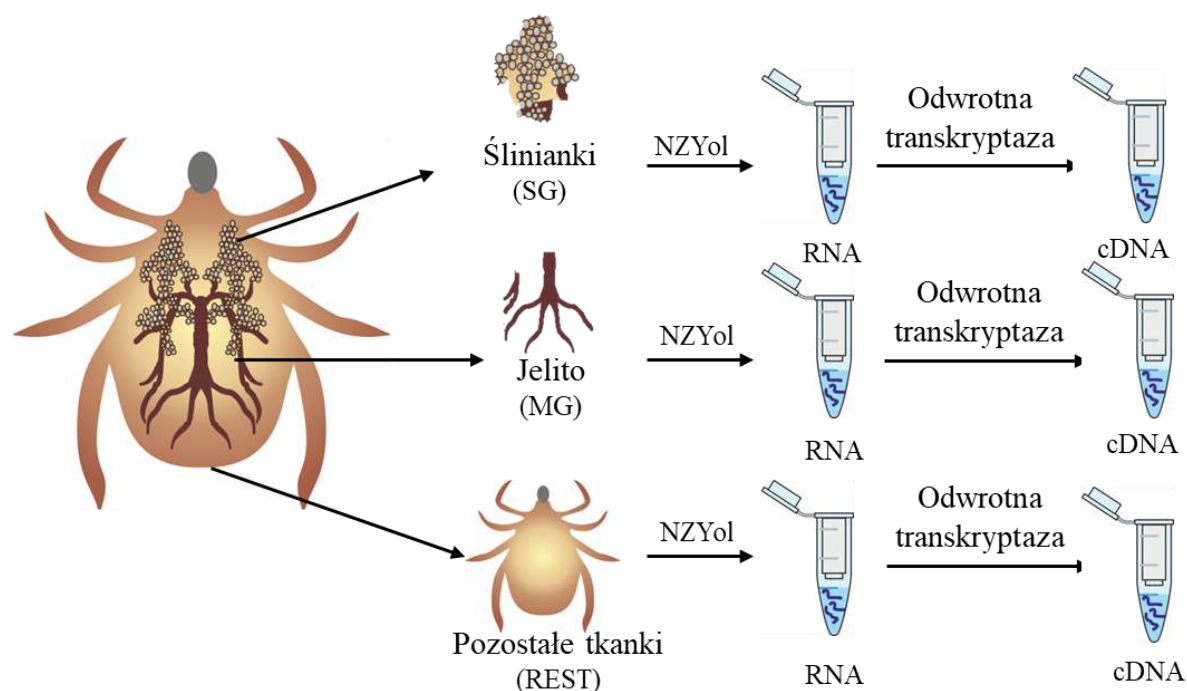
Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiło 50 dorosłych samic *I. ricinus* zebranych ze środowiska za pomocą metody flagowania (Espada i in., 2021). Osobniki odławiano na terenach miejskich województwa Warmińsko-Mazurskiego w okresie od kwietnia do października 2023 roku w godzinach od 9.00 do 16.00. Kleszcze do czasu analiz molekularnych były przechowywane w buforze STAY RNATM (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska). Wszystkie osobniki, które zostały poddane analizie zidentyfikowano według gatunku, płci i stadium rozwojowego przy użyciu klucza taksonomicznego (Nowak-Chmura, 2013).

Izolacja RNA

Przed rozpoczęciem izolacji materiału genetycznego, kleszcze trzykrotnie przepłukano sterylnym roztworem NaCl o stężeniu 0,9%. Następnie każdy osobnik został poddany sekcji,

podczas której wyodrębniono trzy grupy tkanek: gruczoły ślinowe (SG), jelito środkowe (MG) oraz pozostałe tkanki (REST). Sekcja tkanek została przeprowadzona w sterylnych warunkach w kropli wody, przy użyciu skalpela, pęsety oraz binokularu. Materiał genetyczny z 150 próbek tkanek izolowano indywidualnie, stosując odczynnik NZYol (NZYTech, Lizbona, Portugalia) zgodnie z zaleceniami producenta. Stężenie uzyskanego RNA mierzono przy użyciu urządzenia NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Ryc. 6).

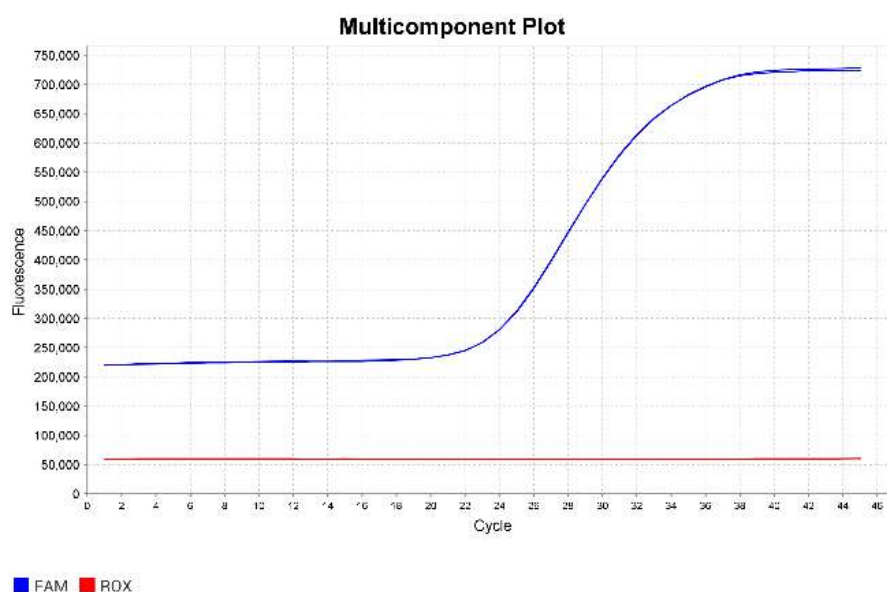


Rycina 6. Zadanie 2 – Przygotowanie materiału badawczego. Rycina wykonana w SciPainter (<http://www.scipainter.com/>).

Wykrywanie *B. burgdorferi* s. l. w materiale genetycznym

RNA wyekstrahowane z tkanek kleszczy przepisano na cDNA za pomocą zestawu TranScriba (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska), wykorzystując równą ilość RNA (1 µg). Jakość i ilość cDNA po procesie odwrotnej transkrypcji oceniono przy użyciu urządzenia NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Dla potwierdzenia uzyskanych wyników zastosowano również Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Szwajcaria). cDNA przeznaczone do dalszych analiz rozcieńczono wodą wolną od nukleaz, aby uzyskać stężenie wynoszące 100 ng/µl. Obecność *B. burgdorferi* s. l. analizowano we wszystkich wyekstrahowanych próbkach cDNA. Każdą z nich poddano ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (TaqMan Real-Time PCR). Detekcję

B. burgdorferi s. l. przeprowadzono z wykorzystaniem specyficznych starterów dla sekwencji 23S RNA (Bb23Sf/Bb23Sr) oraz sondy TaqMan Bb23Sp, oznaczonej na końcu 5' fluoroforem FAM i na końcu 3' wygaszaczem TAMRA. Gen 23S rRNA, będący celem amplifikacji, jest wysoce konserwatywny wśród gatunków *Borrelia*. Mieszanina reakcyjna do wykrywania krętków składała się z 1 µl cDNA (100 ng), 5 µl mieszaniny RT PCR (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska), 0,2 µl sondy oraz 0,5 µl każdego startera w stężeniu 10 µmol. Do uzyskania końcowej objętości 10 µl próbki uzupełniono wodą wolną od nukleaz. Każda próba była analizowana w trzech powtórzeniach. Każda reakcja qPCR była przeprowadzana z zastosowaniem zarówno próby negatywnej w której zamiast matrycy dodawano wodę jak i pozytywnej. Próbę pozytywną stanowił materiał genetyczny wyizolowany z hodowli krętków *B. burgdorferi* s. l. Reakcję PCR przeprowadzono zgodnie z protokołem opisanym przez Cicculli i in. (2019).



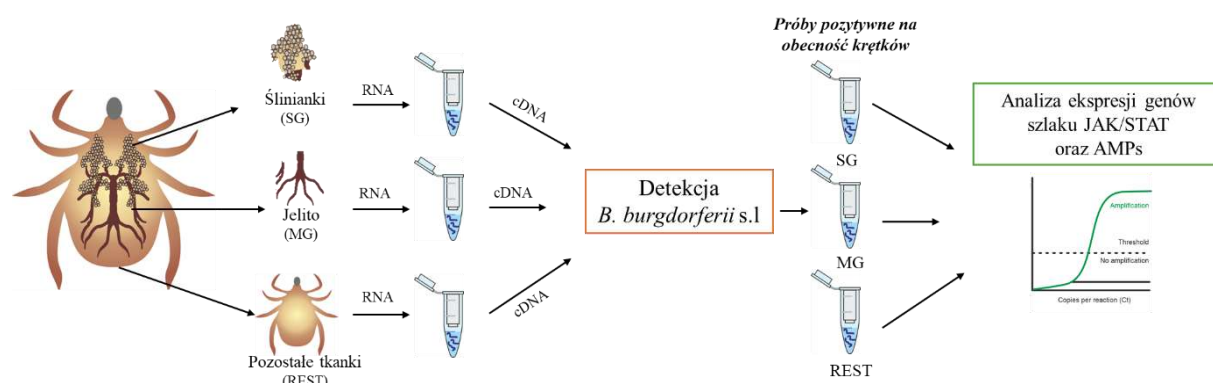
Rycina 7. Pozytywny wynik reakcji qPCR wykrywającej krętka *B. burgdorferi* s. l. w próbce numer 8 (cDNA jelita kleszczy *I. ricinus*). Obraz przedstawia sygnał wskazujący na obecność materiału genetycznego krętków.

Ekspresja genów szlaku JAK/STAT oraz AMPs

Analizie poddano ekspresję pięciu genów zaangażowanych w szlak sygnałowy JAK/STAT kleszcza: JAK, STAT, transdukcijnej cząsteczki adaptorowej (*ang.* Signal Transducing Adaptor Molecule, STAM), supresora sygnalizacji cytokin (*ang.* Suppressor of Cytokine Signalling, SOCS) oraz białkowego inhibitora aktywowanego STAT (*ang.* Protein

Inhibitor of Activated STAT, PIAS). Ponadto analizowano cztery geny kodujące różne AMPs: defensynę 1 (*def1*), defensynę 2 (*def2*), lizozym (*lzs*) oraz ricinusinę (*ric*). Ekspresję wymienionych genów zbadano w próbkach, w których potwierdzona została obecność *B. burgdorferi* s. l. (Ryc. 7, 8).

Startery specyficzne do wymienionych genów szlaku, zostały zaprojektowane w programie Primer3plus (<https://www.primer3plus.com/index.html>). Każdą metodę zoptymalizowano pod kątem doboru temperatury oraz stężenia matrycy. Wydajność qPCR oszacowano za pomocą krzywej standardowej, uzyskanej z serii 10-krotnych rozcieńczeń docelowej matrycy. Każda krzywa standardowa obejmowała sześć różnych stężeń matrycy, a skuteczność reakcji qPCR wynosiła od 98% do 100% dla każdego testu. Test qPCR przeprowadzono w trzech powtórzeniach, wykorzystując system QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Mieszanina reakcyjna składała się z 1 µl cDNA (100 ng), 5 µl RT PCR Mix SYBR® (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska), 0,2 µl barwnika referencyjnego ROX (5-karboksy-X-rodaminy), 0,5 µl każdego startera (10 µmol; tabela S1 – dane uzupełniające) oraz wody wolnej od nukleaz do uzyskania końcowej objętości 10 µl. Wyniki przedstawiono jako krotność zmian w ekspresji genów, znormalizowanych względem dwóch endogennych genów referencyjnych: *ACT* oraz *EF-1*. Obliczeń dokonano za pomocą metody $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak i Schmittgen, 2001). Dodatkowo, wyniki znormalizowano względem kontroli, którą stanowiły tkanki: SG, MG oraz REST w których nie wykryto obecności krętków. Szczegółowe dane dotyczące zastosowanych starterów dostępne są w Tabeli S1 w publikacji 2.



Rycina 8. Graficzne przedstawienie etapów analiz przeprowadzonych w celu realizacji *Zadania 2*. Rycina wykonana w SciPainter (<http://www.scipainter.com/>).

Analiza statystyczna

Dane analizowano przy użyciu GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Kalifornia, USA) i Statistica 13.3 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). Uzyskane wartości ΔC_q poddano analizie statystycznej. Normalność uzyskanych wartości ΔC_q potwierdzono za pomocą testu Shapiro–Wilka (Shapiro i Wilk, 1965). Do oceny różnicy pomiędzy średnimi porównywanych grup wykorzystano analizę wariancji (ANOVA) lub jej nieparametryczny odpowiednik. Wartości $P < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

4. Omówienie wyników

Zadanie 1

Określenie poziomu ekspresji genów wybranych defensyn w kleszczach I. ricinus i D. reticulatus w obecności Borrelia spp., A. phagocytophilum, Babesia spp., Rickettsia spp. oraz N. mikurensins

Szczegółowe wyniki badań oraz ich omówienie zostało przedstawione w Publikacji 1:

Szczotko, M., Antunes, S., Domingos, A., Kubiak, K., Dmitryjuk, M. (2024). Tick-Borne pathogens and defensin genes expression: A closer look at Ixodes ricinus and Dermacentor reticulatus. Developmental and Comparative Immunology, 160, 105231. DOI: 10.1016/j.dci.2024.105231

Prewalencja patogenów

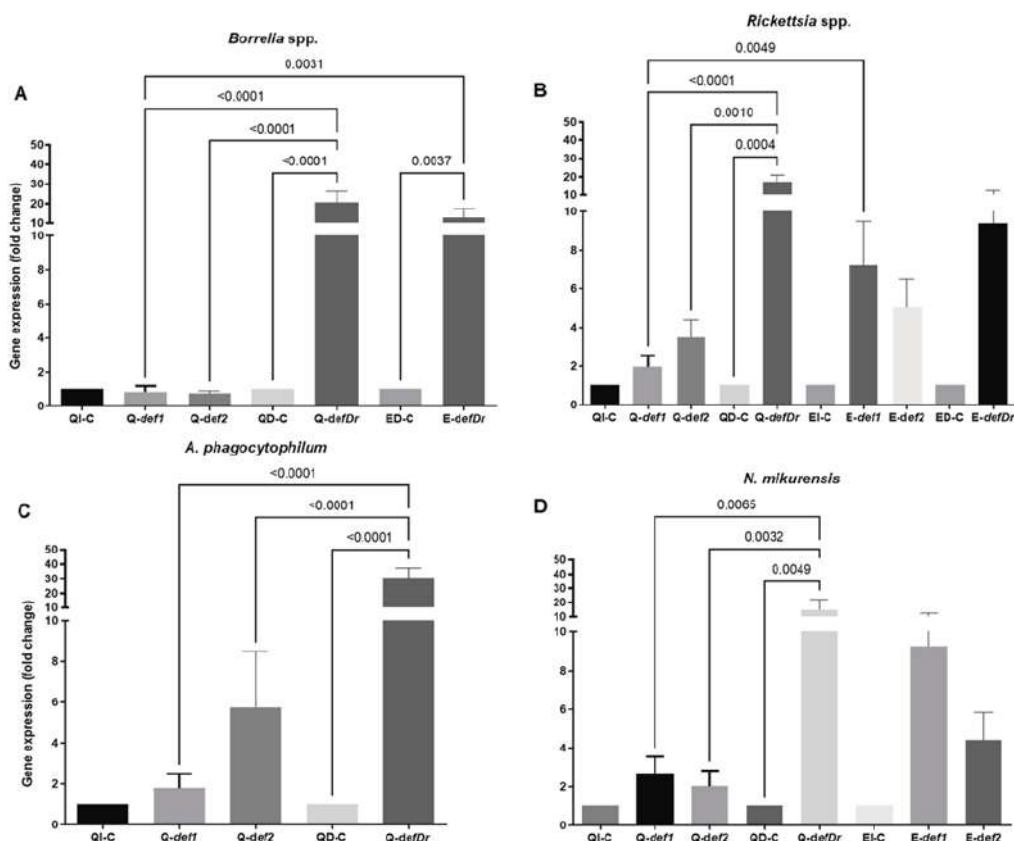
W badaniu wykazano, że ponad 50% z 428 przebadanych kleszczy przenosiło jeden lub więcej patogenów. Koinfekcje stwierdzono u około jednej trzeciej badanych osobników. Analizy statystyczne wykazały, że prawdopodobieństwo jednoczesnego występowania kilku patogenów w badanych kleszczach było niskie, a zaobserwowane przypadki miały raczej charakter losowy. Prewalencja patogenów, określona w naszym badaniu jest zgodna z zakresami obserwowanymi w innych badaniach europejskich (Arz i in., 2023; Gandy i in., 2022; Larsson i in., 2018; Sands i in., 2022; Strnad i in., 2017). W tym miejscu należy podkreślić, że patogeny wykryte w materiale genetycznym wyizolowanym z kleszczy zbieranych z psów mogą nie w pełni odzwierciedlać faktycznego zakażenia tych pajęczaków. Pozytywny sygnał uzyskany w reakcji PCR może wynikać zarówno z obecności patogenu w kleszczu jak i we krwi pobranej od żywiciela. Jak wspomniano wcześniej, kleszcze *I. ricinus* są głównymi wektorami patogenów wywołujących choroby odkleszczowe ludzi w Europie. Choć wiele zakażeń spowodowanych przez te patogeny ma przebieg bezobjawowy lub łagodny i samoograniczający się, należy poważnie brać pod uwagę ich potencjał wywoływania ciężkich chorób, zwłaszcza u osób z obniżoną odpornością. Ze względu na brak charakterystycznych objawów, niską świadomość społeczną, brak skutecznego nadzoru oraz ograniczoną dostępność i wykorzystanie testów diagnostycznych, wiele przypadków tych słabo rozpoznanych chorób odkleszczowych prawdopodobnie pozostaje niezdiagnozowanych. W konsekwencji ich faktyczny wpływ na zdrowie publiczne pozostaje niejasny (Quarsten i in., 2023). Wyniki pierwszego etapu badań potwierdzają, że kleszcze *I. ricinus*, jak i *D. reticulatus* są rezerwuarem licznych patogenów i odgrywają istotną rolę w utrzymywaniu patogenów odkleszczowych w środowisku (Rubel i in., 2020; Zajac i in., 2023). Jednakże badania nad

częstością występowania patogenów odkleszczowych stanowią jedynie tło *Zadania 1*, niezbędne do wykonania kolejnego etapu.

Analiza różnic w ekspresji genów defensyn kleszczy I. ricinus i D. reticulatus

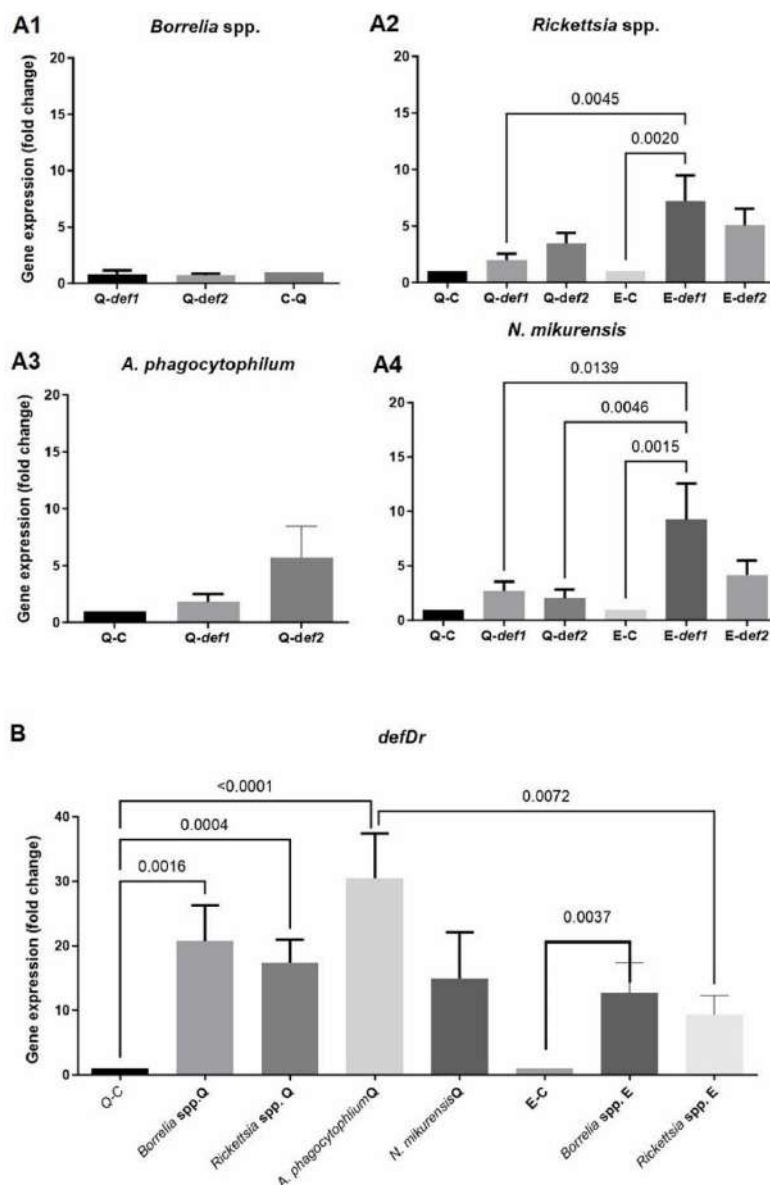
Analiza uzyskanych wyników potwierdziła naszą hipotezę, że obecność patogenów może wpływać na ekspresję genów defensyn w ciele kleszcza. Zależność, obserwowana jest również u innych organizmów. Wyniki przedstawiają różnice w mechanizmach wrodzonej odporności kleszczy tj. ekspresji genów defensyn co można powiązać z odmiennymi kompetencjami wektorowymi poszczególnych gatunków (Taylor, 2006).

Obecność patogenów. Zaobserwowaliśmy istotne zmiany w ekspresji genów defensyn kleszczy w obecności *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *N. mikurensis* i *A. phagocytophilum* (Ryc. 9). We wszystkich przypadkach wzrost ekspresji był obserwowany w kleszczach *D. reticulatus* poszukujących żywiciela. W przypadku *def1* i *def2* w obecności krętków ekspresja nie wykazywała istotnego wzrostu. Natomiast ekspresja genu *defDr* wzrosła kilkukrotnie w porównaniu do grupy kontrolnej. Może to wynikać z faktu, że *I. ricinus* są bardzo skutecznymi wektorami *Borrelia* spp. (Sprong i in., 2018). Zdolność do transmisji krętków przez gatunek *D. reticulatus* nie została potwierdzona. Podwyższoną ekspresję genu *defDr* można powiązać z różnicami w zdolnościach wektorowych dwóch badanych gatunków kleszczy. Potwierdzają to wyniki badań innych zespołów. Chrudimská i in. (2014) wskazują na możliwą rolę defensyny *D. marginatus* w eliminacji *Borrelia* pobranych wraz z krwią. Inni badacze zaobserwowali, że defensyna *D. variabilis* (varisina) wraz z kurzym lizozymem działają bakteriobójczo na krętki. *D. variabilis* podobnie jak *D. reticulatus*, nie jest zdolny do utrzymania i przenoszenia *B. burgdorferi* s. l. co sugeruje możliwy udział varisiny i lizozymu w eliminacji krętków w organizmie tego gatunku kleszcza (Johns, Ohnishi, i in., 2001; Johns, Sonenshine, i in., 2001). Badania wykazały również, że ekstrakt z jelita środkowego *D. reticulatus* wpływa na ruchliwość krętków, a ekstrakt z gruczołów ślinowych zmienia morfologię *B. garinii* w warunkach *in vitro* (Rudolf i Hubálek, 2003). Nie udowodniono również, żeby kleszcz *D. reticulatus* miał zdolność do transmisji *N. mikurensis* i *A. phagocytophilum* (Kubiak i in., 2024). Niemniej jednak, podobnie jak w przypadku krętków, w odpowiedzi na kontakt z tymi bakteriami zaobserwowano znaczny wzrost ekspresji genu *defDr* w porównaniu do genów defensyn u *I. ricinus* (Ryc. 9).



Rycina 9. Zmiany ekspresji genów *def1*, *def2* i *defDr* w obecności patogenów w kleszczach napitych krwią i szukających żywiciela: *Borrelia* spp. (A), *Rickettsia* spp. (B), *A. phagocytophilum* (C), *N. mikurensis* (D). Q – kleszcze szukające żywiciela (*ang.* questing), E – kleszcze napite krwią (*ang.* engorged) QI-C – kontrola dla kleszczy *I. ricinus* szukających żywiciela, EI-C – kontrola dla kleszczy *I. ricinus* napitych krwią, QD-C – kontrola dla kleszczy *D. reticulatus* szukających żywiciela, ED-C – kontrola dla kleszczy *D. reticulatus* napitych krwią.

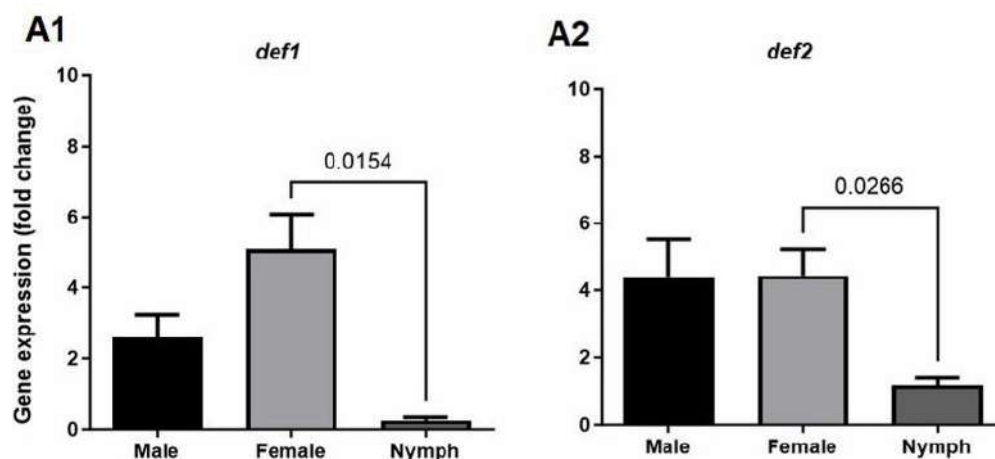
Faza żerowania kleszcza. Wyniki eksperymentu wskazują na wyższą ekspresję genów defensyn kleszczy *I. ricinus* zebranych z psów niż kleszczy poszukujących żywiciela. Badanie Zhou i in. (2007) wykazało, że ekspresja defensyn kleszczy wzrasta po spożyciu nawet niezainfekowanej krwi żywiciela. Kleszcze są naturalnie narażone na środowisko krwi żywiciela, które może zawierać zakaźne patogeny. Sugeruje to, że samo pobieranie krwi może pełnić funkcję czynnika indukującego ekspresję białek obronnych kleszcza jeszcze przed faktycznym zakażeniem (Chrudimská i in., 2011). Co ciekawe, możemy zaobserwować tendencję do zmniejszania ekspresji genu *defDr* u zakażonych *D. reticulatus*, gdy kleszcze są napelnione krwią. Może to być związane z różnymi mechanizmami odporności wrodzonej u dwóch badanych gatunków kleszczy (Ryc. 10).



Rycina 10. A. Zmiana ekspresji genów *def1* i *def2* w *I. ricinus* poszukujących żywiciela (Q-*def1*, Q-*def2*) i kleszczy napitych krwią psów (E-*def1*, E-*def2*) przy potwierdzonej obecności *Borrelia* spp. (A1), *Rickettsia* spp. (A2), *A. phagocytophilum* (A3) i *N. mikurensis* (A4). **B.** Zmiana ekspresji genu defensyny *D. reticulatus* (*defDr*) w odpowiedzi na obecność *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* i *N. mikurensis*; Q-C – kontrola dla kleszczy szukających żywiciela, E-C – kontrola dla kleszczy napitych krwią.

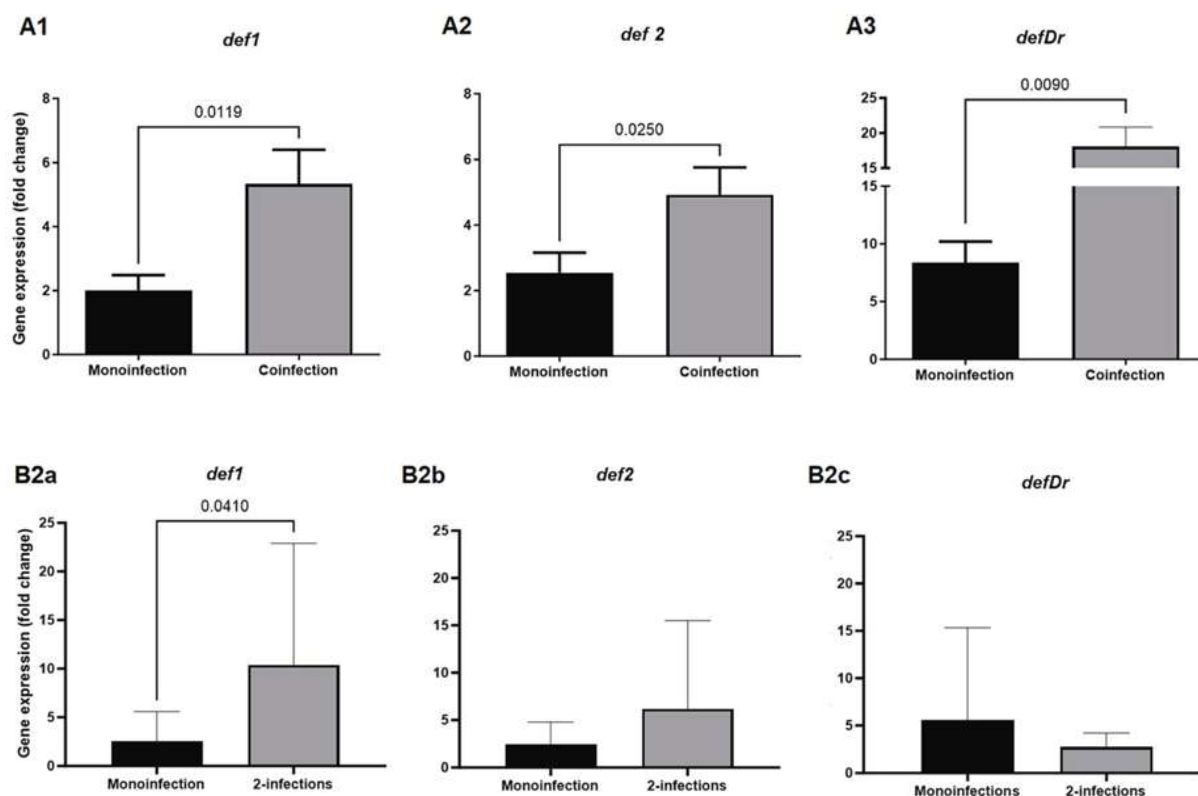
Stadia rozwojowe. Porównanie ekspresji genów między różnymi stadiami rozwojowymi kleszczy *I. ricinus* wykazało, że jest ona znacząco niższa u nimf niż u samic (Ryc. 11). Wynik może mieć związek ze zdolnością wektorową tego gatunku kleszczy i dotyczyć specyficznych interakcji między kleszczem a patogenem. Samice żerują na żywicielu dłużej i pobierają większe ilości krwi niż nimfy. Może to sprzyjać pobieraniu patogenów i skutkować zwiększoną

ekspresją genów defensyn. Z drugiej strony nimfy *I. ricinus* są uznawane za kluczowe wektory krętków boreliozy (Kubiak i in., 2022). Sugeruje to, że niska ekspresja genów defensyn na tym etapie rozwojowym może ułatwiać transmisję bakterii.



Rycina 11. Różnice ekspresji genów *def1*, *def2* pomiędzy stadiami rozwojowymi *I. ricinus*.

Współwystępowanie patogenów. Współwystępowanie dwóch lub więcej patogenów stwierdzono u około jednej trzeciej zbadanych kleszczy. Zaobserwowano statystycznie istotne różnice w poziomie ekspresji genów defensyn u kleszczy w zależności od tego, czy wykryto u nich infekcję pojedynczym patogenem, czy też koinfekcję (Ryc. 12A1-A3). Szczegółowa analiza statystyczna, uwzględniająca liczbę patogenów wykrytych w materiale genetycznym pojedynczego osobnika, wykazała istotne różnice jedynie w ekspresji genu *def1* kleszczy *I. ricinus* jedynie w przypadku jednoczesnego wykrycia dwóch patogenów (Ryc. 12B2a-2c).



Rycina 12. Różnice ekspresji genów *def1*, *def2* i *defDr* pomiędzy osobnikami ze stwierdzoną obecnością jednego patogenu (A1, A2, A3) i w obecności dwóch lub więcej patogenów (B2a, B2b, B2c).

Zadanie 2

Określenie poziomu ekspresji wybranych genów AMPs i genów szlaku JAK/STAT w tkankach kleszczy *I. ricinus* w obecności krętków *B. burgdorferi* s. l.

Szczegółowe wyniki badań oraz ich omówienie zostało przedstawione w Publikacji 2: Szczotko, M., Antunes, S., Domingos, A. Dmitryjuk M. (2025). Investigation of genes expression of the JAK/STAT signalling pathway and AMPs in the presence of *Borrelia spirochetes* in *Ixodes ricinus*. *Scientific Reports*, 15, 2869. DOI: 10.1038/s41598-025-87506-6.

Wykrywanie *B. burgdorferi* s. l.

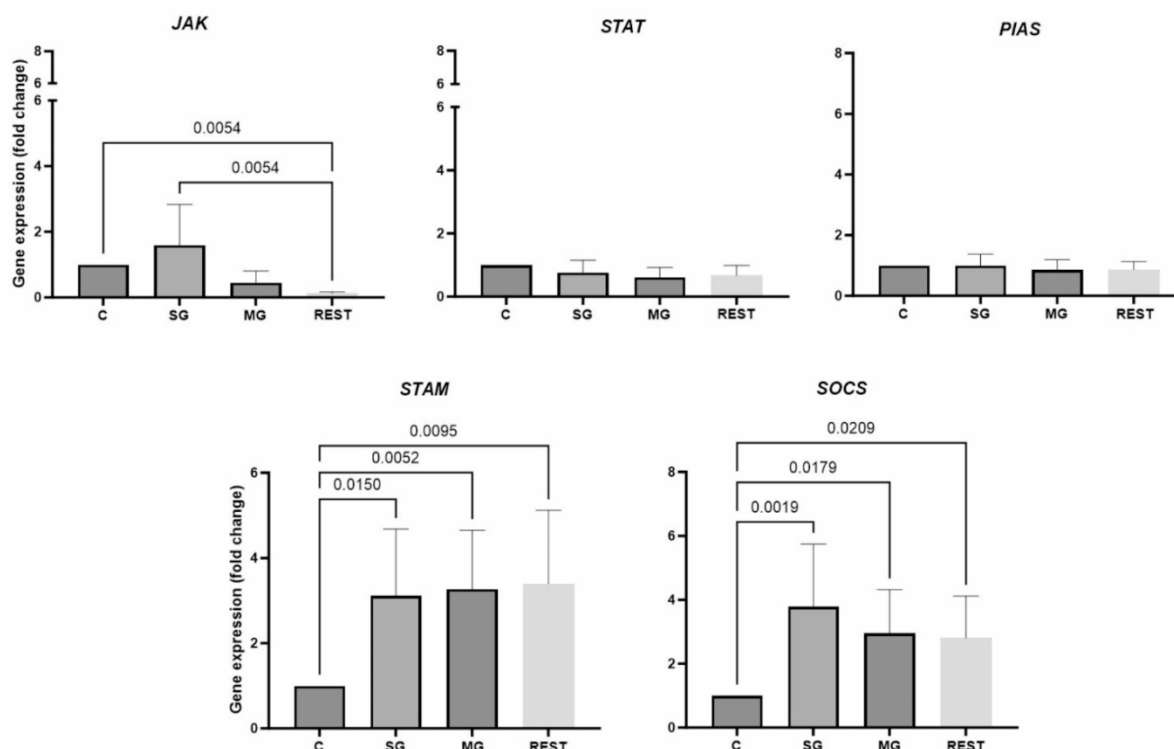
Całkowita częstość występowania krętków w materiale genetycznym kleszczy *I. ricinus* wyniosła 16%. Obecność *B. burgdorferi* s. l. potwierdzono u 8 z 50 przebadanych osobników. cDNA każdej wypreparowanej tkanki z kleszczy, w których materiale genetycznym potwierdzono obecność krętków (24 próby) poddano analizie ekspresji genów szlaku JAK/STAT oraz AMPs. Jako kontrolę wykorzystano materiał genetyczny tkanek wyizolowanych z ośmiu losowo wybranych osobników kleszczy w których nie potwierdzono

obecności *B. burgdorferi* s. l. (po 3 tkanki od 8 osobników). Ograniczeniem opisywanego zadania jest możliwy wpływ innych drobnoustrojów które mogły być obecne w materiale genetycznym kleszczy na ekspresję badanych genów. Wszystkie osobniki zostały zebrane w jednej lokalizacji i z tego samego mikrosiedliska, co pozwoliło ograniczyć wpływ czynników środowiskowych na ekspresję badanych genów.

Ekspresja genów szlaku JAK/STAT w obecności krętków B. burgdorferi s. l.

Udowodniono, że aktywacja szlaku sygnałowego JAK/STAT jest wyzwalana przez bakterie, wirusy lub pierwotniaki oraz że odgrywa rolę w zwalczaniu infekcji u kleszczy, zarówno korzystnych, jak i szkodliwych (Paulino i in., 2022). W niniejszym badaniu nie wykryto istotnych zmian ekspresji genów *STAT*, *PIAS*. Zaobserwowano je w przypadku ekspresji genów *JAK*, *STAM* i *SOCS* (Ryc. 13). Wzrost ekspresji był notowany w przypadku genów *STAM* i *SOCS*, obniżenie ekspresji zaobserwowano analizując gen *JAK*. W tej części badania nasza początkowa hipoteza o wzmożonej ekspresji genów szlaku w obecności krętków nie została potwierdzona. Z drugiej strony, we wszystkich badanych tkankach zakażonych pajęczaków, zaobserwowaliśmy wzrost ekspresji genów kodujących *STAM* i *SOCS* (Ryc. 13). Białko *STAM* jest cząsteczką adaptorową przekazującą sygnał, ulega fosforylacji w odpowiedzi na obecność cytokin (Takeshita i in., 1997). *STAM* odgrywa istotną rolę w regulacji sygnalizacji cytokinowej poprzez udział w kierowaniu receptorów cytokinowych do endosomów, co prowadzi do ich degradacji. Proces ten ogranicza sygnalizację zależną od cytokin, zapobiegając nadmiernej reakcji immunologicznej (Bache i in., 2003). Zaobserwowaliśmy nadmierną ekspresję genu *STAM* w gruczołach ślinowych, jelicie środkowym oraz innych tkankach *I. ricinus*. Sugerujemy, że może to być związane ze stopniowym wygaszaniem szlaku JAK/STAT w okresie życia kleszcza poza żywicielem, co przyczynia się do zachowaniu równowagi między jego układem odpornościowym a obecnością krętków. *SOCS* to grupa białek hamujących szlak sygnałowy JAK/STAT. Ich główną rolą jest negatywna regulacja tej ścieżki, zwiększona ekspresja *SOCS* prowadzi do zmniejszonej transkrypcji genów JAK/STAT. *SOCS* może wpływać na ciągłość przekazywania sygnału poprzez hamowanie aktywności katalitycznej *JAK*, która inicjuje sygnalizację wewnątrzkomórkową. Innym inhibitorem szlaku JAK/STAT jest *PIAS* kontroluje on czas trwania sygnalizacji JAK/STAT, powodując degradację aktywnego *STAT*. W naszym badaniu nie zaobserwowano żadnych istotnych zmian w ekspresji genu *PIAS*. Możliwe, że aktywacja szlaku sygnałowego JAK/STAT następuje podczas żywienia się krwią, tak jak u innych

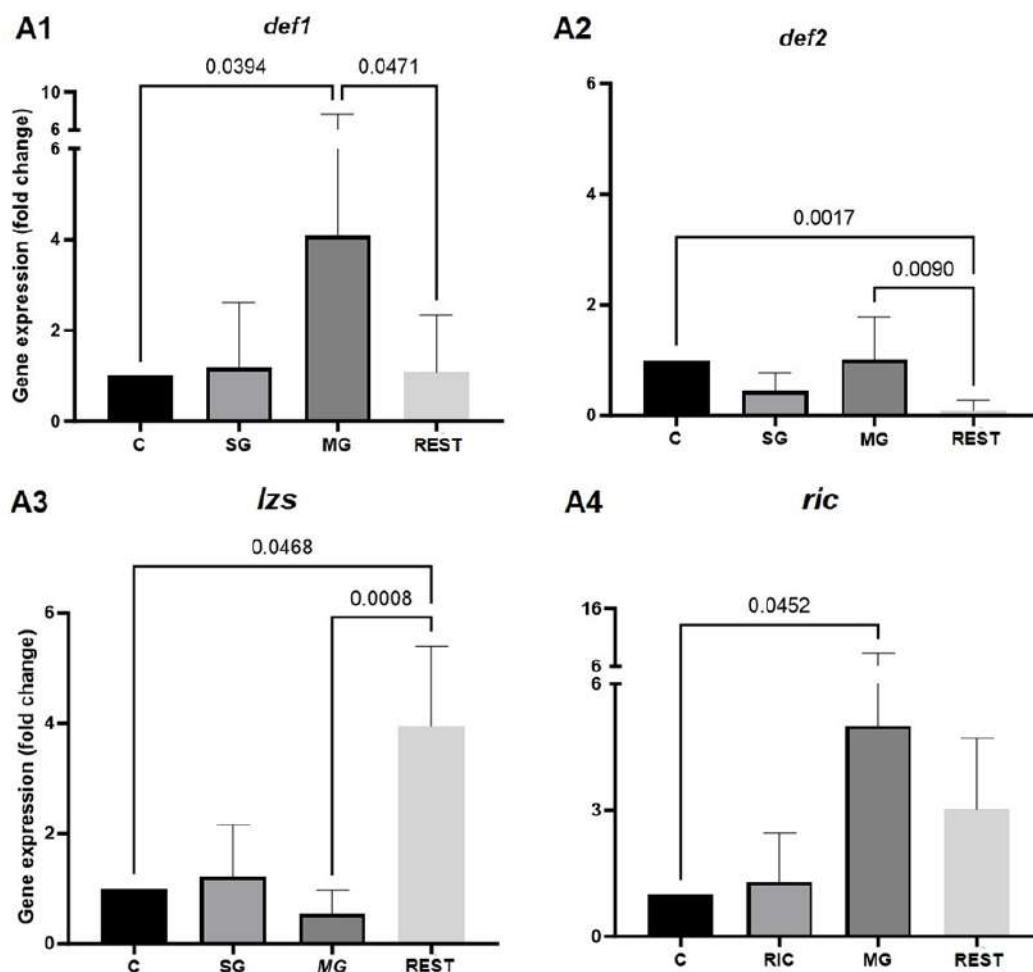
kleszczy (Rana i in., 2023). Wyniki sugerują, że w organizmie kleszczy następuje selektywna regulacja genów szlaku.



Rycina 13. Różnice w poziomach ekspresji genów *JAK*, *STAT*, *PIAS*, *STAM* i *SOCS* kleszczy *I. ricinus* z potwierdzoną obecnością *B. burgdorferi* s. l. C – kontrola (tkanki, w których nie potwierdzono obecności *B. burgdorferi* s. l.; dla ułatwienia odczytu wyniki zostały przedstawione zbiorczo w jednej kolumnie, jednak w analizach zastosowano oddzielną kontrolę odpowiednio dla każdej z tkanek), SG - gruczoły ślinowe, MG - jelito środkowe, REST - pozostałe tkanki.

Ekspresja genów AMPs w obecności krętków *B. burgdorferi* s. l. AMPs stanowią kluczowy element odporności wrodzonej przeciwko patogenom. Kleszcze z rodzaju *Ixodes* produkują wiele różnych AMPs, ulegających ekspresji w hemocytach, ciele tłuszczowym, jelicie, jajnikach i gruczołach ślinowych. Reagują zarówno na pobieranie krwi, jak i na bodźce mikrobiologiczne, a ich uwalnianie do hemolimfy jest kluczowe dla odpowiedzi immunologicznej organizmu (Aguilar-Díaz i in., 2021). Porównanie ekspresji genów AMPs wykazało istotne różnice we wszystkich testowanych tkankach. Zaobserwowaliśmy, że obecność krętków *B. burgdorferi* s. l. indukowała ekspresję genów *def1* i *ric* w jelicie środkowym samic *I. ricinus* (Ryc. 14). Badania wykazały spadek ekspresji genu *def2* w pozostałych tkankach, podczas gdy gen *lzs* ulegał wzmożonej ekspresji. Otrzymane wyniki potwierdzają, naszą hipotezę badawczą, że ekspresja genów AMPs różni się w tkankach kleszczy w obecności krętków wywołujących boreliozę. Prawdopodobne zwiększenie ekspresji

tych AMPs może przyczyniać się do tłumienia infekcji u kleszczy podczas etapu poszukiwania żywiciela. Podobne zjawisko nadekspresji genu defensyny w odpowiedzi na obecność patogenu *Theileria equi* w jelicie *R. microplus* zaobserwowali Paulino i in. (2022). Ricinusina należy do grupy defensyn (Silva i in., 2009; Tsuji i in., 2007). Wykazano, że ekspresja ricinusiny jest indukowana w odpowiedzi na infekcję *Babesia bigemina* w kleszczach *Rhipicephalus annulatus*. Chociaż u zakażonych kleszczy poziom mRNA ricinusiny był znacznie wyższy niż u osobników niezakażonych, nie zaobserwowano, aby wyciszenie tego genu wpływu na infekcję kleszcza patogenem. Sugeruje to, że ricinusina nie jest kluczowa dla kontroli zakażenia *B. bigemina* u kleszczy z rodzaju *Rhipicephalus* (Antunes i in., 2019). Inne badania wykazały, że defensyna kleszcza *D. variabilis* oraz lizozym kurzy, wykazywały działanie bakteriobójcze wobec krętków jedynie w połączeniu — stosowane oddzielnie nie wykazywały aktywności bójczej wobec tych bakterii (Johns, Ohnishi, i in., 2001; Johns, Sonenshine, i in., 2001). Zaobserwowano również nadekspresję genu *lzs* w pozostałych tkankach REST. Z kolei jego ekspresja w jelicie była istotnie niższa. Uzyskane wyniki są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, wskazującymi na aktywność lizozymu w jelicie kleszczy miękkich, przy braku takiej aktywności w jelicie kleszczy twardych. Odmienna sytuacja występuje natomiast w hemolimfie i hemocytach kleszczy twardych, gdzie wykazano podwyższoną ekspresję lizozymu (Taylor, 2006).



Rycina 14. Różnice w poziomach ekspresji genów AMPs: *def1* (A1), *def2* (A2), *lzs* (A3) i *ric* (A4) kleszczy *I. ricinus* z potwierdzoną obecnością *B. burgdorferi* s. l. C – kontrola (tkanki, w których nie potwierdzono obecności *B. burgdorferi* s. l.; dla ułatwienia odczytu wyniki zostały przedstawione zbiorczo w jednej kolumnie, jednak w analizach zastosowano oddzielną kontrolę odpowiednio dla każdej z tkanek), SG - gruczoły ślinowe, MG - jelito środkowe, REST - reszta tkanek osobnika.

5. Podsumowanie i wnioski

Wyniki uzyskane w wyniku przeprowadzonych badań w ramach niniejszej pracy dostarczyły dodatkowych informacji na temat wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w obecności różnych patogenów. Przeprowadzone badania miały na celu zweryfikowanie hipotez dotyczących ekspresji genów AMPs oraz szlaku JAK/STAT w odpowiedzi na obecność patogenów oraz ich zróżnicowanej aktywności w wybranych tkankach kleszczy.

Zadanie 1

Określenie poziomu ekspresji genów wybranych defensyn w kleszczach I. ricinus i D. reticulatus w obecności Borrelia spp., A. phagocytophilum, Babesia spp., Rickettsia spp. oraz N. mikurensins

Hipoteza 1: Poziom ekspresji genów defensyn wzrasta wraz z obecnością patogennych bakterii w ciele kleszczy.

Przeprowadzone badania potwierdziły hipotezę, że ekspresja genów defensyn kleszczy jest modulowana przez obecność różnych patogenów jak i etap żerowania kleszcza (kleszcze poszukujące żywiciela/osobniki napelnione krwią żywiciela). Uzyskane wyniki wspierają tezę o udziale defensyn w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej kleszczy, sugerując ich kluczową rolę w ograniczaniu rozwoju patogenów wewnątrz organizmu wektora. Szczególnie wysoki poziom ekspresji defensyn odnotowano u *D. reticulatus* zakażonych krętkami z rodzaju *Borrelia* spp. co może wskazywać na istotną rolę tych peptydów w ograniczaniu rozwoju patogenów już we wczesnych etapach infekcji.

Biorąc pod uwagę, że kleszcze produkują wiele różnych defensyn, z których każda może różnić się poziomem ekspresji, lokalizacją tkankową oraz skutecznością działania wobec poszczególnych patogenów, dalsze badania powinny objąć również inne klasy tych peptydów. Zbadanie potencjału AMPs w tym defensyn jako elementów regulujących interakcje kleszcz–patogen może przyczynić się do opracowania nowych strategii zwalczania chorób odkleszczowych i ograniczenia ich wpływu na zdrowie publiczne. Wyniki te stanowią podstawę do dalszych badań nad molekularnymi mechanizmami odporności kleszczy i potencjalnym wykorzystaniem defensyn w ograniczaniu transmisji patogenów.

Zadanie 2

Określenie poziomu ekspresji wybranych genów AMPs i genów szlaku JAK/STAT w tkankach kleszczy I. ricinus w obecności krętków B. burgorferi s. l.

Hipoteza: Poziom ekspresji genów AMPs i JAK/STAT wzrasta i różni się pomiędzy wybranymi tkankami kleszczy, w których wykryto obecność *B. burgdorferi* s. l. a tymi, w których ich nie stwierdzono.

Wyniki dotyczące ekspresji genów szlaku JAK/STAT – w szczególności *STAM* i *SOCS* – wskazują na prawdopodobny udział tego szlaku w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej, umożliwiającej kleszczom tolerowanie obecności krętków *B. burgdorferi* s. l. bez wywoływania silnej reakcji odpornościowej w organizmie. Może to stanowić jeden z mechanizmów warunkujących ich wysoką kompetencję wektorową.

Analiza ekspresji genów w wybranych tkankach *I. ricinus* wykazała istotne różnice w poziomie transkrypcji poszczególnych AMPs, przy czym największą nadekspresję genów *defl* i *ric* stwierdzono w jelicie środkowym, a genu *lzs* w pozostałych tkankach. Takie zróżnicowanie sugeruje, że aktywność AMPs jest zależna od lokalizacji i może brać udział w ograniczaniu infekcji w czasie, gdy kleszcz pozostaje poza organizmem żywiciela, przyczyniając się do utrzymania kontroli nad obecnymi patogenami.

Przeprowadzone badania pozwoliły na weryfikację założonych hipotez oraz na pogłębienie wiedzy o nieswoistej odporności kleszczy, ze szczególnym uwzględnieniem roli AMPs i mechanizmów regulacyjnych. Wyniki te wskazują, że defensyny i szlak JAK/STAT mogą stanowić istotne elementy regulujące interakcję kleszcz–patogen oraz potencjalne cele dla przyszłych strategii ograniczania transmisji chorób odkleszczowych. Zrozumienie funkcji i mechanizmów regulacyjnych szlaków odpornościowych u kleszczy, w tym JAK/STAT i AMPs, stanowi istotny element poznania ich zdolności do adaptacji oraz kompetencji jako wektorów patogenów.

6. Literatura

- Abbas, R. Z., Zaman, M. A., Colwell, D. D., Gilleard, J., & Iqbal, Z. (2014). Acaricide resistance in cattle ticks and approaches its management: The state of play. W *Veterinary Parasitology* (T. 203, Numery 1–2, s. 6–20). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>
- Aguilar-Díaz, H., Quiroz-Castañeda, R. E., Salazar-Morales, K., Cossío-Bayúgar, R., & Miranda-Miranda, E. (2021). Tick immunobiology and extracellular traps: An integrative vision to control vectors. *Pathogens*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/pathogens10111511>
- Anderson, J. F., & Magnarelli, L. A. (2008). Biology of Ticks. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(2), 195–215. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.006>
- Anguita, J., Ramamoorthi, N., Hovius, J. W. R., Das, S., Thomas, V., Persinski, R., Conze, D., Askenase, P. W., Rincón, M., Kantor, F. S., & Fikrig, E. (2002). Salp15, an *Ixodes scapularis* Salivary Protein, Inhibits CD4+ T Cell Activation. *Immunity*, 16(6), 849–859. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(02\)00325-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00325-4)
- Antunes, S., Couto, J., Ferrolho, J., Sanches, G. S., Charrez, J. O. M., De La Cruz Hernández, N., Mazuz, M., Villar, M., Shkap, V., De La Fuente, J., & Domingos, A. (2019). Transcriptome and Proteome Response of *Rhipicephalus annulatus* Tick Vector to *Babesia bigemina* Infection. *Frontiers in Physiology*, 10(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00318>
- Arz, C., Król, N., Imholt, C., Jeske, K., Rentería-Solís, Z., Ulrich, R. G., Jacob, J., Pfeffer, M., & Obiegala, A. (2023). Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks and Small Mammals from Grassland and Forest Habitats in Central Germany. *Pathogens*, 12(7), 1–18. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070933>
- Bache, K. G., Raiborg, C., Mehlum, A., & Stenmark, H. (2003). STAM and Hrs Are Subunits of a Multivalent Ubiquitin-binding Complex on Early Endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 278(14), 12513–12521. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210843200>
- Barbour, A. G., & Gupta, R. S. (2021). The Family Borreliaceae (Spirochaetales), a Diverse Group in Two Genera of Tick-Borne Spirochetes of Mammals, Birds, and Reptiles. *Journal of Medical Entomology*, 58(4), 1513–1524. <https://doi.org/10.1093/jme/tjab055>
- Barker, S. C., & Murrell, A. (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, 129(S1), S15–S36. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005207>

- Beerntsen, B. T., James, A. A., & Christensen, B. M. (2000). Genetics of Mosquito Vector Competence. W *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS* (T. 64, Numer 1). <http://www.chem.unep.ch/>
- Bernard, Q., Smith, A. A., Yang, X., Koci, J., Foor, S. D., Cramer, S. D., Zhuang, X., Dwyer, J. E., Lin, Y.-P., Mongodin, E. F., Marques, A., Leong, J. M., Anguita, J., & Pal, U. (2018). Plasticity in early immune evasion strategies of a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(16). <https://doi.org/10.1073/pnas.1718595115>
- Bilbija, B., Spitzweg, C., Papoušek, I., Fritz, U., Földvári, G., Mullett, M., Ihlow, F., Sprong, H., Cívánová Křížová, K., Anisimov, N., Belova, O. A., Bonnet, S. I., Bychkova, E., Czułowska, A., Duscher, G. G., Fonville, M., Kahl, O., Karbowiak, G., Kholodilov, I. S., Šíroký, P. (2023). *Dermacentor reticulatus* – a tick on its way from glacial refugia to a panmictic Eurasian population. *International Journal for Parasitology*, 53(2), 91–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2022.11.002>
- Black IV, W. C., & Moore, C. G. (1996). Population biology as a tool for studying vector-borne diseases. W B. J. Beaty & W. C. Marquardt (Red.), *The biology of disease vectors*. (s. 393–416). University Press of Colorado.
- Black, W. C., & Piesmant, J. (1994). Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. W *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* (T. 91).
- Bonnet, S. I., Nijhof, A. M., & de la Fuente, J. (2018). Editorial: Tick-host-pathogen interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(JUN), 1–3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00194>
- Boutros, M., Agaisse, H., & Perrimon, N. (2002). Sequential Activation of Signaling Pathways during Innate Immune Responses in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 3(5), 711–722. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00325-8](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00325-8)
- Buchon, N., Broderick, N. A., Poidevin, M., Pradervand, S., & Lemaitre, B. (2009). *Drosophila* Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell Host & Microbe*, 5(2), 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.003>
- Cabezas-Cruz, A., Tonk, M., Bleackley, M. R., Valdés, J. J., Barrero, R. A., Hernández-Jarguín, A., Moutailler, S., Vilcinskis, A., Richard-Forget, F., Anderson, M. A., & Rodriguez-Valle, M. (2019). Antibacterial and antifungal activity of defensins from the Australian paralysis tick, *Ixodes holocyclus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10(6), 101269. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101269>

- Cabezas-Cruz, A., Tonk, M., Bouchut, A., Pierrot, C., Pierce, R. J., Kotsyfakis, M., Rahnamaian, M., Vilcinskas, A., Khalife, J., & Valdés, J. J. (2016). Antiplasmodial activity is an ancient and conserved feature of tick defensins. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01682>
- Capelli-Peixoto, J., Carvalho, D. D., Johnson, W. C., Scoles, G. A., Fogaça, 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>
- Casati, S., Sager, H., Gern, L., & Piffaretti, J. (2006). Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 13(1), 65–70.
- Ceraul, S. M., Dreher-Lesnick, S. M., Mulenga, A., Rahman, M. S., & Azad, A. F. (2008). Functional Characterization and Novel Rickettsiostatic Effects of a Kunitz-Type Serine Protease Inhibitor from the Tick *Dermacentor variabilis*. *Infection and Immunity*, 76(11), 5429–5435. <https://doi.org/10.1128/IAI.00866-08>
- Chrudimská, T., Čěřovský, V., Slaninová, J., Rego, R. O. M., & Grubhoffer, L. (2014). Defensin from the ornate sheep tick *Dermacentor marginatus* and its effect on Lyme borreliosis spirochetes. *Developmental and Comparative Immunology*, 46(2), 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.04.005>
- Chrudimská, T., Chrudimský, T., Golovchenko, 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>
- Chrudimská, T., Slaninová, J., Rudenko, N., Růžek, D., & Grubhoffer, L. (2011). Functional characterization of two defensin isoforms of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasites and Vectors*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-63>
- Cicculli, V., Capai, L., Quilichini, Y., Masse, S., Fernández-Alvarez, A., Minodier, L., Bompard, P., Charrel, R., & Falchi, A. (2019). Molecular investigation of tick-borne pathogens in ixodid ticks infesting domestic animals (cattle and sheep) and small rodents (black rats) of Corsica, France. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10(3), 606–613. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.02.007>
- Coleman, J. L., Gebbia, J. A., Piesman, J., Degen, J. L., Bugge, T. H., & Benach, J. L. (1997). Plasminogen Is Required for Efficient Dissemination of *B. burgdorferi* in Ticks and for

- Enhancement of Spirochetemia in Mice. *Cell*, 89(7), 1111–1119.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80298-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80298-6)
- Das, S., Banerjee, G., DePonte, K., Marcantonio, N., Kantor, F. S., & Fikrig, E. (2001). Salp25D, an *Ixodes scapularis* Antioxidant, Is 1 of 14 Immunodominant Antigens in Engorged Tick Salivary Glands. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(8), 1056–1064.
<https://doi.org/10.1086/323351>
- de la Fuente, J., Antunes, S., Bonnet, S., Cabezas-Cruz, A., Domingos, A. G., Estrada-Peña, A., Johnson, N., Kocan, K. M., Mansfield, K. L., Nijhof, A. M., Papa, A., Rudenko, N., Villar, M., Alberdi, P., Torina, A., Ayllón, N., Vancova, M., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Rego, R. O. M. (2017). Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(APR), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00114>
- de la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Cabezas-Cruz, A., & Kocan, K. M. (2016). *Anaplasma phagocytophilum* Uses Common Strategies for Infection of Ticks and Vertebrate Hosts. *Trends in Microbiology*, 24(3), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.12.001>
- Demaerschack, I., Ben Messaoud, A., De Kesel, M., Hoyois, B., Lobet, Y., Hoet, P., Bigaignon, G., Bollen, A., & Godfroid, E. (1995). Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(3), 602–608. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.3.602-608.1995>
- 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>
- Eisen, L. (2020). Vector competence studies with hard ticks and *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes: A review. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 11(3), 101359.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101359>
- Espada, C., Cummins, H., Gonzales, J. A., Notto, L., & Gaff, H. D. (2021). A comparison of tick collection materials and methods in Southeastern virginia. *Journal of Medical Entomology*, 58(2), 692–698. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa207>
- Fogaça, A. C., Sousa, G., Pavanelo, D. B., Esteves, E., Martins, L. A., Urbanová, V., Kopáček, P., & Daffre, S. (2021). Tick Immune System: What Is Known, the Interconnections, the Gaps, and the Challenges. W *Frontiers in Immunology* (T. 12). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.628054>

- Földvári, G., Šíroký, P., Szekeres, S., Majoros, G., & Sprong, H. (2016). *Dermacentor reticulatus*: A vector on the rise. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–29. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1599-x>
- Francischetti, I. M. B. (2009). The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience, Volume* (14), 2051. <https://doi.org/10.2741/3363>
- Franta, Z., Frantová, H., Konvičková, J., Horn, M., Sojka, D., Mareš, M., & Kopáček, P. (2010). Dynamics of digestive proteolytic system during blood feeding of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasites & Vectors*, 3(1), 119. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-119>
- Galay, R. L., Maeda, H., Aung, K. M., Umemiya-Shirafuji, R., Xuan, X., Igarashi, I., Tsuji, N., Tanaka, T., & Fujisaki, K. (2012). Anti-babesial activity of a potent peptide fragment derived from longicin of *Haemaphysalis longicornis*. *Tropical Animal Health and Production*, 44(2), 343–348. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-0027-7>
- Gandy, S., Hansford, K., McGinley, L., Cull, B., Smith, R., Semper, A., Brooks, T., Fonville, M., Sprong, H., Phipps, P., Johnson, N., & Medlock, J. M. (2022). Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* nymphs across twenty recreational areas in England and Wales. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13(4), 101965. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101965>
- Gilmore, R. D., & Piesman, J. (2000). Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC-immunized mice. *Infection and Immunity*, 68(1), 411–414. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.1.411-414.2000>
- Grochowska, A., Pancewicz, S., Czupryna, P., Dunaj, J., Borawski, K., & Moniuszko-Malinowska, A. (2020). Pathogens carried by *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks including coinfections. *Przegląd epidemiologiczny*, 74(3), 466–474. <https://doi.org/10.32394/pe.74.40>
- Grubhoffer, L., Golovchenko, M., Vancová, M., Zacharovová-Slavíčková, K., Rudenko, N., & Oliver, J. H. (2005). *Lyme borreliosis: insights into tick-/ host-borrelia relations*. <https://doi.org/10.14411/fp.2005.039>
- 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., Megy, K., Thimmapuram, J., Miller, J. R., Walenz, B. P., Koren, S., Hostetler, J. B., Thiagarajan, M., Joardar, V. S., Hannick, L. I., Bidwell, S., Hill, C. A. (2016). Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nature Communications*, 7(1), 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>
- Guo, X., Booth, C. J., Paley, M. A., Wang, X., DePonte, K., Fikrig, E., Narasimhan, S., & Montgomery, R. R. (2009). Inhibition of Neutrophil Function by Two Tick Salivary Proteins. *Infection and Immunity*, 77(6), 2320–2329. <https://doi.org/10.1128/IAI.01507-08>
- Hajdušek, O., Šíma, R., Ayllón, N., Jalovecká, M., Perner, J., de la Fuente, J., & Kopáček, P. (2013). Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(JUL), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00026>
- Herrera, S. C., & Bach, E. A. (2019). JAK/STAT signaling in stem cells and regeneration: from *Drosophila* to vertebrates. *Development*, 146(2). <https://doi.org/10.1242/dev.167643>
- Hynes, W. L., Ceraul, S. M., Todd, S. M., Seguin, K. C., & Sonenshine, D. E. (2005). A defensin-like gene expressed in the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. *Medical and Veterinary Entomology*, 19(4), 339–344. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2005.00579.x>
- Isogai, E., Isogai, H., Okumura, K., Hori, H., Tsuruta, H., & Kurebayashi, Y. (2011). Tertiary structure-related activity of tick defensin (persulcatusin) in the taiga tick, *Ixodes persulcatus*. *Experimental and Applied Acarology*, 53(1), 71–77. <https://doi.org/10.1007/s10493-010-9379-3>
- Jalovecka, M., Malandrin, L., Urbanova, V., Mahmood, S., Snebergerova, P., Peklanska, M., Pavlasova, V., Sima, R., Kopacek, P., Perner, J., & Hajdusek, O. (2024). Activation of the tick Toll pathway to control infection of *Ixodes ricinus* by the apicomplexan parasite *Babesia microti*. *PLOS Pathogens*, 20(12), e1012743. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012743>
- Johns, R., Ohnishi, J., Broadwater, A., Sonenshine, D. E., De Silva, A. M., & Hynes, W. L. (2001). Contrasts in tick innate immune responses to *Borrelia burgdorferi* challenge: Immunotolerance in *Ixodes scapularis* versus immunocompetence in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 38(1), 99–107. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.1.99>

- 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)
- Karbowiak, G. (2021). Changes in the occurrence range of hosts cause the expansion of the ornate dog tick *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) in Poland. *Biologia*, 77(6), 1513–1522. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00945-0>
- Khogali, R., Bastos, A., Bargul, J. L., Getange, D., Kabii, J., Masiga, D., & Villinger, J. (2024). Tissue-specific localization of tick-borne pathogens in ticks collected from camels in Kenya: insights into vector competence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1382228>
- Kmieciak, W., Ciszewski, M., & Szewczyk, E. M. (2016). Choroby odkleszczowe w Polsce-występowanie i trudności diagnostyczne. W *Medycyna Pracy* (T. 67, Numer 1, s. 73–87). Nofer Institute of Occupational Medicine. <https://doi.org/10.13075/mp.5893.00264>
- Kopáček, P., Hajdušek, O., & Buresova, V. (2012). Tick as a model for the study of a primitive complement system. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 710, 83–93.
- Kubiak, K., Sielawa, H., Dziekońska-Rynko, J., Kubiak, D., Rydzewska, M., & Dzika, E. (2018). *Dermacentor reticulatus* ticks (Acari: Ixodidae) distribution in north-eastern Poland: an endemic area of tick-borne diseases. *Experimental and Applied Acarology*, 75(3), 289–298. <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0274-7>
- Kubiak, K., Szczotko, M., & Dmitryjuk, M. (2021). *Borrelia miyamotoi*—an emerging human tick-borne pathogen in europe. *Microorganisms*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010154>
- Kubiak, K., Szymańska, H., Dmitryjuk, M., & Dzika, E. (2022). Abundance of *Ixodes ricinus* Ticks (Acari: Ixodidae) and the Diversity of *Borrelia* Species in Northeastern Poland. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(12). <https://doi.org/10.3390/ijerph19127378>
- Kubiak, K., Szymańska, H., Dziekońska-Rynko, J., Tylkowska, A., Dmitryjuk, M., & Dzika, E. (2024). Tick-borne pathogens in questing adults *Dermacentor reticulatus* from the Eastern European population (north-eastern Poland). *Scientific Reports*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51299-x>
- Kumar, S., Molina-Cruz, A., Gupta, L., Rodrigues, J., & Barillas-Mury, C. (2010). A Peroxidase/Dual Oxidase System Modulates Midgut Epithelial Immunity in *Anopheles gambiae*. *Science*, 327(5973), 1644–1648. <https://doi.org/10.1126/science.1184008>

- Kurokawa, C., Lynn, G. E., Pedra, J. H. F., Pal, U., Narasimhan, S., & Fikrig, E. (2020). Interactions between *Borrelia burgdorferi* and ticks. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 587–600. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0400-5>
- Larsson, C., Hvidsten, D., Stuen, S., Henningsson, A. J., & Wilhelmsson, P. (2018). „Candidatus *Neoehrlichia mikurensis*” in *Ixodes ricinus* ticks collected near the Arctic Circle in Norway. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3168-y>
- Li, F., Gao, Z., Wang, K., Zhao, Y., Wang, H., Zhao, M., Zhao, Y., Bai, L., Yu, Z., & Yang, X. (2021). A novel defensin-like peptide contributing to antimicrobial and antioxidant capacity of the tick *Dermacentor silvarum* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, 83(2), 271–283. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00584-1>
- Liu, L., Dai, J., Zhao, Y. O., Narasimhan, S., Yang, Y., Zhang, L., & Fikrig, E. (2012). *Ixodes scapularis* JAK-STAT pathway regulates tick antimicrobial peptides, thereby controlling the agent of human granulocytic anaplasmosis. *Journal of Infectious Diseases*, 206(8), 1233–1241. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis484>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Massung, R. F., Slater, K., Owens, J. H., Nicholson, W. L., Mather, T. N., Solberg, V. B., & Olson, J. G. (1998). Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4), 1090–1095. <https://doi.org/10.1128/jcm.36.4.1090-1095.1998>
- McClure Carroll, E. E., Wang, X., Shaw, D. K., O’Neal, A. J., Oliva Chávez, 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*, 116(1), 205–210. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808905116>
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Peña, A., George, J. C., Golovljova, I., Jaenson, T. G. T., Jensen, J. K., Jensen, P. M., Kazimirova, M., Oteo, J. A., Papa, A., Pfister, K., Plantard, O., Randolph, S. E., Rizzoli, A., Santos-Silva, M. M., Sprong, H., Van Bortel, W. (2013). Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites and Vectors*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-1>

- Mierzejewska, E. J., Pawełczyk, A., Radkowski, M., Welc-Falęciak, R., & Bajer, A. (2015). Pathogens vectored by the tick, *Dermacentor reticulatus*, in endemic regions and zones of expansion in Poland. *Parasites and Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1099-4>
- Miller, J. R., Koren, S., Dilley, K. A., Harkins, D. M., Stockwell, T. B., Shabman, R. S., & Sutton, G. G. (2018). A draft genome sequence for the *Ixodes scapularis* cell line, ISE6. *F1000Research*, 7, 297. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13635.1>
- Mookherjee, N., & Hancock, R. E. W. (2007). Cationic host defence peptides: Innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(7–8), 922–933. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6475-6>
- Murfin, K. E., Kleinbard, R., Aydin, M., Salazar, S. A., & Fikrig, E. (2019). *Borrelia burgdorferi* chemotaxis toward tick protein Salp12 contributes to acquisition. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10(5), 1124–1134. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.002>
- Nakajima, Y., Ishibashi, J., Yukuhiro, F., Asaoka, A., Taylor, D. M., & Yamakawa, M. (2003). Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1624(1–3), 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2003.10.004>
- 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 and Microbe*, 15(1), 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.12.001>
- Narasimhan, S., Sukumaran, B., Bozdogan, U., Thomas, V., Liang, X., DePonte, K., Marcantonio, N., Koski, R. A., Anderson, J. F., Kantor, F., & Fikrig, E. (2007). A Tick Antioxidant Facilitates the Lyme Disease Agent's Successful Migration from the Mammalian Host to the Arthropod Vector. *Cell Host & Microbe*, 2(1), 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.001>
- Nowak-Chmura, M. (2013). *Fauna kleszczy (Ixodida) Europy Środkowej*. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Pedagogicznego.
- Nowak-Chmura, M., & Siuda, K. (2012). Ticks of Poland. Review of contemporary issues and latest research. *Annals of parasitology*, 58(3), 125–155.
- Nuttall, P. A. (2019). Tick saliva and its role in pathogen transmission. *Wiener Klinische Wochenschrift*. <https://doi.org/10.1007/s00508-019-1500-y>

- Palmer, W. J., & Jiggins, F. M. (2015). Comparative Genomics Reveals the Origins and Diversity of Arthropod Immune Systems. *Molecular Biology and Evolution*, 32(8), 2111–2129. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv093>
- Paulino, P. G., Peckle, M., Mendonça, L. P., Massard, C. L., Antunes, S., Couto, J., Domingos, A., Guedes Junior, D. da S., Cabezas-Cruz, A., & Santos, H. A. (2022). Differential Expression of Immune Genes in the *Rhipicephalus microplus* Gut in Response to *Theileria equi* Infection. *Pathogens*, 11(12), 1–13. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121478>
- Pelc, R. S., McClure, J. C., Sears, K. T., Chung, A., Rahman, M. S., & Ceraul, S. M. (2014). Defending the fort: A role for defensin-2 in limiting *Rickettsia montanensis* infection of *Dermacentor variabilis*. *Insect Molecular Biology*, 23(4), 457–465. <https://doi.org/10.1111/imb.12094>
- Quarsten, H., Henningsson, A., Krogfelt, K., Strube, C., Wennerås, C., & Mavin, S. (2023). Tick-borne diseases under the radar in the North Sea Region. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 14(4), 102185. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102185>
- Rana, V. S., Kitsou, C., Dutta, S., Ronzetti, M. H., Zhang, M., Bernard, Q., Smith, A. A., Tomás-Cortázar, J., Yang, X., Wu, M. J., Kepple, O., Li, W., Dwyer, J. E., Matias, J., Baljinnyam, B., Oliver, J. D., Rajeevan, N., Pedra, J. H. F., Narasimhan, S., Pal, U. (2023). Dome1-JAK-STAT signaling between parasite and host integrates vector immunity and development. *Science*, 379(6628). <https://doi.org/10.1126/science.abl3837>
- Ravindran, R., Hembram, P. K., Kumar, G. S., Kumar, K. G. A., Deepa, C. K., & Varghese, A. (2023). Transovarial transmission of pathogenic protozoa and rickettsial organisms in ticks. *Parasitology Research*, 122(3), 691–704. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07792-9>
- Ribeiro, J. M. C., Alarcon-Chaidez, F., B. Francischetti, I. M., Mans, B. J., Mather, T. N., Valenzuela, J. G., & Wikel, S. K. (2006). An annotated catalog of salivary gland transcripts from *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 36(2), 111–129. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.11.005>
- Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubálek, Z., Földvári, G., Plantard, O., Vayssier-Taussat, M., Bonnet, S., Špitalská, E., & Kazimírová, M. (2014). *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: New hazards and relevance for public health. *Frontiers in Public Health*, 2(DEC), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00251>

- Rosa, R. D., Capelli-Peixoto, J., Mesquita, R. D., Kalil, S. P., Pohl, P. C., Braz, G. R., Fogaça, 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>
- Roux, V., Rydkina, E., Ereemeeva, M., & Raoult, D. (1997). Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(2), 252–261. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-252>
- Rubel, F., Brugger, K., Belova, O. A., Kholodilov, I. S., Didyk, Y. M., Kurzrock, L., García-Pérez, A. L., & Kahl, O. (2020). Vectors of disease at the northern distribution limit of the genus *Dermacentor* in Eurasia: *D. reticulatus* and *D. silvarum*. *Experimental and Applied Acarology*, 82(1), 95–123. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00533-y>
- Rudolf, I., & Hubálek, Z. (2003). Effect of the salivary gland and midgut extracts from *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) on the growth of *Borrelia garinii* in vitro. *Folia Parasitologica*, 50(2), 159–160. <https://doi.org/10.14411/fp.2003.029>
- Sandelin, L. L., Tolf, C., Larsson, S., Wilhelmsson, P., Salaneck, E., Jaenson, T. G. T., Lindgren, P. E., Olsen, B., & Waldenström, J. (2015). Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* in ticks from migrating birds in Sweden. *PLoS ONE*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133250>
- Sands, B., Lihou, K., Lait, P., & Wall, R. (2022). Prevalence of Babesia spp. pathogens in the ticks *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* in the UK. *Acta Tropica*, 236(June), 106692. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106692>
- Shafee, T. M. A., 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*, 74(4), 663–682. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2344-5>
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3–4), 591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>
- Shaw, D. K., Wang, X., Brown, L. J., Chávez, A. S. O., Reif, K. E., Smith, A. A., Scott, A. J., McClure, E. E., Boradia, V. M., Hammond, H. L., Sundberg, E. J., Snyder, G. A., Liu, L., DePonte, K., Villar, M., Ueti, M. W., de la Fuente, J., Ernst, R. K., Pal, U., Pedra, J. H. F. (2017). Infection-derived lipids elicit an immune deficiency circuit in arthropods. *Nature Communications*, 8(1), 14401. <https://doi.org/10.1038/ncomms14401>

- Silva, F. D., Rezende, C. A., Rossi, D. C. P., 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*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(50), 34735–34746. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016410>
- Silverman, N., Zhou, R., Erlich, R. L., Hunter, M., Bernstein, E., Schneider, D., & Maniatis, T. (2003). Immune Activation of NF- κ B and JNK Requires *Drosophila* TAK1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 48928–48934. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304802200>
- Šimo, L., Kazimirova, M., Richardson, J., & Bonnet, S. I. (2017). The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission. W *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (T. 7, Numer JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00281>
- Skotarczak, B. (2015). Why is There Still no Human Vaccine Against Lyme Borreliosis? *Folia biologica*, 63(3), 159–165. <https://doi.org/10.3409/fb63>
- Smith, A. A., Navasa, N., Yang, X., Wilder, C. N., Buyuktanir, O., Marques, A., Anguita, J., & Pal, U. (2016). Cross-Species Interferon Signaling Boosts Microbicidal Activity within the Tick Vector. *Cell Host and Microbe*, 20(1), 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.06.001>
- Smith, A. A., & Pal, U. (2014). Immunity-related genes in *Ixodes scapularis* perspectives from genome information. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00116>
- Sonenshine, D. E. (2008). Molecular characterization and related aspects of the innate immune response in ticks. *Frontiers in Bioscience, Volume* (13), 7046. <https://doi.org/10.2741/3209>
- Sonenshine, D. E., & Macaluso, K. R. (2017). Microbial invasion vs. tick immune regulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7(SEP). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00390>
- Souza-Neto, J. A., Sim, S., & Dimopoulos, G. (2009). An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(42), 17841–17846. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905006106>
- Sprong, H., Azagi, T., Hoornstra, D., Nijhof, A. M., Knorr, S., Baarsma, M. E., & Hovius, J. W. (2018). Control of Lyme borreliosis and other *Ixodes ricinus*-borne diseases. W

- Parasites and Vectors* (T. 11, Numer 1). BioMed Central Ltd.
<https://doi.org/10.1186/s13071-018-2744-5>
- Stanek, G., & Reiter, M. (2011). The expanding Lyme *Borrelia* complex-clinical significance of genomic species? *Clinical Microbiology and Infection*, 17(4), 487–493.
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03492.x>
- Strnad, M., Hönig, V., Ružek, D., Grubhoffer, L., & Ryan, O. M. R. (2017). Europe-Wide Meta-Analysis of *Borrelia burgdorferi* Senu Lato Prevalence in Questing *Ixodes ricinus* Ticks. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(15), 1–16.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00609-17>
- Szczotko, M., Antunes, S., Domingos, A., & Dmitryjuk, M. (2025). Investigation of genes expression of the JAK/STAT signalling pathway and AMPs in the presence of *Borrelia* spirochetes in *Ixodes ricinus*. *Scientific Reports*, 15(1), 2869.
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-87506-6>
- Szczotko, M., Antunes, S., Domingos, A., Kubiak, K., & Dmitryjuk, M. (2024). Tick-borne pathogens and defensin genes expression: A closer look at *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 160, 105231. DOI: 10.1016/j.dci.2024.105231
- Szczotko, M., Kubiak, K., Michalski, M. M., Moerbeck, L., Antunes, S., Domingos, A., & Dmitryjuk, M. (2023). *Neoehrlichia mikurensis*—A New Emerging Tick-Borne Pathogen in North-Eastern Poland? *Pathogens*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens12020307>
- Takeshita, T., Arita, T., Higuchi, M., Asao, H., Endo, K., Kuroda, H., Tanaka, N., Murata, K., Ishii, N., & Sugamura, K. (1997). STAM, signal transducing adaptor molecules, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction. *Immunity*, 6(4), 449–457. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80288-5](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80288-5)
- Taylor, D. (2006). Innate Immunity in Ticks: A review. *Journal of the Acarological Society of Japan*, 15(2), 109–127. <https://doi.org/10.2300/acari.15.109>
- Tonk, M. (2014). Characterisation and functional analysis of defensins from the ticks *Ixodes ricinus* and *Ixodes scapularis*. *Ph.d. thesis*, 149.
- Tonk, M., Cabezas-Cruz, A., Valdés, J. J., Rego, R. O. M., Chrudimská, T., Strnad, M., Radek, Š., Bell-sakyi, L., Vilcinskas, A., & Grubhoffer, L. (2014). Defensins from the tick *Ixodes scapularis* are effective against phytopathogenic fungi and the human bacterial pathogen *Listeria grayi*. *Parasites & Vectors*, 7(554), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0554-y>

- Tonk, M., Cabezas-Cruz, A., Valdés, J. J., Rego, R. O. M., Rudenko, N., Golovchenko, M., Bell-Sakyi, L., De la Fuente, J., & Grubhoffer, L. (2014). Identification and partial characterisation of new members of the *Ixodes ricinus* defensin family. *Gene*, 540(2), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.03.002>
- Tsuji, N., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Miyoshi, T., Xuan, X., Oliver, J. H., & Fujisaki, K. (2007). Babesial vector tick defensin against *Babesia* sp. parasites. *Infection and Immunity*, 75(7), 3633–3640. <https://doi.org/10.1128/IAI.00256-07>
- Valenzuela, J. G., Francischetti, I. M. B., Pham, V. M., Garfield, M. K., Mather, T. N., & Ribeiro, J. M. C. (2002). Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *Journal of Experimental Biology*, 205(18), 2843–2864. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.18.2843>
- van der Goes van Naters-Yasui, A. D., Taylor, D., Shono, T., & Yamakawa, M. (2000). Purification and partial amino acid sequence of antibacterial peptides from the hemolymph of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). W M. Kazimirova, M. Labuda, & P. Nuttall (Red.), *Proceedings of the 3rd International Conference on Ticks and Tick-borne Pathogens: Into the 21st Century* (s. 189–194). Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences.
- Verhulst, N. O., Boulanger, N., & Spitzen, J. (2018). Impact of Skin Microbiome on Attractiveness to Arthropod Vectors and Pathogen Transmission. W *Skin and Arthropod Vectors* (s. 55–81). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811436-0.00003-4>
- Wang, Y., & Zhu, S. (2011). The defensin gene family expansion in the tick *Ixodes scapularis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 35(11), 1128–1134. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.030>
- 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. W *Infectious Diseases of Poverty* (T. 11, Numer 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40249-022-00996-8>
- Yang, X., Smith, A. A., Williams, M. S., & Pal, U. (2014). A Dityrosine Network Mediated by Dual Oxidase and Peroxidase Influences the Persistence of Lyme Disease Pathogens within the Vector. *Journal of Biological Chemistry*, 289(18), 12813–12822. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.538272>
- Zajac, Z., Obregon, D., Foucault-Simonin, A., Wu-Chuang, A., Moutailler, S., Galon, C., Kulisz, J., Woźniak, A., Bartosik, K., & Cabezas-Cruz, A. (2023). Disparate dynamics of pathogen prevalence in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks occurring

- sympatrically in diverse habitats. *Scientific Reports*, 13(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-37748-z>
- Zajac, Z., Woźniak, A., & Kulisz, J. (2020). Infestation of dairy cows by ticks *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) and *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) in eastern Poland. *Annals of parasitology*, 66(1), 87–96. <https://doi.org/10.17420/ap6601.241>
- Zdzisław Gliński, Krzysztof Buczek, & Mateusz Marć. (2011). Zjawiska i mechanizmy odporności przeciwzakaźnej pszczoły miodnej – nowe osiągnięcia. *Życie Weterynaryjne*, 86(9), 687–693.
- Zhou, J., Liao, M., Ueda, M., Gong, H., Xuan, X., & Fujisaki, K. (2007). Sequence characterization and expression patterns of two defensin-like antimicrobial peptides from the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Peptides*, 28(6), 1304–1310.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.04.019>

Spis Rycin

Rycina 1. Schemat trzech z czterech głównych szlaków sygnałowych regulujących odpowiedź immunologiczną kleszczy **A** - szlak NF- κ B/Toll, **B** - szlak IMD (brakujące składniki tego szlaku w kleszczach są zaznaczone kolorem żółtym), **C** - szlak JNK. Składniki w kolorze czerwonym to inhibitory szlaków sygnałowych. Rysunek został stworzony za pomocą programu BioRender (<https://app.biorender.com/>). Źródło: Fogaça i in. (2021), Paulino i in. (2022).

Rycina 2. Schemat szlaku sygnałowego JAK/STAT regulującego odpowiedź humoralną kleszczy. Składniki oznaczone na czerwono to inhibitory szlaków sygnałowych. Rysunek został stworzony za pomocą programu BioRender (<https://app.biorender.com/>). Źródło: Fogaça i in. (2021), Paulino i in. (2022).

Rycina 3. Aktywacja szlaku JAK/STAT przez IFN- γ . Grafika została wykonana w programie BioRender (<https://app.biorender.com/>).

Rycina 4. Struktury trzeciorzędowe defensyn: A – defensyna 1 *I. ricinus* (Q7YXK5), B – defensyna 2 *I. ricinus* (Q2HYY9) i C – defensyna *D. reticulatus* (ACJ04434). Modele wygenerowano przy użyciu Swiss-Model Protein Modeling Server (<http://swiss-model.expasy.org>). Charakterystyczne α -helisy i β -harmonijki stabilizowane mostkami disiarczkowymi pomiędzy konserwatywnymi resztami cysteiny (motywy CS $\alpha\beta$), które są kluczowe dla ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych zaznaczone są odpowiednio kolorem fioletowym i zielonym.

Rycina 5. Schemat badawczy *Zadania 1*. Grafika została opracowana w programie BioRender (<https://app.biorender.com/>).

Rycina 6. *Zadanie 2* – Przygotowanie materiału badawczego. Rycina wykonana w SciPainter (<http://www.scipainter.com/>).

Rycina 7. Pozytywny wynik reakcji qPCR wykrywającej krętki *B. burgdorferi* s. l. w próbie numer 8 (cDNA jelita kleszczy *I. ricinus*). Obraz przedstawia sygnał wskazujący na obecność materiału genetycznego krętków.

Rycina 8. Graficzne przedstawienie etapów analiz przeprowadzonych w celu realizacji *Zadania 2*. Rycina wykonana w SciPainter (<http://www.scipainter.com/>).

Rycina 9. Zmiany ekspresji genów *def1*, *def2* i *defDr* w obecności patogenów w kleszczach napitych krwią i szukających żywiciela: *Borrelia* spp. (A), *Rickettsia* spp. (B), *A. phagocytophilum* (C), *N. mikurensis* (D). Q – kleszcze szukające żywiciela (*ang.* questing),

E – kleszcze napite krwią (*ang.* engorged) QI-C – kontrola dla kleszczy *I. ricinus* szukających żywiciela, EI-C – kontrola dla kleszczy *I. ricinus* napitych krwią, QD-C – kontrola dla kleszczy *D. reticulatus* szukających żywiciela, ED-C – kontrola dla kleszczy *D. reticulatus* napitych krwią.

Rycina 10. A. Zmiana ekspresji genów *def1* i *def2* w *I. ricinus* poszukujących żywiciela (Q-*def1*, Q-*def2*) i kleszczy napitych krwią psów (E-*def1*, E-*def2*) przy potwierdzonej obecności *Borrelia* spp. (A1), *Rickettsia* spp. (A2), *A. phagocytophilum* (A3) i *N. mikurensis* (A4). **B.** Zmiana ekspresji genu defensyny *D. reticulatus* (*defDr*) w odpowiedzi na obecność *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* i *N. mikurensis*; Q-C – kontrola dla kleszczy szukających żywiciela, E-C – kontrola dla kleszczy napitych krwią.

Rycina 11. Różnice ekspresji genów *def1*, *def2* pomiędzy stadiami rozwojowymi *I. ricinus*.

Rycina 12. Różnice ekspresji genów *def1*, *def2* i *defDr* pomiędzy osobnikami ze stwierdzoną obecnością jednego patogenu (A1, A2, A3) i w obecności dwóch lub więcej patogenów (B2a, B2b, B2c).

Rycina 13. Różnice w poziomach ekspresji genów *JAK*, *STAT*, *PIAS*, *STAM* i *SOCS* kleszczy *I. ricinus* z potwierdzoną obecnością *B. burgdorferi* s. l. C – kontrola (tkanki, w których nie potwierdzono obecności *B. burgdorferi* s. l.; dla ułatwienia odczytu wyniki zostały przedstawione zbiorczo w jednej kolumnie, jednak w analizach zastosowano oddzielną kontrolę odpowiednio dla każdej z tkanek), SG - gruczoły ślinowe, MG - jelito środkowe, REST - pozostałe tkanki.

Rycina 14. Różnice w poziomach ekspresji genów AMPs: *def1* (A1), *def2* (A2), *lzs* (A3) i *ric* (A4) kleszczy *I. ricinus* z potwierdzoną obecnością *B. burgdorferi* s. l. C – kontrola (tkanki, w których nie potwierdzono obecności *B. burgdorferi* s. l.; dla ułatwienia odczytu wyniki zostały przedstawione zbiorczo w jednej kolumnie, jednak w analizach zastosowano oddzielną kontrolę odpowiednio dla każdej z tkanek), SG - gruczoły ślinowe, MG - jelito środkowe, REST - reszta tkanek osobnika.

Spis Tabel

Tabela 1. Ilość osobników poddanych analizie w *Zadaniu 1*.

Finansowanie

Badania nie otrzymały finansowania ze źródeł zewnętrznych. Finansowane były ze środków Funduszu Rozwoju Nauki Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie [nr 12.610.012-110] oraz częściowo przez środki Fundação para a Ciência e a Tecnologia dla GHTM - UID/04413/2020 and LA-REAL – LA/P/0117/2020.

Współpraca

Badania powstały we współpracy z Instytutem Higieny i Medycyny Tropikalnej, Uniwersytetu Nova w Lizbonie, Portugalia (Instituto de Higiene e Medicina Tropical – IHMT, Universidade Nova de Lisboa). Współpraca była istotna dla realizacji badań. Część analiz, których wyniki omówiono w rozprawie doktorskiej została wykonana w Instytucie w Lizbonie w trakcie odbytych staży w ramach programu Erasmus+ oraz PROM.

Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej



Contents lists available at ScienceDirect

Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/devcompimm



Tick-Borne pathogens and defensin genes expression: A closer look at *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*

Magdalena Szczotko^{a,*}, Sandra Antunes^b, Ana Domingos^b, Katarzyna Kubiak^c,
Małgorzata Dmitryjuk^a

^a Department of Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 1A, 10-719, Olsztyn, Poland

^b Global Health and Tropical Medicine, GHM, Associate Laboratory in Translation and Innovation Towards Global Health, LA-REAL, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, IHMT, Universidade NOVA de Lisboa, UNL, Rua da Junqueira 100, 1349-008, Lisboa, Portugal

^c Department of Medical Biology, School of Public Health, Collegium Medicum, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Żołnierska 14c, 10-561, Olsztyn, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:
Defensins
Innate immune system
Tick-borne pathogens
Ticks

ABSTRACT

The immune system of ticks, along with that of other invertebrates, is comparatively simpler than that of vertebrates, relying solely on innate immune responses. Direct antimicrobial defence is provided by the synthesis of antimicrobial peptides (AMPs), including defensins. The aim of this study was to investigate the differences in defensin genes expression between questing and engorged *Ixodes ricinus* (*def1* and *def2*) and *Dermacentor reticulatus* (*defDr*) ticks, in the presence of selected pathogens: *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Neorickettsia mikurensis* in the natural environment. After pathogen screening by PCR/qPCR, the expression of defensin genes in pathogen positive ticks and ticks without any of the tested pathogens, was analysed by reverse transcription qPCR. The results showed an increased expression of defensin genes in *I. ricinus* ticks after blood feeding and *I. ricinus* and *D. reticulatus* ticks during in cases of co-infection. In particular, the expression of defensins genes was higher in questing *D. reticulatus* than in questing and engorged *I. ricinus* ticks, when borreliae were detected. This study contributes to uncovering the expression patterns of defensin genes in the presence of several known tick pathogens, the occurrence of these pathogens and possible regulatory mechanisms of defensins in tick vector competence.

1. Introduction

Ticks (Acari: Ixodida) are ectoparasitic arthropods that inevitably suck blood from various vertebrates. After mosquitoes, ticks are the second most important vectors of pathogens to humans. They can transmit a variety of pathogens, including bacteria, fungi, viruses, protozoa, and nematodes. Tick-borne diseases (TBD) are a very complex network of interactions based on interactions between the tick, the pathogen, the vertebrate host and the microbiome. For the tick to act as a competent vector, it must control the pathogen population through its innate immunity and microbiome interactions. The pathogens are ingested with the blood meal of infected hosts and must evade the tick's immune responses on their way through the tick's body. Ticks have an impressive range of humoral and cellular responses to microbial challenges. Nevertheless, many tick-borne pathogens evade the tick's innate immune system and survive in its body. The immune system of ticks and other invertebrates is comparatively simpler than that of vertebrates, as

it relies exclusively on innate immune responses (Boulanger and Wikell, 2021; Fogaça et al., 2021; Sonenshine and Macaluso, 2017; Wu et al., 2022). Tick innate immunity defence includes both humoral and cellular mechanisms. An important aspect of the innate immunity of ticks is the rapid and transient production of antimicrobial peptides (AMPs). Direct antimicrobial defence is achieved by the synthesis of AMPs, small molecules such as lysozymes and defensins, tick-specific antimicrobial compounds such as 5.3 kDa family proteins and microplusin/hebraein (Hajdušek et al., 2013; Tonk et al., 2014). Given the broad spectrum of antimicrobial activities of tick defensins, these peptides have the potential to be innovative candidates or targets for combating infectious diseases (Wu et al., 2022). Briefly, tick defensins fall under the category of invertebrate-type antibacterial antigenic defensins (ATTDs) within the *cis*-defensin superfamily, which are characterised by their cysteine-stabilised α -helix and β -sheet (CS $\alpha\beta$ -type) structures (Wang and Zhu, 2011). The generally small (less than 10 kDa), cationic and amphipathic tick defensins have six cysteine residues that form three

* Corresponding author.

E-mail address: magdalena.szczotko@uwm.edu.pl (M. Szczotko).

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2024.105231>

Received 4 April 2024; Received in revised form 8 July 2024; Accepted 16 July 2024

Available online 21 July 2024

0145-305X/© 2024 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

intramolecular disulphide bonds. The main targets of defensins are the membranes of pathogens, including a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, viruses and protozoa. Given the considerable variability of tick defensins, we summarize their common biological properties and highlight representative peptides. Tick defensins exhibit an impressive ability to eliminate a wide range of microorganisms, including antibiotic-resistant bacteria and tick-borne pathogens (Wu et al., 2022). Ticks, which serve as vectors for various pathogens, have evolved to produce a range of antimicrobial agents. In view of the increasing resistance of bacteria to antibiotics, there is a need to develop new sources of antibacterial substances. Tick defensins are promising candidate for a new class of antibiotic (Chrudimská et al., 2010). Two defensin isoforms (Def1 and Def2) were isolated from a cDNA library of *Ixodes ricinus*. Studies show that, the Def2 isoform has greater efficacy in inhibiting and eradicating bacteria compared to Def1 (Chrudimská et al., 2011; Rudenko et al., 2005, 2007). Another study identified six new defensin genes, designated DefMT2–7, including the two isoforms DefMT3 and DefMT4, with different phylogeny and gene expression patterns (Tonk et al., 2014). Only one isoform of defensin has been identified in the tick *Dermacentor reticulatus*. This particular peptide has a deletion of 21 amino acids in the mature molecule, which affects the presence of six crucial cysteine residues that are essential for typical defensin activity (Chrudimská et al., 2010). These tick species are two of the most important vectors in Europe. *I. ricinus* is widely distributed throughout Europe, while *D. reticulatus* has a more limited distribution, mainly in Central Europe (Estrada-Peña et al., 2013; Rubel et al., 2016).

Our study is based on the hypothesis that the expression of defensin genes in ticks occurring naturally (questing and engorged ticks), would increase in response to the presence of tick-borne pathogens (in relation to mono- and co-infections). Questing ticks were collected directly from the environment. Engorged ticks were collected from dogs during a blood meal. The females were fully engorged, while the males were residually engorged. Therefore, the aim of this study was to analyse the expression patterns of defensin genes in *I. ricinus* (def1 and def2) and *D. reticulatus* (defDr) questing and engorged ticks in response to the presence of specific pathogens or the occurrence of co-infections, and possible regulatory mechanisms of defensins in tick vector competence. Co-infections have been investigated, as increased colonization with different pathogens may enhance the immune response of ticks. The possible co-occurrence of pathogens in a tick requires the development of coexistence mechanisms.

2. Materials and methods

Ticks collection. The ticks were collected in 2021 and 2022 from April to October in urban and suburban areas of the Warmia and Mazury region in north-eastern Poland. Questing ticks were collected between 9 a.m. and 4 p.m., using the standard flagging method (Espada et al., 2021) in the Pieczewo housing estate district of the city of Olsztyn. The feeding ticks parasitizing on dogs staying in the Tomaryny Dog Shelter. All individuals were identified by species, sex and developmental stage using a taxonomic key (Nowak-Chmura, 2013). Total of 428 questing and feeding tick individuals were preserved in stayRNA™ buffer (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) for further molecular analyses. Questing ticks accounted for 52.6% (n = 225) of the collected ticks. *I. ricinus* (129 specimens: 61 females, 45 males, 23 nymphs) dominated over *D. reticulatus* (96 individuals: 44 females, 52 males). Of the 203 (47.4%) ticks removed from 32 dogs only adult individuals were collected, 84 were classified as *I. ricinus* ticks (77 females and 7 males), while 119 individuals belonged to the *D. reticulatus* species (104 females, 15 males). The female ticks were feeding and fully engorged, while the male ticks were only residually engorged.

RNA and DNA isolation. Nucleic acids from questing ticks were extracted from whole individuals using the NZYol reagent (NZYTech, Lisbon, Portugal) according to the manufacturer's instructions. First, engorged ticks were cut along the body with a sterile scalpel and divided

into two parts to obtain longitudinal section. Subsequently, RNA and DNA were isolated separately from the obtained tick body parts, using Total RNA Mini Plus and Genomic Micro AX Tissue Gravity kits (both from A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland). The concentration of the extracted RNA was determined using NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). To assess the quality of the DNA obtained and to evaluate PCR inhibition, fragments of the tick 16S rDNA gene were amplified by PCR using PCR Mix Plus Green (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) based on primer sequences (Table 1) and under the conditions previously described by Black and Piesman (1994). Samples of poor quality should be discarded, however all samples tested were suitable for further analysis. PCR reactions were performed using a Mastercycler Nexus (Eppendorf, Hamburg, Germany).

cDNA synthesis. The RNA extracted from the questing ticks was used for cDNA synthesis using the TranScriba kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland). The quality and quantity of both RNA and cDNA after reverse transcription were checked using NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Tecan devices (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) were also used to confirm the results obtained. The same amount of RNA (1 µg) was used to synthesize cDNA. If necessary, the cDNA was diluted with nuclease-free water to achieve a concentration of 100 ng/µl.

Detection of tick-borne pathogens. Detection of tick-borne pathogens was performed using DNA/cDNA extracted from ticks by PCR, nPCR and qPCR (Fig. 1). PCR (*Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp.) and nested PCR (*A. phagocytophilum*) amplifications were performed using a Mastercycler Nexus device. The 25 µl of PCR mixture contained 12.5 µl of PCR Mix Plus Green (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland), 10.5 µl nuclease-free water, and 0.5 µl of each primer (10 µM), and 1 µl (100 ng) of DNA template. Quality control included both positive (positive DNA samples from ticks for each pathogen, purified and confirmed by sequencing) and negative controls (sterile nuclease free water) amplified during each PCR reaction. Amplicons were visualized by electrophoresis on a 2% agarose gel stained with SimplySafe™ dye (Eurx, Gdańsk, Poland). Each PCR was performed with serial dilutions of the pathogen-positive template (with DNA concentrations ranging from 1 µg to 0.1 µg) to evaluate PCR interference, inhibitors and limit of detection. The qPCR reactions (*N. mikurensis*) were performed on a QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System from Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Reactions consisted of 5 µl SYBR Green Mix (Bio-Rad, Hercules, CA, United States), 0.2 µl of each primer (10 µM), 1 µl of cDNA template (100 ng) and topped up to 10 µl with RNase-free water. Eight-fold serial dilutions were used to generate standard curves with synthesized gBlocks® Gene Fragment (IDT-Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium).

The presence of *Borrelia* spirochetes was confirmed by standard PCR using SL1/SL2 targeting a fragment of the outer surface protein A (ospA) gene (Table 1) according to the protocol described by Demaerschalck et al. (1995).

Primers CS409 and Rp1258 were used to detect the genetic material of *Rickettsia* spp. (Table 1), targeting a fragment of the citrate synthase gene (*gltA*). PCR was performed according to the protocol described by Roux et al. (1997). The presence of *Babesia* spp. was confirmed with primers BJ1 and BN2 targeting the 18S rRNA (Table 1) according to the protocol described by Casati et al. (2006).

The presence of *A. phagocytophilum* DNA in ticks was confirmed by nPCR using two sets of primers specific for the 16S rRNA gene: outer – ge3a/ge10r and inner – ge9f/ge2 (Table 1), according to the reaction conditions described by Massung et al. (1998). Detection of *N. mikurensis* in questing and engorged ticks was carried out using cDNA and DNA, respectively. qPCRs were performed under the conditions described in the previous study (Szczotko et al., 2023), using primers NEO_16S_F/NEO_16S_R developed by Sandelin et al. (2015) (Table 1) to amplify the 16S rRNA gene sequence.

The selected PCR amplicons obtained were then sequenced to confirm sequence identity (Macrogen Europe, Amsterdam, Netherlands)

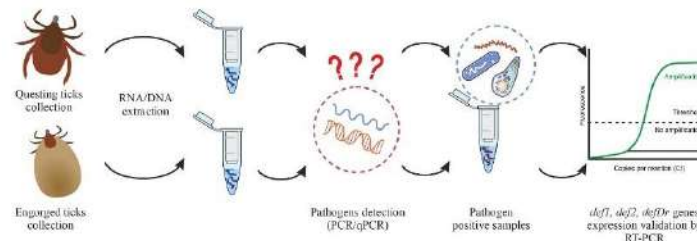


Fig. 1. Experimental study scheme (Made with SciPainter).

Table 1
Primers used in the study for the detection of tick-borne pathogens and expected fragment length.

Method	Target Gene	Primer Name	Primer Sequence 5'-3'	Product Size [bp]	Reference
PCR	Tick 16S rDNA	16S F 16S R	CTGCTCAATGATTCTTTTAAATGCTGTGG CCGGTCTGAACCTCAGATCAAGT	460	Black and Piesman (1994)
PCR	<i>Borrelia</i> ospA	SL1 SL2	AATAGGTCTAATAATAGCTTAATAGC CTAGTGTCTTGGCAATGTTCTTTGAAAA	307	Dennerscheid et al. (1995)
PCR	<i>Rickettsia</i> gHA	CS409 Rp1258	CTATGGCTATTATGCTTTC ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	769	Roux et al. (1997)
PCR	<i>Babesia</i> 18S rRNA	BJ1 BN2	GTCCTGTAAATGGAATGATGG TAGTTTATGGTTAGGACTACG	~490	Casati et al. (2006)
nPCR	<i>Aph.</i> 16S rRNA	ge3a ge10r ge9f ge2	CACATGCAAGTCGAACGGAATATTC TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC AACGGAATTATCTTTATAGCTTGGT GGCAGTATTAAAAGCAGCTCCAGG	932 546	Messing et al. (1998)
qPCR	<i>N.m.</i> 16S rRNA	Neo 16S F Neo 16S R	GTAAGGGCATGTAGCGGTTTAA TCCACTATCTCTCTGATCTGTAGTTTAA	107	Sandelin et al. (2015)

and then compared with the data registered in the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>, accessed on September 08, 2023) using the BLAST-NCBI program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, accessed on November 13, 2023) (Supplementary Sequencing Data).

Defensin genes expression in ticks. The expression of defensin genes was examined in ticks with confirmed pathogen presence or co-infection and in ticks that tested negative for the pathogens examined. In particular, the genes expression levels of defensin 1 and 2 (*def1*, *def2*) in *I. ricinus* and of *defDr* - defensin in *D. reticulatus* were examined (Fig. 1). Reverse transcription qPCR was performed using the RT PCR Mix SYBR® (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland). The reaction mixture consisted of 1 µL (100 ng) cDNA, 5 µL SYBR Green PCR-MIX, and 0.15 µL ROX (5-carboxy-X-rhodamine) reference dye, and the volume was adjusted to 10 µL with nuclease-free water. The means and standard deviations were used for relative transcript levels analysis at each time point using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Results were presented as fold changes in gene expression normalized to

two endogenous reference genes, *actin* and *elongation factor* (ACT, EF; Table 2) and relative to the control (relative quantification (RQ) = 1; ticks without the pathogens tested). All samples were tested in triplicate on a QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System from Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A standard curve with a sample series dilution of the target template was used to estimate the qPCR efficiency (Table 2). The genes were amplified under the following thermal cycle conditions: an initial hold step of 2min at 50 °C, 10min at 95 °C was followed by 40 cycles at 15s at 95 °C, 1min at 60 °C and melt curve stage: 15s at 95 °C, 1min at 60 °C, 10s at 95 °C.

Statistical analysis. Data were analysed using Statistica 13.3 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA) and GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, CA, USA). The infection rates of the pathogens were determined using the chi-square test (χ^2) and confidence intervals. The ΔCq values obtained were subjected to statistical analysis to determine the significance of gene expression. Normality of ΔCq values was confirmed using the Shapiro-Wilk test (Shapiro and Wilk, 1965). Analysis of variance (ANOVA) or its non-parametric equivalent was used

Table 2
Primer sequences (5' to 3') and their efficiency used for qPCR analysis of defensins expression.

Target Gene	Primer Name	Primer Sequence 5'-3'	Efficiency ^a (%)	Reference
Actin	ACT F ACT R	ATGTGTGAAGACGAGGTTGCGGC GTACAGGACAGCAGCGGCTGG	99%	Chrudimská et al. (2011)
Elongation factor	EF F EF R	ACGAGGCTCTGACGGAAG CAGCAGCACTCCTTAC	99%	Perner et al. (2018)
<i>I. ricinus</i> <i>def1</i>	Def1_F Def1_R	GGTGGCTACTACTGCCATTTT TCAGACGCAGATGCAGGCTTTT	98%	Chrudimská et al. (2011)
<i>I. ricinus</i> <i>def2</i>	Def2_F Def2_R	GGTGGTACTACTGCCATTTCCG TCAGACGCAGATGCAGGCTTTT	99%	Chrudimská et al. (2011)
<i>D. reticulatus</i> <i>defDr</i>	Def_Der_F Def_Der_R	ATGCGCGGACTTTGCATC TTAATGCTGTAGCAGGTGG	97%	Chrudimská et al. (2010)

^a Each standard curve had 6 concentrations of targeted template made by 10-fold dilutions.

to assess the difference between the means of the compared groups. P-values <0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis considered groups with 10 or more individuals per condition. Co-occurrence probability was tested by hypergeometric distribution test (Veech 2013; Zhou et al., 2022).

3. Results

Detection of tick-borne pathogens. The presence of one, two, three or four tick-borne pathogens was detected in 50.2% (n = 113) of questing and 54.3% (n = 103) of ticks collected from dogs. For simplicity, we will henceforth refer to the ticks collected from dogs that included engorged or partially fed ticks, as engorged ticks. The overall prevalence of examined pathogens in questing ticks was 19.6% (n = 44) for *Borrelia* spp., 33.3% (n = 75) for *Rickettsia* spp., 1.8% (n = 4) for *Babesia* spp., 9.8% (n = 22) for *Anaplasma phagocytophilum* and 13.8% (n = 31) for *Neorhlichia mikurensis* (Table S1).

In the ticks collected from dogs (engorged), the prevalence found was: 10.8% (n = 22) for *Borrelia* spp., 36.9% (n = 75) for *Rickettsia* spp., 2.5% (n = 5) for *Babesia* spp., 0.99% (n = 2) for *A. phagocytophilum*, and 12.3% (n = 25) for *N. mikurensis* (Table S2).

***Borrelia* spp.** A fragment of the *OspA* gene was amplified in 15.4% (66/428) of tick genetic material samples. Most *Borrelia* spp. (44/66, 66.7%) were identified in samples obtained from questing ticks. The infection rate was significantly higher ($\chi^2 = 4.705$, $p = 0.03$) in questing ticks (19.6%, n = 44; Table S1) than in ticks collected from dogs (10.8%, n = 22; Table S2). A higher percentage of both questing and engorged *D. reticulatus* ticks was found to be infected with borreliae in comparison to questing and engorged *I. ricinus*. However, the difference was not significant in either case (questing ticks: $\chi^2 = 1.202$, $p = 0.273$; engorged ticks: $\chi^2 = 2.024$, $p = 0.155$).

***Rickettsia* spp.** Overall, bacterial DNA was detected in 35% of the analysed individuals (150/428). Similar ratio of infected ticks was observed when comparing questing (33.3%, 75/225; Table S1) and engorged ticks (36.9%, 75/203; Table S2), and consistently the differences were not statistically significant ($\chi^2 = 0.612$, $p = 0.434$). The percentage of infected *I. ricinus* and *D. reticulatus* questing ticks was similar ($\chi^2 = 0.082$, $p = 0.775$) reaching 32.6% (42/129) and 34.4% (33/96), respectively. In engorged ticks, the percentage of infected individuals was higher in *I. ricinus* ticks than in *D. reticulatus* ticks (42.9% and 32.8% respectively), but the difference was not statistically significant ($\chi^2 = 2.149$, $p = 0.143$).

***Babesia* spp.** Genetic material from protozoa was identified in 2.1% (9/428) of the samples. The percentage of *Babesia* spp. detected was similar for the infection rate in both, questing (1.8%, 4/225; Table S1) and engorged ticks (2.5%, 5/203; Table S2) ($\chi^2 = 0.374$, $p = 0.541$).

***Anaplasma phagocytophilum*.** The DNA of *A. phagocytophilum* was detected in 5.6% (24/428) of the tick samples analysed. Most positive PCR products were found in the questing ticks' genetic material (91.7%, 22/24; Table S1). The infection rate was significantly higher in questing ticks (9.8%, n = 22) than in ticks collected from dogs (0.99%, n = 2; Table S2) ($\chi^2 = 14.209$, $p = 0.000164$).

***Neorhlichia mikurensis*.** In total, pathogen DNA was detected in 13.1% (56/428) of the cDNA samples from ticks. No statistically significant difference ($\chi^2 = 0.0002$, $p = 0.987992$) was found between the number of infected questing (13.8%, 31/225; Table 1) and engorged ticks (12.3%, 25/203; Table S2). However, when analysing infections per tick species, engorged *I. ricinus* had a higher percentage of *N. mikurensis* (19.1%, 16/84; Table S2) than *D. reticulatus* (7.6%, 9/119; Table S2) ($\chi^2 = 6.014$, $p = 0.0142$). Questing ticks from both species equally harboured *N. mikurensis* ($\chi^2 = 0.0915$, $p = 0.762$; Table S1).

Mono- and co-infections. In questing ticks, monoinfections for analysed microorganisms were identified in 58.4% (66/113) PCR-positive samples. *Rickettsia* spp. (36/66, 54.6%) and *N. mikurensis* (17/66, 25.8%) were most frequently represented among the monoinfections in questing ticks. *Borrelia* spp. and *A. phagocytophilum*

monoinfections were the least frequent in questing ticks, with only 12 (12/66, 18.2%) and two cases (2/66, 3.0%), respectively. The latter were found exclusively in *D. reticulatus* ticks (Table S3). Statistical analysis revealed significant differences between *Rickettsia* spp. and *N. mikurensis* monoinfections ($\chi^2 = 10.2803$, $p < 0.001344$). No *Babesia* spp. monoinfections were found in questing ticks (Table S3). The comparison between monoinfections and co-infections in questing ticks resulted in a $\chi^2 = 6.38$, with a significance level of $p = 0.011$. Co-infections with two pathogens in questing ticks were detected in 30.1% (34/113; 95%CI: 22.9–41.1). The most frequently detected co-infection was *Borrelia* spp./*Rickettsia* spp. with 13 of 47 cases (27.7%; Table S4). *Babesia* spp. was exclusively detected in co-infections, especially in combinations with *Rickettsia* spp./*N. mikurensis* and *Borrelia* spp./*Rickettsia* spp. Co-infections with three or four pathogens were detected in 9.7% (11/113; 95%CI: 4.96–16.8) and 1.8% (2/113; 95%CI: 0.2–6.3) of the PCR/qPCR-positive samples, respectively. The most frequent co-infection with three pathogens was *Borrelia* spp./*A. phagocytophilum*/*Rickettsia* spp., accounting 7 cases out of 47 (14.9%; Table S4). The only found co-infection involving four pathogens was *Borrelia* spp./*A. phagocytophilum*/*Rickettsia* spp./*N. mikurensis* with two cases out of 47 (4.3%; Table S4).

Among the engorged ticks, monoinfections were detected in 74.8% (77/103) of the PCR-positive samples obtained from ticks removed from dogs (Table S3). The most frequently observed monoinfections were *Rickettsia* spp. (50/77, 64.9%) and *Borrelia* spp. (13/77, 16.9%). In contrast, *Babesia* spp. monoinfections were the least common, with four out of 77 cases (5.2%). No cases of *A. phagocytophilum* monoinfections were recorded in engorged ticks (0/77; Table S3). Apart from co-infections involving two pathogens, no other co-infections were detected in ticks collected from dogs. The percentage of detected co-infections was 25.2% (26/103; 95% CI: 17.2–34.8), with *Rickettsia* spp./*N. mikurensis* being the most common with 14 out of 26 cases (53.8%; Table S4). *Babesia* spp. was mostly found in monoinfections (80%, 4/5) in engorged ticks (Table S3), with only one PCR-positive sample confirming a co-infection of *Babesia* spp./*Rickettsia* spp. in a questing ticks (1/26; 3.8%; Table S4). The comparison between monoinfections and co-infections in engorged ticks showed a highly significant $\chi^2 = 50.505$, with $p < 0.00001$.

4. Co-occurrence probability

The results showed that in questing *I. ricinus* ticks, the probability of co-occurrence of two or three pathogens was low ($p = 9.52 \times 10^{-8}$, $p = 0.043$). For engorged *I. ricinus* ticks, the detection of two pathogens in one individual was a probability of $p = 2.6 \times 10^{-6}$. In questing *D. reticulatus* ticks, two, three and four pathogens were detected at once, with a probability of 2.55×10^{-7} , 5×10^{-6} and 0.065 respectively. In engorged *D. reticulatus* ticks two pathogens co-occurrence was observed with probability of $p = 8 \times 10^{-4}$.

Defensin gene expression in ticks. Determining cases of mono- and co-infection with tick-borne pathogens at different developmental stages, sex and questing/engorged states was the basis for the next analysis. Groups of at least ten samples per infection/co-infection were compared. The sample size of the compared groups results from the data obtained from the detection of pathogens (Table S1–S4). Consequently, some comparisons could not be performed due to the small sample size (e.g. *Babesia* spp. monoinfection).

4.1. Monoinfections

***Borrelia* spp.** In questing *I. ricinus* ticks positive for borreliae (n = 22) no changes were detected in the gene expression of *def1* and *def2* (Fig. 2A1). *DefDr* gene expression was upregulated in questing (n = 22) and feeding (n = 16) *D. reticulatus* ticks compared to controls – noninfected ticks (fold change = 20.68 $p = 0.0016$; fold change = 12.76, $p = 0.0037$, respectively) (Fig. 2B).

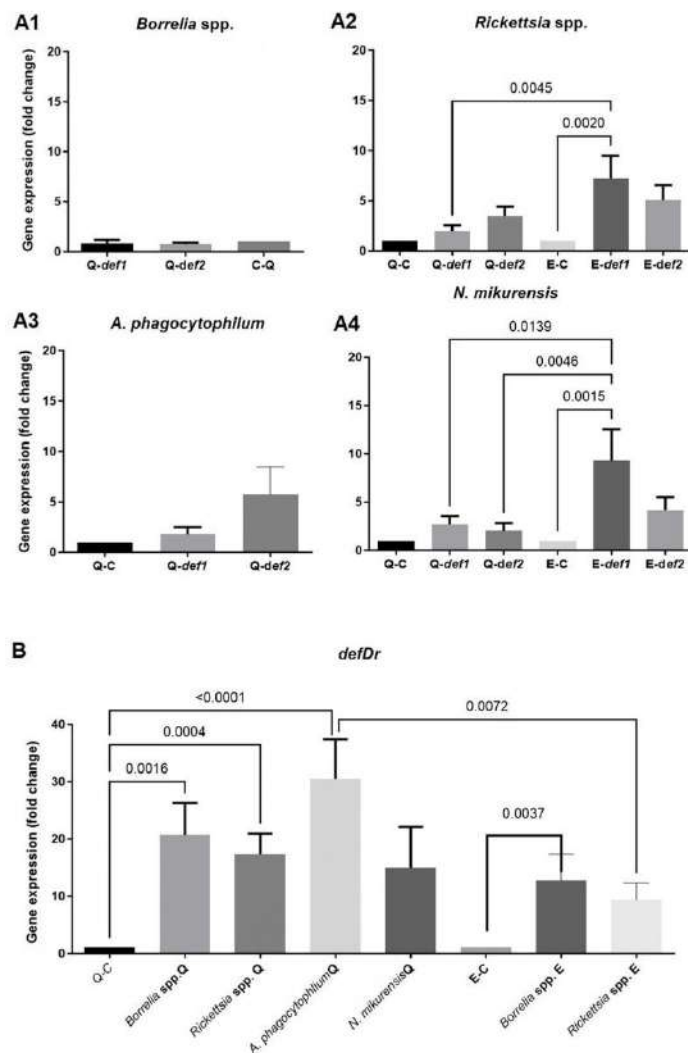


Fig. 2. Evaluation of tick expression levels of defense genes in the presence of pathogens without considering the co-occurrence of pathogens. **A.** Expression of *def1* and *def2* genes expression in *I. ricinus* questing (Q-*def1*, Q-*def2*) and ticks engorged on dogs (E-*def1*, E-*def2*) in the confirmed presence of *Borrelia* spp. (A1), *Rickettsia* spp. (A2), *A. phagocytophilum* (A3) and *N. mikurensis* (A4). Results regarding *Babesia* spp. are not presented due to $n < 10$. **B.** *Dermacentor reticulatus* defensin gene expression in the response to the presence of *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *Anaplasma* and *N. mikurensis* (Q-questing tick; E-engorged ticks). The results shown are mean values and standard deviations of the gene expression levels. Results in control and in questing and engorged ticks were analysed by the parametric or non-parametric ANOVA and were normalized to two endogenous reference genes, actin and elongation factor and to the relative control (relative quantification (RQ) = 1; ticks without pathogens examined). The results of engorged *D. reticulatus* ticks infected with *A. phagocytophilum* and *N. mikurensis* are not shown due to $n < 10$; Q-C-questing ticks relative control, E-C- engorged ticks relative control.

Rickettsia spp. *I. ricinus* tick samples with a confirmed presence of *Rickettsia* spp. showed overexpression of *def1* with a calculated change of 3.66-fold ($p = 0.0045$) when comparing questing ($n = 42$) to engorged ($n = 36$) *I. ricinus* ticks. In addition, *def1* was overexpressed 7.22 times in engorged ticks ($p = 0.002$) (Fig. 2A2). The expression of *defDr* was upregulated 17.36-fold times in questing *D. reticulatus* ticks ($n = 33$) ($p = 0.0004$) (Fig. 2B).

Anaplasma phagocytophilum. No significant changes in *def1* and *def2* gene expression were detected in *I. ricinus* ticks positive for *A. phagocytophilum* ($n = 10$) (Fig. 2A3). A significant difference was found in questing *D. reticulatus* ticks ($n = 12$) ($p < 0.0001$; fold change = 30.5) (Fig. 2B).

Neorickettsia mikurensis. It was observed that *def1* was overexpressed 9.27 times in the presence of *N. mikurensis* in engorged *I. ricinus*

ticks (n = 16) (p = 0.0015). Furthermore, comparison of *def1* expression in questing (n = 17) and engorged (n = 16) individuals showed significant differences with a calculated fold change of 3.43 (p = 0.0139) (Fig. 2A4).

Life stages. Analysis of defensin genes expression between *I. ricinus* life cycle stages tested showed a significant difference in *def1* and *def2* genes expression between nymphs (n = 19) and females tested (n = 96), with expression 20 and 2.8 times higher in adults females (p = 0.0154, p = 0.0266, respectively) (Fig. 3A1-2). Further analysis of *I. ricinus* life cycle stages in relation to *def1* and *def2* expression in *Rickettsia* spp. positive males (n = 24) and females (n = 48) revealed no significant differences. *DefDr* gene expression showed no differences when compared *D. reticulatus* males and females positive for *Borrelia* spp. (n = 11, n = 27, respectively) and *Rickettsia* spp. (n = 30, n = 42, respectively) (Fig. 3B3-4).

Defensin genes expression in *I. ricinus* vs *D. reticulatus*. Comparison of defensin genes expression in *I. ricinus* and *D. reticulatus*, ticks which has been shown to harbour *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum* and *N. mikurensis*, revealed clear differences. In all cases, significant overexpression (p < 0.05) of *defDr* was observed in questing *D. reticulatus* for *Borrelia* spp. (n = 22), and *A. phagocytophilum* (n = 12), for *Rickettsia* spp. (n = 33) and for *N. mikurensis* (n = 14)

(Fig. 4A-D). Compared to the control, *defDr* expression was 20.68-fold times, 30.55-fold times, 17.35-fold times 14.94-fold times higher, respectively. In the case of *Borrelia* spp. there were significant differences between questing *D. reticulatus* - Q-*defDr* (n = 22) compared to *def1* (Q-*def1*; n = 22), *def2* (Q-*def2*; n = 22) in questing *I. ricinus*. For *D. reticulatus*, the value was 28-fold and 25-fold higher, respectively (Fig. 4A). A similar trend was also observed in the presence of *Rickettsia* spp. (Q-*defDr* (n = 33) vs. Q-*def1* (n = 42); Q-*defDr* vs. Q-*def2* (n = 42)), *A. phagocytophilum* (Q-*defDr* (n = 12) vs Q-*def1* (n = 10), Q-*defDr* vs Q-*def2* (n = 10)) and *N. mikurensis* (Q-*defDr* (n = 14) vs Q-*def1* (n = 17); Q-*defDr* vs Q-*def2* (n = 17)) in questing ticks (Fig. 4B-D). Overexpression of *defDr* was only observed in engorged ticks in the presence of *Borrelia* (n = 16) (p = 0.0037) (Fig. 4A).

Co-infections. The results show that the expression of *def1*, *def2* (*I. ricinus*, n = 69) and *defDr* (*D. reticulatus*, n = 74), genes was significantly lower in monoinfections compared to co-infections (n = 39 and n = 34, respectively) (2-fold, 1.6-fold and 2.4-fold, p = 0.0119, p = 0.025, p = 0.0090, respectively) (Fig. 5A1-3). However, a detailed statistical analysis of the results showed only significant differences in *def1* in engorged *I. ricinus* in the presence of monoinfection (n = 26) and double co-infection (n = 16) (4.04-fold higher, p = 0.0410) (Fig. 5B1-B2).

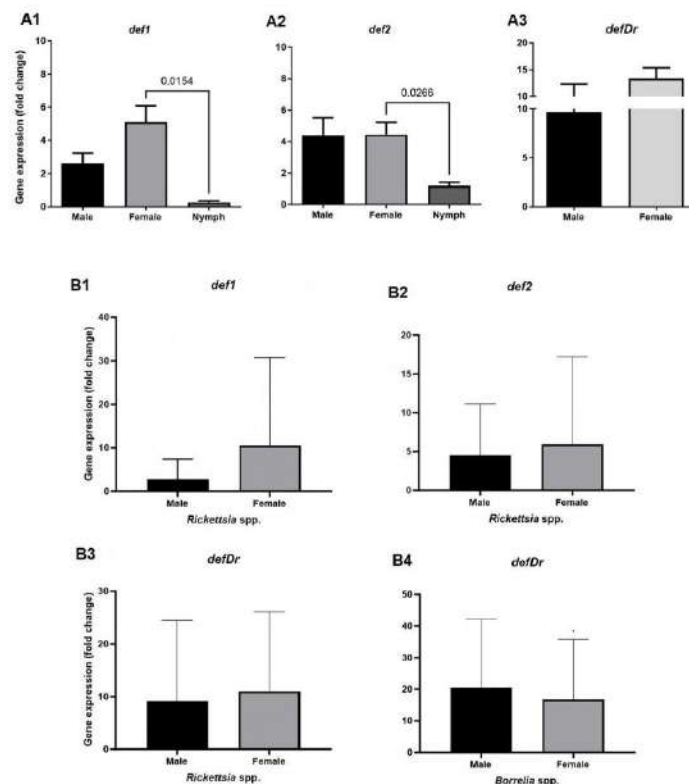


Fig. 3. Differences in expression of *def1*, *def2* (*Ixodes ricinus*) and *defDr* (*Dermacentor reticulatus*) genes between adult males, females, and nymphs A. *def1* (A1), *def2* (A2) and *defDr* (A3) gene expression in adult males, females, and nymphs, excluding tick infection. B. Differences in the expression of *def1* (B1), *def2* (B2) and *defDr* (B3-4) genes between the tested life cycles stages of ticks with confirmed presence of *Borrelia* spp. (B3) *Rickettsia* spp. (B1-3). The results shown are means and standard deviations of gene expression values. Results were analysed by parametric or non-parametric ANOVA, and normalized to two endogenous reference genes, actin and elongation factor, and to the relative control (relative quantification (RQ) = 1; ticks without pathogens examined).

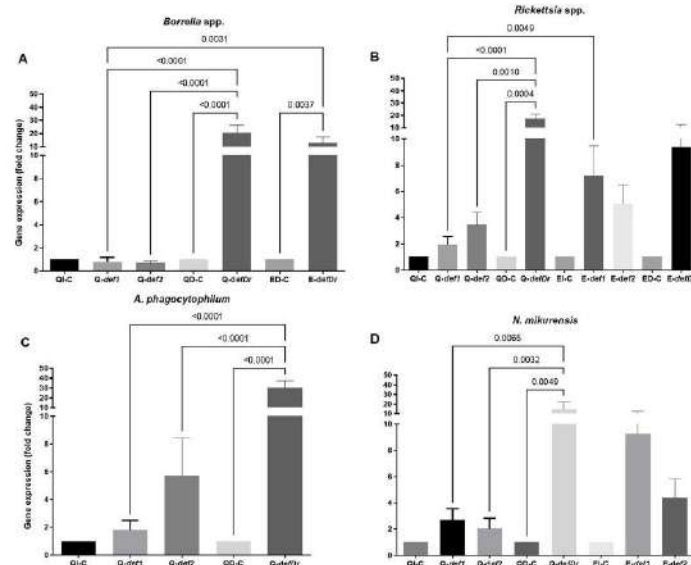


Fig. 4. Differences between the expression of *def1*, *def2* and *defDr* genes in engorged and questing *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks without taking into account the co-occurrence of pathogens: *Borrelia* spp. (A), *Rickettsia* spp. (B), *A. phagocytophilum* (C), *N. mikurensis* (D). The results shown are means and standard deviation values of gene expression levels. Results in control and in questing and engorged ticks were analysed with the parametric or non-parametric ANOVA and normalized to two endogenous reference genes, actin and elongation factor, and to the relative control (relative quantification (RQ) = 1; ticks without pathogens examined); QI-C – questing *I. ricinus* relative control, EI-C – engorged *I. ricinus* relative control, QD-C – questing *D. reticulatus* relative control, ED-C – engorged *D. reticulatus* relative control.

5. Discussion

In this study, we investigated the prevalence and diversity of tick-borne pathogens in questing and feeding dogs *I. ricinus* and *D. reticulatus* and their influence on the expression of defensin genes. The tests carried out on 428 ticks showed that more than 50% of the ticks carried one to four pathogens. Co-infections were found in about one third of the ticks examined. The gene expression analysis revealed differences in the expression of defensin genes when a pathogen and co-infections were detected in the ticks. However, the analyses showed that the probability of simultaneous occurrence of two, three or four pathogens in the ticks tested was low and the recorded cases of co-occurrence were rather random. Although 19 tick species have been identified in Poland, *I. ricinus* and *D. reticulatus* are the most widespread species, as is the case throughout Europe (Kubiak et al., 2018; Nowak-Chmura and Siuda, 2012). *I. ricinus* ticks are the main vectors of pathogens that cause tick-borne infections in humans in Europe. Although most of the infections caused by these pathogens are thought to be asymptomatic or mild and self-limiting, their potential to cause severe disease, particularly in immunocompromised individuals, must be seriously considered. Due to the lack of characteristic symptoms, low awareness, lack of surveillance and limited use/availability of diagnostic tests for these under-recognized tick-borne diseases, a significant number of cases are likely to remain undiagnosed, leaving the public health impact unclear (Quarsten et al., 2023). Both the *I. ricinus* and *D. reticulatus* ticks are considered as reservoirs and vectors of pathogens (Zajac et al., 2023) and play a critical role in the transmission and maintenance of tick-borne pathogens in the environment (Rubel et al., 2020).

The infection rate of pathogens identified in ticks in this study is consistent with the ranges observed in other European studies (Arz et al.,

2023; Gandy et al., 2022; Larsson et al., 2018; Sands et al., 2022; Strnad et al., 2017). In relation to this part of the study, it is important to point out that the pathogens detected in ticks feeding on dogs may not reflect tick infection, as the positive signal could be due to their presence in the blood meal. However, studies on the prevalence of tick-borne pathogens only provide the background for the present study. Our main objective was to analyse the differences in gene expression of defensins in questing and feeding *I. ricinus* and *D. reticulatus* ticks carrying pathogens (including co-infections). We emphasize that when analysing the results from feeding ticks, it should be taken into account that variations in gene expression may be due to either previous exposure to pathogens or recent acquisition of pathogens during the blood meal. The analysis of the results obtained, confirmed our hypothesis that the presence of the pathogens can influence the expression of defensin genes in the tick's body. This is a well-known relationship that does not only apply to ticks. It is important to point out that the level of gene expression does not always correspond to the expression of proteins, as protein expression and function can be influenced by various post-transcriptional and post-translational processes. Nevertheless, gene expression trends are valuable as they can provide insight into the biological processes that are activated or inhibited in cells, tissues and organisms.

The comparison of the expression of *def1* and *def2* genes between life stages shows that it is significantly lower in nymphs than in females of *I. ricinus* ticks. This result could be related to the vector capacity of these ticks and could apply to certain tick-pathogen combinations. Considering that females lay eggs, which may contribute to the maintenance of some pathogens with transovarial transmission cycles, that they feed longer, which increases the likelihood of pathogen transmission to the host, and that females consume larger blood meals than nymphs, which may increase the likelihood of infection. And the consequence could be an increased expression of defensin genes in the females. On the other

hand, the nymphs of *I. ricinus* are considered to be very important vectors of borreliae (Kubiak et al., 2022). The low expression of defensin genes at this stage seems to favour the transmission of spirochetes. To summarize, the above suggest a lower vector capacity rather than an explanation for the important role of females in the transmission and maintenance of pathogens. Fig. 5

Ticks cannot automatically be regarded as vector of certain pathogens after the pathogen has been detected in the genetic material of the tick. To act as a vector for a horizontally persistent pathogen, a tick species must have the ability to ingest the pathogen during the larval or nymphal stage. The vector must be able to retain the pathogen through the moulting stages and transmit it to a host during feeding in the next nymph stage or in the adult tick (Eisen, 2020). Vertical/transovarial transmission occurs while pathogen is transmitting from the female tick to the larvae of the next generation (Ravindran et al., 2023). *I. ricinus* ticks are considered vectors of a variety of pathogens, including the causative agent of Lyme disease (LD). Their role as vectors is enhanced by their generalist nature (Michalski et al., 2020). The importance of

D. reticulatus in the transmission of *Borrelia* spp. and *A. phagocytophilum* appears to be insignificant; on the contrary, *D. reticulatus* ticks have been shown to be vector of *Rickettsia* spp. and *Babesia* spp. (Kubiak et al., 2024). Currently, there is no conclusive evidence for the epidemiological importance of *D. reticulatus* ticks in the transmission of *N. mikurensis* (Szczotko et al., 2023). In contrast to *Rickettsia* spp. and *Babesia* spp., transovarial transmission of *Borrelia* spp., *N. mikurensis*, and *A. phagocytophilum* does not occur (Dumler et al., 2001; Michalski et al., 2020; Mierzejewska et al., 2018; Piotrowski and Rymaszewska, 2020; Richter and Matuschka, 2012). These differences in vector competence between tick species are probably related to different mechanisms of innate immunity, including the action of defensins (Taylor, 2006).

In the present study, significant changes in gene expression were observed in ticks with proven presence of *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp. and *N. mikurensis*. A study by Ceraul et al. (2007) confirmed the upregulation of defensin in response to *Rickettsia montanensis* in *Dermacentor variabilis* (ticks were fed via capillary tubes). Significant differences were also observed in the presence of *Borrelia* spirochetes (Ceraul et al.,

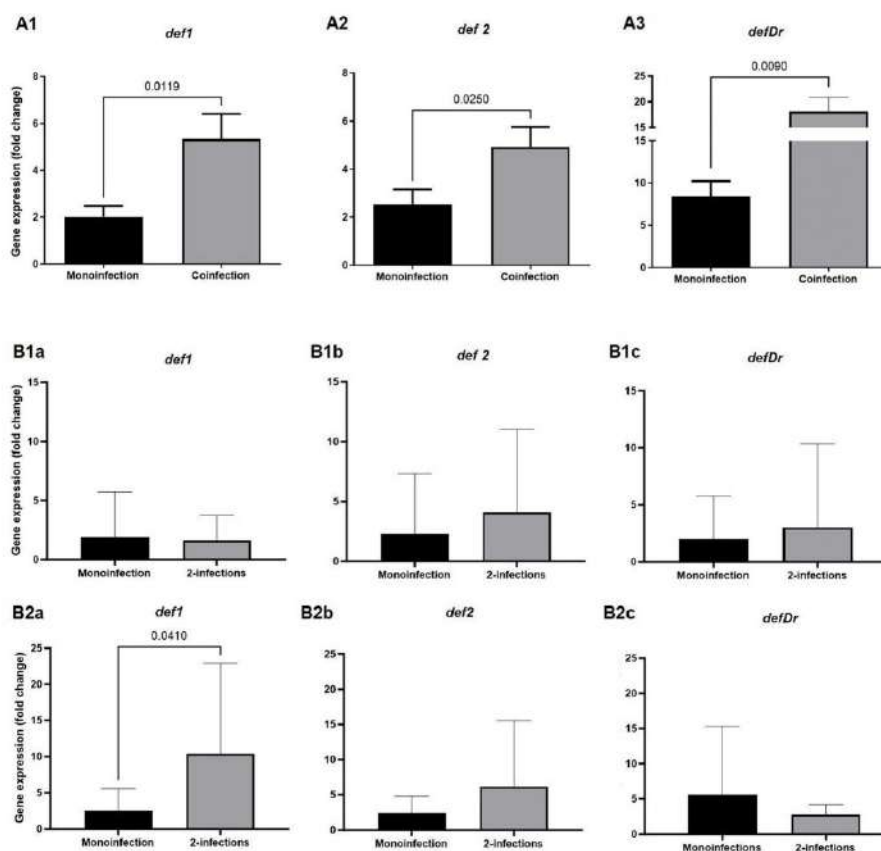


Fig. 5. Evaluation of defensin levels in questing and in engorged *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks in the presence of single or multiple infections. **A.** Difference in genes expression between ticks with confirmed monoinfection and co-infection for *def1* (A1), *def2* (A2), *defDr* (A3). **B.** Difference in genes expression between ticks with confirmed monoinfections and 2,3-co-infections (B1-questing ticks: B1a-*def1*, B1b-*def2*, B1c-*defDr*; B2-engorged ticks: B2a-*def1*, B2b-*def2*, B2c-*defDr*). The results shown are means and standard deviations of gene expression values. Results were analysed by the parametric or non-parametric ANOVA and normalized to two endogenous reference genes, actin and elongation factor, and to the relative control (relative quantification (RQ) = 1; ticks with no known pathogen).

2007). When comparing the defensins of *I. ricinus* and *D. reticulatus*, the most significant difference was observed in questing *D. reticulatus* ticks. In the presence of spirochetes, it is important to emphasize that the expression of *def1* and *def2* showed no significant increase in *I. ricinus* ticks. A significant upregulation was observed in the expression of the *defDr* gene, which increased several-fold compared to the control group in which the presence of the pathogen was not confirmed. This could be related to the fact that *I. ricinus* ticks are very efficient vectors for *Borrelia* spirochetes (Sprong et al., 2018) and have a long co-evolution. On the contrary, transmission of the LD agent was not confirmed in *D. reticulatus*, which correlates with the high expression of the *defDr* gene detected in this study. Chrudimská et al. (2014) conducted a study on the anti-borrelial activities of *Dermacentor* defensin, indicating its possible role in the clearance of ingested *Borrelia* from a blood meal. Johns et al. (2001) observed a borreliacidal effect of *D. variabilis* defensin (varisin). This effect was only maintained when it occurred together with lysozyme. This tick species is unable to maintain and spread *B. burgdorferi* s.l., the causative agent of LD (Piesman and Sinsky, 1988) suggesting a possible role of varisin and lysozyme in the inability of *D. variabilis* to sustain spirochetes (Johns et al., 2001).

A study conducted by Rudolf and Hubálek (2003) showed that salivary gland and midgut extracts of *D. reticulatus* affect the spirochetes of *Borrelia garinii* *in vitro*. Both extracts affect the motility of the spirochetes, and the salivary gland extract altered the morphology of the *Borrelia* (Rudolf and Hubálek, 2003). These results indicate a potential regulatory mechanism that may be at play in the interaction between the tick host and the pathogen. Other studies indicate that the Def2 isoform has a greater potential to inhibit and kill microorganisms than Def1 (Wu et al., 2022). In our study, there are no significant differences between *def1* and *def2* expression. Questing ticks in which the presence of *Rickettsia* spp. and *A. phagocytophilum* was detected, we observed that *def2* is more strongly expressed than *def1*. We observed increased expression of the defensin gene in *I. ricinus* engorged ticks compared to questing ticks. The results of the experiment indicate a higher expression of defensin genes in ticks that are actively feeding and engorged. Zhou et al. (2007) shows that the expression of tick defensins is increased when non-infected blood is ingested. This can be explained by the fact that since blood ingestion correlates with pathogen invasion, so that feeding may serve as an inductive factor for the expression of tick defence proteins even before the actual infection begins (Chrudimská et al., 2011). We found significant differences in the expression of *defDr* and *def1* in ticks harbouring one or more pathogens, with a further enhancement of this expression noted in ticks with confirmed co-infections. Expression of *def1* and *def2* genes in *I. ricinus* was induced by pathogen infection and blood feeding environment (Chrudimská et al., 2011). It remains speculative whether defensins could play a role in blood digestion. Chrudimská et al. (2011) show that both *def1* and *def2* genes are able to readily lyse erythrocytes up to a concentration of 12.5 µM. According to these authors, a more likely explanation for the upregulation of defensin gene expression after blood intake is the activation of the immune system in response to the simultaneous ingestion of pathogens and blood meal. During feeding, ticks are naturally exposed to the host's blood environment, which may contain infectious pathogens. Activation of the tick's innate immune system is necessary for successful defence against potential invading pathogens and consequently for completion of blood ingestion and the life cycle. Defensins are induced by many stimuli as part of the innate immunity pathway. They are mainly upregulated in the midgut as a consequence of blood feeding (Nakajima et al., 2001, 2002; Saito et al., 2009; Tsuji et al., 2007). Interestingly, we can observe a tendency to decrease *defDr* expression in infected *D. reticulatus* when the ticks are engorged with blood. This could be related to different mechanisms of regulation of defensin gene expression in both tick species during blood ingestion, combined with the fact that ticks express variety of defensins with different functions. One of the limitations of the present study relates to the low prevalence of *A. phagocytophilum* and especially *Babesia* spp. The

limited number of positive samples could lead to biases masking possible differences in the expression of the studied genes. Therefore, we performed a statistical analysis consisting of 10 or more individuals per condition. Additional studies with a larger sample size are needed to clarify the effect of these pathogens on defensin expression. A further limitation of the study was that only gene expression was tested, which does not necessarily correspond to protein expression, the pathogen was only detected by PCR and no secondary diagnostic tests were used.

The incidence of various tick-borne diseases is increasing every year, probably due in part to the expansion of the geographical range of these arachnids and the pathogens they transmit. These diseases are often the cause of chronic and troublesome symptoms that can lead to permanent health damage and, in the most severe cases, may result in the death of animals and humans. Understanding the relationship between host, tick and pathogen is therefore crucial for protection. The present results show changes in the expression profiles of defensin genes during infection and thus indirectly indicate the important role of defensins in the innate immune response of ticks and in the interactions between ticks and pathogens.

6. Conclusion

The study confirmed the hypothesis that the expression of defensin genes in ticks collected in natural environments is influenced by the presence of various pathogens and/or blood meals. It has also been observed that the simultaneous presence of several pathogens enhances the expression of defensin genes in the tick body. The present study supports the involvement of defensins in the innate immune response of ticks. Here, the burden of infection was not assessed, limiting the analysis of possible correlations with changes in gene expression. Since ticks usually produce several defensins, each of which plays a specific role that differs in their expression level, tissue distribution and efficacy against different pathogens, other defensins should also be investigated. Understanding the function and regulation of tick defensins is an important part of elucidating the mechanisms underlying tick fitness and vector competency. Exploring their potential could provide new strategies to combat tick-borne diseases and reduce their impact on public health.

Funding

This research was supported by the Science Development Fund of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland [No.12.610.012-110].

Ethical approval

The ticks were removed from the dogs' skin by veterinarians in accordance with standard procedures when removing animals from the intervention in compliance with all animal welfare standards and served to protect the dogs' health, while the ticks were a by-product of these activities and were normally disposed of. The manuscript complies with the standards currently in force in Poland. The study does not contain any factors requiring ethics committee approval.

CRediT authorship contribution statement

Magdalena Szczotko: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Methodology, Investigation, Conceptualization. Sandra Antunes: Writing – review & editing, Supervision. Ana Domingos: Writing – review & editing, Supervision. Katarzyna Kubiak: Writing – review & editing, Methodology. Małgorzata Dmityjuk: Writing – review & editing, Validation, Supervision, Methodology, Conceptualization.

M. Szczotko et al.

Developmental and Comparative Immunology 150 (2024) 105231

Declaration of competing interest

The authors declare no competing interests.

Data availability

All data are included in the article and in the supplementary materials

Acknowledgments

Authors would like to thank to Fundação para a Ciência e a Tecnologia for funds to GHTM - UID/04413/2020 and LA-REAL - LA/P/0117/2020.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.dci.2024.105231>.

References

- Arz, C., Król, N., Inhoff, C., Jeske, K., Rentería-Solís, Z., Ulrich, R.G., Jacob, J., Pfeiffer, M., Obiegala, A., 2023. Spotted fever group rickettsiae in ticks and small mammals from grassland and forest habitats in Central Germany. *Pathogens* 12, 1–18. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070933>.
- Blasek, W.C., Piesman, J., 1994. Phylogeny of hard and soft tick taxa (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10034–10038.
- Boulanger, N., Wilc, S., 2021. Induced transient immune tolerance in ticks and vertebrate host: a keystone of tick-borne diseases? *Front. Immunol.* 12, 625993. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.625993>.
- Casati, S., Sager, H., Gern, L., Piffaretti, J., 2006. Presence of potentially pathogenic *Babesia* sp. for human in *Ixodes ricinus* in Switzerland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 13, 65–70.
- Cerná, 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. *Infect. Immun.* 75, 1973–1983. <https://doi.org/10.1128/IAI.01815-06>.
- Chrudimská, T., Čerovský, V., Slaninová, J., Rego, R.O.M., Grubhoffer, L., 2014. Defensin from the ornate sheep tick *Dermacentor marginatus* and its effect on Lyme borreliosis spirochetes. *Dev. Comp. Immunol.* 46, 165–170. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.04.005>.
- Chrudimská, T., Chudimský, T., Golovchenko, M., Rudenko, N., Grubhoffer, L., 2010. New defensins from hard and soft ticks: similarities, differences, and phylogenetic analyses. *Vet. Parasitol.* 167, 298–303. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.032>.
- Chrudimská, T., Slaninová, J., Rudenko, N., Růžek, D., Grubhoffer, L., 2011. Functional characterization of two defensin isoforms of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasites Vectors* 4, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-63>.
- Demaerschalck, L., Ben Messaoud, A., De Kesel, M., Hoyois, B., Lobet, Y., Hoel, P., Bigaignon, G., Bollen, A., Godfried, E., 1995. Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J. Clin. Microbiol.* 33, 602–608. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.3.602-608.1995>.
- Dumler, J.S., Barber, A.T., Bekker, C.P.J., Dasch, G.A., Palmer, G.L., Ray, S.C., Riddhisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Anaplasma*, descriptions of six new species comb. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 2145–2165. <https://doi.org/10.1099/00207173-51-6-2145>.
- Eisen, L., 2020. Vector competence studies with hard ticks and *Borrelia burgdorferi* sensu lato spirochetes: a review. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 11, 101359. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101359>.
- Espada, C., Cummings, L., Gonzales, J.A., Natto, L., Gaff, H.D., 2021. A comparison of tick collection materials and methods in southeastern Virginia. *J. Med. Entomol.* 58 (2), 692–698. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa207>. PMID: 33017464; PMCID: PMC7954099.
- Estrada-Peña, A., Farkas, R., Jaenson, T.G.T., Koenen, F., Madder, M., Piscucci, I., Schwan, M., Tarrés Coll, J., Jongejans, F., 2013. Association of environmental traits with the geographic ranges of ticks (Acari: Ixodidae) of medical and veterinary importance in the western Palearctic. A digital data set. *Exp. Appl. Acarol.* 59, 351–366. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9600-7>.
- Fogaça, A.C., Sousa, G., Pavaneto, D.B., Esteves, E., Martins, L.A., Urbanová, V., Kopáček, P., 2021. Tick immune system: what is known, the interconnections, the gaps, and the challenges. *Dafre S Front. Immunol.* 12, 628054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.628054>. Mar 2.
- Gandy, S., Hanford, K., McGinley, L., Cull, B., Smith, R., Semper, A., Brooks, T., Fonville, M., Sprong, H., Platts, P., Jolani, N., Medlock, J.M., 2022. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* nymphs across twenty recreational areas in England and Wales. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 13, 101965. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101965>.
- Hajdúšek, O., Šims, R., Ayllón, N., Jalovecká, M., Pernier, J., de la Fuente, J., Kopáček, P., 2013. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00026>.
- Johns, R., Ohnishi, J., Broadwater, A., Sonenshine, D.E., De Silva, A.M., Hynes, W.L., 2001a. Contrasts in tick innate immune responses to *Borrelia burgdorferi* challenge: immunotolerance in *Ixodes scapularis* versus immunocompetence in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 38, 99–107. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.1.99>.
- Johns, R., Sonenshine, D.E., Hynes, W.L., 2001b. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 857–865. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00031-5).
- Kubiak, K., Sicińska, H., Dziekońska-Rynko, J., Kubiak, D., Rydzewska, M., Dzika, E., 2018. *Dermacentor reticulatus* ticks (Acari: Ixodidae) distribution in north-eastern Poland: an endemic area of tick-borne diseases. *Exp. Appl. Acarol.* 75, 289–298. <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0274-7>.
- Kubiak, K., Szymańska, H., Dmityjuk, M., Dzika, E., 2022. Abundance of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) and the diversity of *Borrelia* species in northeastern Poland. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 19, 19127378. <https://doi.org/10.3390/ijerph19127378>.
- Kubiak, K., Szymańska, H., Dziekońska-Rynko, J., Tykowska, A., Dmityjuk, M., Dzika, E., 2024. Tick-borne pathogens in questing adults *Dermacentor reticulatus* from the Eastern European population (north-eastern Poland). *Sci. Rep.* 14, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51299-x>.
- Larsson, C., Hvidsten, D., Stuen, S., Henningsson, A.J., Willehnsson, P., 2018. "Candidatus *Neorhlichia mikurensis*" in *Ixodes ricinus* ticks collected near the Arctic Circle in Norway. *Parasites Vectors* 11, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3168-y>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Massung, R.F., Slater, K., Owens, J.H., Nicholson, W.L., Mather, T.N., Solberg, V.B., Olson, J.G., 1998. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *J. Clin. Microbiol.* 36, 1090–1095. <https://doi.org/10.1128/jcm.36.4.1090-1095.1998>.
- Michalski, M.M., Kubiak, K., Szczotko, M., Chajęcka, M., Dmityjuk, M., 2020. Molecular detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks collected from dogs in urban areas of North-Eastern Poland. *Pathogens* 9, 1–11. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060455>.
- Mierzejewska, E.J., Dymczuk, D., Bajer, A., 2018. Molecular study of transovarial transmission of *Babesia canis* in the *Dermacentor reticulatus* tick. *Ann. Agric. Environ. Med.* 25, 669–671. <https://doi.org/10.26444/eaem/94673>.
- Nakajima, Y., Van der Goes van Naters-Yasui, A., Taylor, D., Yamakawa, M., 2002. Antimicrobial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros monticola*. *Insect Mol. Biol.* 11, 611–618. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00372.x>.
- Nakajima, Y., Van Naters-Yasui, A., van der G., Taylor, D.M., Yamakawa, M., 2001. Two isoforms of a member of the arthropod defensin family from the soft tick, *Ornithodoros monticola* (Acari: argasidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 747–751. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00066-2](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00066-2).
- Nowak Chmura, M., 2013. Fauna Kleszczy (Ixodidae) Europy Środkowej. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Pedagogicznego, Kraków.
- Nowak Chmura, M., Stoda, K., 2012. Ticks of Poland. Review of contemporary issues and latest research. *Ann. Parasitol.* 58, 125–155.
- Pernier, J., Kopáček, P., Kopáček, P., Rihisto, J.M.C., 2018. Salivary diversity of ticks revealed by RNAseq of single tick salivary glands. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 12, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006410>.
- Piesman, J., Sinsky, R.J., 1988. Ability of *Ixodes scapularis*, *Dermacentor variabilis*, and *Anopheles americanus* (Acari: Ixodidae) to acquire, maintain, and transmit Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). *J. Med. Entomol.* 25, 336–339. <https://doi.org/10.1093/jmedent/25.5.336>.
- Piotrowski, M., Rymaszewska, A., 2020. Expansion of tick-borne rickettsioses in the world. *Microorganisms* 8, 1–28. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121906>.
- Quarsten, H., Henningsson, A., Krogfelt, K., Strube, C., Wennerås, C., Mavin, S., 2023. Tick-borne diseases under the radar in the north sea region. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 14, 102185. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102185>.
- Ravindran, R., Hembram, P.K., Kumar, G.S., Kumar, K.G.A., Deepa, C.K., Varghese, A., 2023. Transovarial transmission of pathogenic protozoa and rickettsial organisms in ticks. *Parasitol. Res.* 122, 691–704. <https://doi.org/10.1007/s00436-023-07792-9>.
- Richter, D., Matsushita, F.R., 2012. "Candidatus *Neorhlichia mikurensis*," *Anaplasma phagocytophilum*, and Lyme Disease spirochetes in questing European vector ticks and in feeding ticks removed from people. *J. Clin. Microbiol.* 50, 943–947. <https://doi.org/10.1128/JCM.05802.11>.
- Roux, V., Rydzina, E., Ereemeeva, M., Raoult, D., 1997. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 252–261. <https://doi.org/10.1099/00207173-47-2-252>.
- Rubel, F., Brugger, K., Belova, O.A., Kholodilov, L.S., Didiyk, Y.M., Kurzrock, L., García-Pérez, A.L., Kahl, O., 2020. Vectors of disease at the northern distribution limit of the genus *Dermacentor* in Eurasia: *D. reticulatus* and *D. silvarum*. *Exp. Appl. Acarol.* 82, 95–123. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00533-y>.
- Rubel, F., Brugger, K., Pfeiffer, M., Chitima Dobler, L., Didiyk, Y.M., Leverenz, S., Dautel, H., Kahl, O., 2016. Geographical distribution of *Dermacentor marginatus* and *dermacentor reticulatus* in Europe. *Ticks tick. Borne. Dis.* 7, 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.10.015>.
- 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. *J. Med. Entomol.* 42, 36–41. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.1.36>.

- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., 2007. Gene organization of a novel defensin gene and first evidence of the occurrence of two isoforms of one member of the arthropod defensin family. *Insect Mol. Biol.* 16, 501–507. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00745.x>.
- Rudolf, I., Hubálek, Z., 2003. Effect of the salivary gland and midgut extracts from *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* (Acari: ixodidae) on the growth of *Borrelia garinii* in vitro. *Folia Parasitol.* 50, 159–160. <https://doi.org/10.14411/fp.2003.029>.
- 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 Mol. Biol.* 18, 531–539. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00697.x>.
- Sandelin, L.L., Tolf, C., Larsson, S., Wilhelmsson, P., Schwaeck, E., Jensen, T.G.T., Lindgren, P.E., Olsen, B., Waldenström, J., 2015. Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* in ticks from migrating birds in Sweden. *PLoS One* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133250>.
- Sands, B., Lihou, K., Lait, P., Wall, R., 2022. Prevalence of *Babesia* spp. pathogens in the ticks *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus* in the UK. *Acta Trop.* 236, 106692. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106692>.
- Shapiro, S., Wilk, M.B., 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52, 591–611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>.
- Somnathine, D.E., Macaluso, K.R., 2017. Microbial invasion vs. Tick immune regulation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 390. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00390>.
- Sprong, H., Azagi, T., Hoornaar, D., et al., 2018. Control of Lyme borreliosis and other *Ixodes ricinus* borne diseases. *Parasites Vectors* 11, 145. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2744-5>.
- Strnad, M., Hönig, V., Ruzek, D., Grubhoffer, L., Ryan, O.M.R., 2017. Europe-wide meta-analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in questing *Ixodes ricinus* ticks. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, 1–16. <https://doi.org/10.1128/AEM.00609.17>.
- Szczotko, M., Kubiak, K., Michalski, M.M., Moerbeck, L., Antunes, S., Domingos, A., Dąbryjka, M., 2023. *Neoehrlichia mikurensis*—a new emerging tick-borne pathogen in north-eastern Poland? *Pathogens* 12. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020307>.
- Taylor, D., 2006. Innate immunity in ticks: a review. *J. Acarol. Soc. Japan* 15, 109–127. <https://doi.org/10.2300/acari.15.109>.
- Tronk, M., Cabezas-Cruz, A., Valdés, J.J., Rego, R.O.M., Rudenko, N., Golovchenko, M., Bell-Sekyi, L., De la Fuente, J., Grubhoffer, L., 2014. Identification and partial characterisation of new members of the *Ixodes ricinus* defensin family. *Gene* 540, 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.03.002>.
- Tsuji, N., Bartsberg, B., Boldbaatar, D., Miyoshi, T., Xuan, X., Oliver, J.H., Fujisaki, K., 2007. Babesial vector tick defensin against *Babesia* spp. parasites. *Infect. Immun.* 75, 3633–3640. <https://doi.org/10.1128/IAI.00256-07>.
- Veech, J.A., 2013. Probabilistic model. *Global Ecol. Biogeogr.* 22, 252–260. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2012.00789.x>.
- Wang, Y., Zhu, S., 2011. The defensin gene family expansion in the tick *Ixodes scapularis*. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 1128–1134. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.03.030>.
- 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. *Infect. Dis. Poverty*. <https://doi.org/10.1186/s40249-022-00996-8>.
- Zajac, Z., Obregon, D., Foucault-Simonin, A., Wu-Chuang, A., Moutailler, S., Galon, C., Kulisz, J., Wozniak, A., Bartosik, K., Cabezas-Cruz, A., 2023. Disparate dynamics of pathogen prevalence in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks occurring sympatrically in diverse habitats. *Sci. Rep.* 13, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37748-z>.
- Zhou, J., Liao, M., Ueda, M., Gong, H., Xuan, X., Fujisaki, K., 2007. Sequence characterization and expression patterns of two defensin-like antimicrobial peptides from the tick *Hannaplysia longicornis*. *Papilio* 28, 1304–1310. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.04.019>.
- Zhou, X., Zhou, M., Huang, D., Cui, L., 2022. A probabilistic model for co-occurrence analysis in bibliometrics. *Appl. J. Biomed. Inf.* 128, 104047. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2022.104047>. Epub 2022 Mar 4. PMID: 35257868.

Supplementary Materials

Table S1. Prevalence of *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* and *N. mikurensis* in questing ticks

Tick species	sex	<i>Borrelia</i> spp. No. %, (95% CI)	<i>Rickettsia</i> spp. No. %, (95% CI)	<i>Babesia</i> spp. No. %, (95% CI)	<i>A. phagocytophilum</i> No. %, (95% CI)	<i>N. mikurensis</i> No. %, (95% CI)
<i>I. ricinus</i>	F	12/61 19.7 (10.6–31.8)	16/61 26.2 (15.8–39.1)	1/61 1.6 (0.04–8.8)	0/61 0 (0.0–0.0)	11/61 18.0 (9.4–30.0)
	M	3/45 6.7 (1.4–18.3)	20/45 44.4 (29.6–60.0)	1/45 2.2 (0.06–11.8)	6/45 13.3 (5.1–26.8)	4/45 8.9 (2.5–21.2)
	N	7/23 30.4 (13.2–52.9)	6/23 26.1 (10.2–48.4)	0/23 0 (0.0–0.0)	4/23 17.4 (4.9–38.8)	2/23 8.7 (1.1–28.0)
Subtotal		22/129 17.1 (11.0–24.7)	42/129 32.6 (24.6–41.4)	2/129 1.6 (0.2–5.5)	10/129 7.8 (3.8–13.8)	17/129 13.2 (7.9–20.3)
<i>D. reticulatus</i>	F	14/44 31.8 (18.6–47.6)	11/44 25.0 (13.2–40.3)	0/44 0 (0.0–0.0)	9/44 20.5 (9.8–35.3)	4/44 9.1 (2.5–21.7)
	M	8/52 15.4 (6.9–28.1)	22/52 42.3 (28.7–56.8)	2/52 3.9 (0.5–13.2)	3/52 5.8 (1.2–16.0)	10/52 19.2 (9.6–32.5)
	N	7/23 30.4 (13.2–52.9)	6/23 26.1 (10.2–48.4)	0/23 0 (0.0–0.0)	4/23 17.4 (4.9–38.8)	2/23 8.7 (1.1–28.0)
Subtotal		22/96 22.9 (15.0–32.6)	33/96 34.4 (25.0–44.8)	2/96 2.1 (0.3–7.3)	12/96 12.5 (6.6–20.8)	14/96 14.6 (8.2–23.3)
Total		44/225 19.6 (14.6–25.4)	75/225 33.3 (27.2–39.9)	4/225 1.8 (0.5–5.5)	22/225 9.8 (6.2–14.4)	31/225 13.8 (9.6–19.1)

Table S2. Prevalence of *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *Babesia* spp., *A. phagocytophilum* and *N. mikurensis* in ticks collected from dogs.

Tick species	sex	<i>Borrelia</i> spp. No. %, (95% CI)	<i>Rickettsia</i> spp. No. %, (95% CI)	<i>Babesia</i> spp. No. %, (95% CI)	<i>A. phagocytophilum</i> No. %, (95% CI)	<i>N. mikurensis</i> No. %, (95% CI)
<i>I. ricinus</i>	F	5/77 6.5 (2.14–14.5)	32/77 41.6 (30.43–53.4)	3/77 3.9 (0.8–11.0)	2/77 2.6 (3.2–9.1)	14/77 18.2 (10.31–28.6)
	M	1/7 14.3 (0.4–57.9)	4/7 44.4 (29.6–60.0)	0/7 0 (0.0–0.0)	0/7 0 (0.0–0.0)	2/7 28.6 (3.7–71.0)
	N	7/23 30.4 (13.2–52.9)	6/23 26.1 (10.2–48.4)	0/23 0 (0.0–0.0)	4/23 17.4 (4.9–38.8)	2/23 8.7 (1.1–28.0)
Subtotal		6/84 7.1 (2.7–14.9)	36/84 42.9 (32.1–54.1)	3/84 3.6 (0.7–10.8)	2/84 2.4 (0.3–8.3)	16/84 19.1 (11.3–29.1)
<i>D. reticulatus</i>	F	13/104 12.5 (6.8–20.43)	31/104 29.8 (21.2–39.6)	2/104 1.9 (0.2–6.8)	0/104 0 (0.0–0.0)	4/104 3.9 (1.1–9.6)
	M	3/15 20.0 (4.3–48.1)	8/15 53.3 (26.6–78.7)	0/15 0 (0.0–0.0)	0/15 0 (0.0–0.0)	5/15 33.3 (11.8–61.6)
	N	7/23 30.4 (13.2–52.9)	6/23 26.1 (10.2–48.4)	0/23 0 (0.0–0.0)	4/23 17.4 (4.9–38.8)	2/23 8.7 (1.1–28.0)
Subtotal		16/119 13.5 (7.9–20.9)	39/119 32.8 (24.5–42.0)	2/119 1.7 (0.2–5.9)	0/119 0 (0.0–0.0)	9/119 7.6 (3.5–13.9)
Total		22/203 10.8 (6.9–15.9)	75/203 36.9 (30.3–44.0)	5/203 2.5 (0.8–5.7)	2/203 0.99 (0.0012–3.5)	25/203 12.3 (8.1–17.6)

Table S3. Monoinfection rates of questing and engorged ticks removed from dogs living in shelters north-eastern Poland, with the pathogens of the genera *Borrelia*, *Babesia*, *Rickettsia*, *Anaplasma* and *Neoehrlichia*.

		Monoinfections				
		No.				
		% (95% CI)				
Tick species ¹		<i>Borrelia</i> spp.	<i>Babesia</i> spp.	<i>Rickettsia</i> spp.	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>N. mikurensis</i>
Questing ticks	<i>Ir</i>	8/43 18.6 (8.4–33.4)	0/43 0.0 (0.0–8.2)	23/43 53.5 (37.7–68.8)	0/43 0.0 (0.0–8.2)	13/43 30.2 (17.2–46.1)
	<i>Dr</i>	4/23 17.4 (5.0–38.8)	0/23 0.0 (0.0–14.8)	13/23 56.5 (34.5–76.8)	2/23 8.7 (1.1–18.0)	4/23 17.4 (5.0–38.8)
	Subtotal	12/66 18.2 (9.8–29.6)	0/66 0.0 (0.0–14.8)	36/66 54.6 (41.8–66.9)	2/66 3.0 (0.4–10.5)	17/66 25.8 (15.8–38.0)
Engorged ticks	<i>Ir</i>	1/26 3.9 (0.1–19.6)	2/26 7.7 (0.9–25.1)	19/26 73.1 (52.2–88.4)	0/26 0.0 (0.0–13.2)	4/26 15.4 (4.4–34.9)
	<i>Dr</i>	12/51 23.53 (12.8–37.5)	2/51 3.9 (0.5–13.5)	31/51 60.8 (46.1–74.2)	0/51 0.0 (0.0–7.0)	5/51 9.8 (3.3–21.4)
	Subtotal	13/77 16.9 (9.3–27.1)	4/77 5.2 (1.4–12.8)	50/77 64.9 (53.2–75.5)	0/77 0.0 (0.0–4.7)	9/77 11.7 (5.5–21.0)
Total		25/143 17.5 (11.6–24.7)	4/143 2.8 (0.8–7.0)	86/143 60.1 (51.6–68.2)	2/143 1.4 (0.2–5.0)	26/143 18.2 (12.2–25.5)

¹ *Ir*- *Ixodes ricinus*, *Dr*- *Dermacentor reticulatus*

Table S4. Co-infection rates of questing and feeding ticks removed from dogs living in shelters in north-eastern Poland, with the pathogens of the genera *Borrelia*, *Babesia*, *Rickettsia*, *Anaplasma* and *Neoehrlichia*.

Co-infections No. % (95% CI)													
Tick species ¹	R/N	B/N	B/R	R/A	B/A	A/N	Bab/R	Bab/N	B/R/N	B/R/A	Bab/B/R	B/R/A/N	
Questing ticks	Ir	3/23 13.0 (2.8-33.6)	0/23 0.0 (0.0-14.8)	8/23 34.8 (16.4-57.3)	4/23 17.4 (4.9-38.8)	3/23 13.0 (2.8-33.6)	0/23 0.0 (0.0-14.8)	1/23 4.4 (0.1-22.0)	1/23 4.4 (0.1-22.0)	0/23 0.0 (0.0-14.8)	3/23 13.0 (2.8-33.6)	0/23 0.0 (0.0-14.8)	0/23 0.0 (0.0-14.8)
	Dr	3/24 12.5 (2.7-32.4)	1/24 4.2 (0.1-21.1)	5/24 20.8 (7.1-42.2)	1/24 4.2 (0.1-21.1)	2/24 8.3 (1.0-27.0)	1/24 4.2 (0.1-21.1)	1/24 4.2 (0.1-21.1)	0/24 0.0 (0.0-7.6)	3/24 12.5 (2.7-32.4)	4/24 8.5 (2.4-20.4)	1/24 4.2 (0.1-21.1)	2/24 8.3 (1.0-27.0)
Subtotal	6/47 12.8 (4.8-25.7)	1/47 2.1 (0.05-11.3)	13/47 27.7 (15.6-42.6)	5/47 10.6 (3.6-23.1)	5/47 10.6 (3.6-23.1)	1/47 2.1 (0.05-11.3)	2/47 4.3 (0.5-14.5)	1/47 2.1 (0.05-11.3)	3/47 6.4 (1.3-17.5)	7/47 14.9 (6.2-28.3)	1/47 2.1 (0.05-11.3)	2/47 4.3 (0.5-14.5)	
Engorged ticks	Ir	10/16 62.5 (35.4-84.8)	2/16 12.5 (1.6-38.4)	2/16 12.5 (1.6-38.4)	2/16 12.5 (1.6-38.4)	0/16 0.0 (0.0-20.6)	0/16 0.0 (0.0-20.6)	0/16 0.0 (0.0-20.6)	0/16 0.0 (0.0-20.6)	0/16 0.0 (0.0-20.6)	0/16 0.0 (0.0-20.6)	0/16 0.0 (0.0-20.6)	0/16 0.0 (0.0-20.6)
	Dr	4/10 40.0 (12.2-73.8)	0/10 0.0 (0.0-30.9)	5/10 50 (18.7-81.3)	0/10 0.0 (0.0-30.9)	0/10 0.0 (0.0-30.9)	0/10 0.0 (0.0-30.9)	1/10 10 (0.3-44.5)	0/10 0.0 (0.0-30.9)	0/10 0.0 (0.0-30.9)	0/10 0.0 (0.0-30.9)	0/10 0.0 (0.0-30.9)	0/10 0.0 (0.0-30.9)
Subtotal	14/26 53.9 (33.4-73.4)	2/26 7.7 (0.9-25.1)	7/26 26.9 (11.6-47.8)	2/26 7.7 (0.9-25.1)	0/26 13.2 (0.0-13.2)	0/26 13.2 (0.0-13.2)	1/26 3.9 (0.1-19.6)	0/26 13.2 (0.0-13.2)	0/26 13.2 (0.0-13.2)	0/26 13.2 (0.0-13.2)	0/26 13.2 (0.0-13.2)	0/26 13.2 (0.0-13.2)	0/26 13.2 (0.0-13.2)
Total	20/73 27.4 (17.6-39.1)	3/73 4.1 (0.9-11.5)	20/73 27.4 (17.6-39.1)	7/73 9.6 (3.9-18.8)	5/73 6.9 (2.3-15.3)	1/73 1.4 (0.03-7.4)	3/73 4.1 (0.9-11.5)	1/73 1.4 (0.03-7.4)	3/73 4.1 (0.9-11.5)	7/73 9.6 (3.9-18.8)	1/73 1.4 (0.03-7.4)	2/73 2.7 (0.3-9.6)	

¹ Ir- *Ixodes ricinus*, Dr- *Dermacentor reticulatus*; ² A- *Anaplasma phagocytophilum*, R- *Rickettsia* spp., B- *Borrelia* spp., Bab- *Babesia* spp., N - *Neoehrlichia mikurensis*

Sequencing data

Sample No 25 *Anaplasma phagocytophilum*, 16S ribosomal RNA gene, *I. ricinus* male questing tick:

>Consensus

TTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTG
GGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGT
TGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGA
ACTGAGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTG
ATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAACTCTTTCAGTAGGGAAGATAATGA
CGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGGGCAAGC
GTTGTTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTCCGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGC
TTAACCTGGAGCTG

ID: FP1X9VZ3013

Job Title: Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: lcl|Query_55099(dna) Length: 496

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> isolate Moose_3var 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	MT221234.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	496/496 (100%)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> isolate H-GN-20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	MH794246.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	496/496 (100%)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> isolate GV1104 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	MK341076.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	496/496 (100%)

Sample No 28 *Anaplasma phagocytophilum*, 16S ribosomal RNA gene, *I. ricinus* male questing tick:

>Consensus

GCTATGAAGAATAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGGGATAGCC
ACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGAGCCTATG
TTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAGGATGATC
AGCCACACTGGAAGTACGATACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATG
GGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAACTCTTTCAGTA
GGGAAGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
GAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTCCGTAAGTTAAAGGT
GAAATGCCAGGGCTTAACCCTGGA

RID: FP3G8C6D013

Job Title: Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: lcl|Query_54195(dna) Length: 506

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> isolate GV898 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	MK341075.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	506/506 (100%)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> isolate 42027-181 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KY404197.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	506/506 (100%)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> isolate 241 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	ON614171.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	506/506 (100%)

Sample No 76 *Anaplasma phagocytophilum*, 16S ribosomal RNA gene, *I. ricinus* female engorged tick:

>Consensus

ATAGCTTGCTATAAAGAATAATTAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTACCTAGTAGTATGG
GATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGGAAAGATTTATCGCTATTAGATGA
GCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCTATAGCTGGTCTGAGAG
GATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGTACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
GACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTAAACTCT
TTCAGTAGGGAAGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTCGGTAAGTT
AAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCT

RID: FP48F3ZX016

Job Title:Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: lcl|Query_17905(dna) Length: 516

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> isolate MR-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KP276588.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	516/516 (100%)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> isolate 42027-181 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	MW800889.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	516/516 (100%)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> isolate Ir287d 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JN181071.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	516/516 (100%)

Sample No 33 *Anaplasma phagocytophilum*, 16S ribosomal RNA gene, *D. reticulatus* female engorged tick:

>Consensus

TAGTATGGGATAGCCACTAGAAATGGTGGGTAATACTGTATAATCCCTGCGGGGGAAAGATTTATCGCTA
TTAGATGAGCCTATGTTAGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGATGATCTATAGCTGG
TCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGTACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG
GAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCTATGCCGCGTGAGTGAGGAAGGCCTTAGGGTTGTA
AAACTCTTTAGTAGGGAAGATAATGACGGTACCTACAGAAGAAGTCCCGGCAAACTCCGTGCCAGCA
GCCGCGGTAATACGGAGGGGGCAAGCGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTC
GGTAAGTTAAAGGTGAAATGCCAGGGCTTAACCTGGAGCTGCTTT

RID: FP5EZVHT013

Job Title:Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: lcl|Query_62621(dna) Length: 459

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> isolate D-GB-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	MK239931.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	459/459 (100%)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> isolate H-GN-20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	MH794246.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	459/459 (100%)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> isolate V40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	MN170722.1	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	459/459 (100%)

Sample No 188 *Rickettsia* spp., citrate synthase (gltA) gene, *I. ricinus* female questing tick:

>Consensus

TGCTTGCGGCTGTTGGTTCTCTTTCGGCATTTCCTGATTATTGAATTGTAAGGAAGCAGACTACAA
ACTTACTGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCTACCATCGCCGCAATGTCTTATAAATATTCTATAGGAC
AACCGTTTATTTATCCTGATAATTCGTTAGATTTTACCGAAAAATTTCTGCATATGATGTTTGCAACGCCTT
GTACGAAATATAAAGTAAATCCAATAAAAAAATGCTCTTAATAAGATATTTATCCTACATGCCGATCAT
GAGCAGAATGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCTGGAGCTAACCCCTTTGCTTGTAATTA
GTACGGGTATTGCATCACTTTGGGGACCTGCTCACGGTGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAA
AGAAATTGGTAGTTCTGAGAATATCCCTAAATATATAGCTAAAGCTAAGGATAAAAAATGATCCGTTTAGG
TTAATAGGCTTCGGTCATCGTGTATATAAAAACTACGATCCACGTGCCGCAGTACTTAAAGAACTTGTA
AGGAAGTATTAAAGGAACTCGGACAGCTAGAAAAACAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAACTTGAA
GCTATCGTCTTAAAGATGAATATTTATTGAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTATTCGGGTATT
ATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC

RID: FNSBU395013

Job Title: Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: lcl|Query_32959(dna) Length: 732

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Rickettsia helvetica</i> strain Bel-24-28 citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, partial cds	MH618386.1	<i>Rickettsia helvetica</i>	732/732 (100%)
<i>Rickettsia helvetica</i> citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, complete cds	KU310588.1	<i>Rickettsia helvetica</i>	732/732 (100%)
<i>Rickettsia helvetica</i> isolate Om-74_lapr_m citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, partial cds	OQ866615.1	<i>Rickettsia helvetica</i>	732/732 (100%)

Sample No 119 *Rickettsia* spp., citrate synthase (*gltA*) gene, *I. ricinus* male questing tick:

>Consensus

TTATGCTTGCGGCTGTTGGTTCTCTTTCGGCATTTCCTGATTATTGAATTGTAAGGAAGCAGACTAC
AAACTTACTGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCTACCATCGCCGCAATGTCTTATAAATATTCTATAGG
ACAACCGTTTATTTATCCTGATAATTCGTTAGATTTTACCGAAAAATTTCTGCATATGATGTTTGCAACGC
CTTGACGAAATATAAAGTAAATCCAATAAAAAAATGCTCTTAATAAGATATTTATCCTACATGCCGAT
CATGAGCAGAATGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCTGGAGCTAACCCCTTTGCTTGTA
TTAGTACGGGTATTGCATCACTTTGGGGACCTGCTCACGGTGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAATATGCT
TAAAGAAATTGGTAGTTCTGAGAATATCCCTAAATATATAGCTAAAGCTAAGGATAAAAAATGATCCGTTT
AGGTTAATAGGCTTCGGTCATCGTGTATATAAAAACTACGATCCACGTGCCGCAGTACTTAAAGAACTT
GTAAGGAAGTATTAAAGGAACTCGGACAGCTAGAAAAACAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAACTT
GAAGCTATCGTCTTAAAGATGAATATTTATTGAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTATTCGGG
TATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAATGTTTCAC

RID: FNTS7M81013

Job Title: Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: lcl|Query_27445(dna) Length: 745

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Rickettsia helvetica</i> strain Bel-24-28 citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, partial cds	MH618386.1	<i>Rickettsia helvetica</i>	745/745 (100%)
<i>Rickettsia helvetica</i> clone 185Skh citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, partial cds	KT825961.1	<i>Rickettsia helvetica</i>	745/745 (100%)
<i>Rickettsia helvetica</i> C9P9 citrate synthase (<i>gltA</i>) gene, partial cds	U59723.1	<i>Rickettsia helvetica</i> C9P9	745/745 (100%)

Sample No 142 *Rickettsia* spp., citrate synthase (gltA) gene, *I. ricinus* male engorged tick:

>Consensus

GCTTGGCGCTGTTGGTTCTCTTTTCGGCATTTTATCCTGATTATTGAATTGTAAGGAAGCAGACTACAAA
CTTACTGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCTACCATCGCCGCAATGTCTTATAAATATTCTATAGGACA
ACCGTTTATTATCCTGATAATTCGTTAGATTTTACCGAAAAATTTCTGCATATGATGTTTGCAACGCCTTG
TACGAAATATAAAGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAGATATTTATCCTACATGCCGATCATG
AGCAGAATGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCTGGAGCTAACCCCTTTTGCTTGATTAG
TACGGGTATTGCATCATTGTTGGGACCTGCTCACGGTGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAA
GAAATTGGTAGTTCTGAGAATATCCCTAAATATATAGCTAAAGCTAAGGATAAAAAATGATCCGTTTAGGTT
AATAGGCTTCGGTCATCGTGTATATAAAAACTACGATCCACGTGCCGCAGTACTTAAAGAACTTGTAAG
GAAGTATTAAGGAACCTCGACAGCTAGAAAAACAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAACTTGAAGC
TATCGCTCTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTATTCGGGATTAT
CTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAATGTTCCAC

ID: FNUDPBNW016

Job Title: Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: Icl/Query_3665(dna) Length: 741

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Rickettsia helvetica</i> strain Bel-24-28 citrate synthase (gltA) gene, partial cds	MH618386.1	<i>Rickettsia helvetica</i>	741/741 (100%)
<i>Rickettsia helvetica</i> citrate synthase (gltA) gene, complete cds	KU310588.1	<i>Rickettsia helvetica</i>	741/741 (100%)
<i>Rickettsia helvetica</i> isolate Om-74_lapr_m citrate synthase (gltA) gene, partial cds	OQ866615.1	<i>Rickettsia helvetica</i>	741/741 (100%)

Sample No 57 *Rickettsia* spp., citrate synthase (gltA) gene, *D. reticulatus* female engorged tick:

>Consensus

TATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTTGGTTCTCTTTTCGGCATTTTATCCTGATTATTGAATTGTAAGGAAGC
AGACTACAACTTACTGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCTACCATCGCCGCAATGTCTTATAAATATT
CTATAGGACAACCGTTTATTATCCTGATAATTCGTTAGATTTTACCGAAAAATTTCTGCATATGATGTTTG
CAACGCCTTGTACGAAATATAAAGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAGATATTATCCTACAT
GCCGATCATGAGCAGAATGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCTGGAGCTAACCCCTTTT
GCTTGATTAGTACGGGTATTGCATCATTGTTGGGACCTGCTCACGGTGGGGCTAATGAAGCGGTAATAA
ATATGCTTAAAGAAATTGGTAGTTCTGAGAATATCCCTAAATATATAGCTAAAGCTAAGGATAAAAAATGAT
CCGTTTAGGTTAATAGGCTTCGGTCATCGTGTATATAAAAACTACGATCCACGTGCCGCAGTACTTAAAG
AACTTGTAAGGAAGTATTAAAGGAACCTCGACAGCTAGAAAAACAATCCGCTCTTACAAATAGCAATA
GAAGTTGAAGCTATCGCTCTT

RID: FNV5BNH201R

Job Title: Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: Icl/Query_50141(dna) Length: 655

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Rickettsia helvetica</i> strain Bel-24-28 citrate synthase (gltA) gene, partial cds	MH618386.1	<i>Rickettsia helvetica</i>	655/655 (100%)
<i>Rickettsia helvetica</i> isolate SB-15-2018 citrate synthase (gltA) gene, partial cds	MK156098.1	<i>Rickettsia helvetica</i>	655/655 (100%)
<i>Rickettsia helvetica</i> clone 185Skh citrate synthase (gltA) gene, partial cds	KT825961.1	<i>Rickettsia helvetica</i>	655/655 (100%)

Sample No 59 *Rickettsia* spp., citrate synthase (gltA) gene, *I. ricinus* female engorged tick:

>Consensus

GCTTGGCGGCTGTTGGTTCTCTTCGGCATTTCCTGATTATTGAATTGTAAGGAAGCAGACTACAAA
CTTACTGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCTACCATCGCCGCAATGTCTTATAAATATTCTATAGGACA
ACCGTTTATTTATCTGATAATTCGTTAGATTTTACCGAAAAATTTCTGCATATGATGTTTGCAACGCCTTG
TACGAAATATAAAGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAGATATTTATCCTACATGCCGATCATG
AGCAGAATGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCTGGAGCTAACCCCTTTGCTTGATTAG
TACGGGTATTCATCCTTTGGGGACCTGCTCACGGTGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAA
GAAATTGGTAGTTCTGAGAATATCCCTAAATATATAGCTAAAGCTAAGGATAAAAAATGATCCGTTTAGGTT
AATAGGCTTCGGTCATCGTGTATATAAAAACTACGATCCACGTGCCGCAGTACTTAAAGAACTTGTAAG
GAAGTATTAAAGGAACCTCGGACAGCTAGAAAACAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAAGCTTGAAGC
TATCGCTCTTAAAGATGAATTTTATTGAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTATTCGGGTATTAT
CTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGC

RID: FNVGPCEE016

Job Title:Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: lcl|Query_127731(dna) Length: 731

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Rickettsia helvetica</i> strain Bel-24-28 citrate synthase (gltA) gene, partial cds	MH618386.1	<i>Rickettsia helvetica</i>	731/731 (100%)
<i>Rickettsia helvetica</i> citrate synthase (gltA) gene, complete cds	KU310588.1	<i>Rickettsia helvetica</i>	731/731 (100%)
<i>Rickettsia helvetica</i> clone 185Skh citrate synthase (gltA) gene, partial cds	KT825961.1	<i>Rickettsia helvetica</i>	731/731 (100%)

Sample No 169 *Babesia* spp., 18S ribosomal RNA gene, *I. ricinus* male questing tick:

>Consensus

TCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCTAAACCCTCACCAGAGTAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACCTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAT
TTCTGCGTTATCGAGTTATTGACTCTTGTCTTAAATCGATTTCGCTTTTGGGATTATCCCTTTTACTTTG
AGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGACTTTTGTCTTGAATACCTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTT
TGGTTCATTTTGTGGTTTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTCGATTTAAC
TGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTGTTAAAGACGAACACTACTGCGAAAGCATTGCGCAAGGACGTTTCC
ATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACCATAACTA

RID: FNW8V48Z016

Job Title:Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: lcl|Query_102927(dna) Length: 488

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Babesia</i> sp. <i>venatorum</i> isolate Bab.vNGO small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	OM913494.1	<i>Babesia</i> sp. <i>venatorum</i>	488/488 (100%)
<i>Babesia</i> sp. ' <i>venatorum</i> ' 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	KJ663730.1	<i>Babesia</i> sp. <i>venatorum</i>	488/488 (100%)
<i>Rickettsia helvetica</i> clone 185Skh citrate synthase (gltA) gene, partial cds	MG344777.1	<i>Babesia</i> sp. <i>venatorum</i>	488/488 (100%)

Sample 198 *Babesia* spp., 18S ribosomal RNA gene, *D. reticulatus* female engorged tick:

>Consensus
GGAATGATGGTGACCCAAACCCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTATTTTTCGTTA
GCGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTCGTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTACTTTGAGAAAATTA
GAGTGTTCAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACTTTGGTTCTATT
TTGTTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTTCGTATTTAACTGTCAGAGG
TGAAATCTTAGATTTGTAAAGACGAAGTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTTCCATTAATCAA
GAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAA

ID: FNWTCUU01R

Job Title:Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: lcl|Query_438795(dna) Length: 468

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Babesia canis</i> isolate 59k small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	MN134074.1	<i>Babesia canis</i>	468/468 (100%)
<i>Babesia canis</i> isolate 250k small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	MK872807.1	<i>Babesia canis</i>	468/468 (100%)
<i>Babesia canis</i> isolate 3469 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	KX712122.1	<i>Babesia canis</i>	468/468 (100%)

Sample 132 *Babesia* spp., 18S ribosomal RNA gene, *I. ricinus* female questing tick:

>Consensus
TCTTGTAATTGGAATGATGGTGACCCAAACCCCTCACCAGAGTAGCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAACTTGTTCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGTA
TTTTTCGTTAGCGGTTTGACCATTTGGTTGGTTATTTTCGTTTTCGCTTTTGGGAATTTCCCTTTTACTTT
GAGAAAATTAGAGTGTTCAGCAGACTTTTGTCTTGAATACTTCAGCATGGAATAATAGAGTAGGACT
TTGGTTCTATTTTGTGGTTATTGAACCTTAGTAATGGTTAATAGGAACGGTTGGGGGCATTTCGTATTTAA
CTGTCAGAGGTGAAATCTTAGATTTGTAAAGACGAAGTACTGCGAAAGCATTTGCCAAGGACGTTTC
CATTAATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCCTAACCATAACTA

RID: FNXE13VZ013

Job Title:Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: lcl|Query_27765(dna) Length: 488

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Babesia canis canis</i> clone 20-1A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	MH143391.1	<i>Babesia canis canis</i>	488/488 (100%)
<i>Babesia canis canis</i> isolate IR57 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	KU681325.1	<i>Babesia canis canis</i>	488/488 (100%)
<i>Babesia canis canis</i> isolate Dog-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	KT008057.1	<i>Babesia canis canis</i>	488/488 (100%)

Sample No 26 *Borrelia* spp., outer surface protein A (ospA) gene, *I. ricinus* male questing tick:

>Consensus

TAATAATAGCCTTAATAGCATGCAAGCAAAATGTTAGCAGCCTTGATGAAAAAACAGCGCTTCAGTAG
ATTTGCCTGGTGAGATGAAAGTTCTTGTAAAGTAAAGAAAAAGACAAAGACGGCAAGTACAGTCTAAAG
GCAACAGTAGACAAGATTGAGCTAAAAGGAACTTCTGATAAAGACAATGGTTCTGGAGTGCTTGAAGG
TACAAAAGATGACAAAAGTAAAGCAAAATTAACAATTGCTGACGATCTAAGTAAAACCCATTCTGAAC
TTTTCATGGCAAAACCCCTA

RID: FNYN0U6V016

Job Title: Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: lcl|Query_2443(dna) Length: 294

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Borrelia afzelii</i> strain KP7- Bbsl-Dv-2009 linear plasmid OspA (ospA) gene, partial cds	HQ739053.1	<i>Borrelia afzelii</i>	238/239 (99%)
<i>Borrelia burgdorferi</i> strain ACA1 outer surface protein A (ospA) gene, partial cds	U65818.1	<i>Borrelia burgdorferi</i>	245/246 (99%)
<i>Borrelia afzelii</i> strain KP44- Bb-DV-2009 linear plasmid OspA (ospA) gene, partial cds	HQ739056.1	<i>Borrelia afzelii</i>	239/241 (99%)

Sample No 108 *Borrelia* spp., outer surface protein A (ospA) gene, *I. ricinus* questing nymph:

>Consensus

TTAGCCTTAATAGCATGCAAGCAAAATGTTAGCAGCCTTGATGAAAAAACAGCGCTTCAGTAGATTG
CCTGGTGAGATGAAAGTTCTTGTAAAGTAAAGAAAAAGACAAAGACGGCAAGTACAGTCTAAAGGCAA
CAGTAGACAAGATTGAGCTAAAAGGAACTTCTGATAAAGACAATGGTTCTGGGGTGCTTGAAGGTACA
AAAGATGACAAAAGTAAAGCAAAATTAACAATTGCTGACGATCTAAGTAAAACCATTCGAACCTTTTC
AAA

RID: FNZMU61K016

Job Title: Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: lcl|Query_56461(dna) Length: 276

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Borrelia afzelii</i> strain Bavaria CG 645 Tr OspA gene, partial cds	DQ155623.1	<i>Borrelia afzelii</i>	255/255 (100%)
<i>Borrelia afzelii</i> strain BO23 plasmid lp54-lp38 fusion, partial sequence	CP018263.1	<i>Borrelia afzelii</i>	275/276 (99%)
<i>B. afzelii</i> ospA gene	X85982.1	<i>Borrelia afzelii</i>	275/276 (99%)

Sample 84 *Borrelia* spp., outer surface protein A (ospA) gene, *I. ricinus* female engorged tick:

>Consensus

TCTAATAATAGCCTTAATAGCATGCAAGCAAAATGTTAGCAGCCTTGATGAAAAAACAGCGCTTCAGT
AGATTTCCTGGTGAGATGAAAGTTCTTGTAAAGTAAAGAAAAAGACAAAGACGGCAAGTACAGTCTAA
AGGCAACAGTAGACAAGATTGAGCTAAAAGGAACCTCTGTAAAGACAATGGTTCTGGAGTGCTTGAA
GGTACAAAAGATGACAAAAGTAAAGCAAAATTAACAATTGCTGACGATCTAAGTAAAACACATTCTGA
ACTTTTCAAA

RID: FP01W141013

Job Title:Nucleotide Sequence

Program: BLASTN

Query: None ID: lcl|Query_49791(dna) Length: 283

Database: nt Nucleotide collection (nt)

Sequences producing significant alignments:

Description	Accession	Scientific Name	Identities
<i>Borrelia afzelii</i> strain KP193- Bb-DV-2009 linear plasmid OspA (ospA) pseudogene, partial sequence	HQ739067.1	<i>Borrelia afzelii</i>	232/235 (99%)
<i>Borrelia afzelii</i> linear plasmid ospA gene for OspA, partial cds	AB253532.1	<i>Borrelia afzelii</i>	282/283 (99%)
<i>B.afzelii ospA</i> gene	CP018263.1	<i>Borrelia afzelii</i>	280/283 (99%)

scientific reports



OPEN Investigation of genes expression of the JAK/STAT signalling pathway and AMPs in the presence of *Borrelia* spirochetes in *Ixodes ricinus*

Magdalena Szczotko^{1✉}, Sandra Antunes², Ana Domingos² & Małgorzata Dmitryjuk¹

Multicellular animals need to control the spread of invading pathogens. This is a particular challenge for blood-feeding vectors such as ticks, which ingest large amounts of blood potentially laden with harmful microorganisms. Ticks have a basic innate immune system and protect themselves from infection through innate immune responses involving pathways such as Janus kinase (JAK) or the signalling transducer activator of transcription (STAT). Direct antimicrobial defence occurs through the rapid synthesis of numerous antimicrobial agents including antimicrobial peptides (AMPs). The tick *Ixodes ricinus* is one of the main vectors of the Lyme disease pathogen, the spirochete *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Data suggest that the JAK/STAT signalling pathway controls the expression of AMPs and regulates the infection of the pathogen in the tick body. The innate immune system during the off-host period keeps the level of spirochete infection in check. Spirochetes may influence the innate immune response in ticks. Therefore, the aim of this study was to analyse the expression of the genes related to the JAK/STAT pathway and selected AMPs in questing ticks in which *B. burgdorferi* s.l. was detected. In the ticks infected with spirochetes, overexpression of genes related to the JAK/STAT signalling pathway was observed in the case of *STAM* and *SOCS* genes. AMPs genes such as *def1*, *ric*, *lzs* were overexpressed with different expression patterns. The results obtained suggest that AMPs may be involved in infection management in ticks.

The hard tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), which is widely distributed in northern Europe, including Poland^{1,2} is known to transmit a variety of pathogens that are important in both the medical and veterinary fields³, such as tick-borne encephalitis virus, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* spp. and parasitic protozoa of the genus *Babesia* spp. Firstly, ticks are known to transmit bacteria of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) complex, which are spirochetes that cause Lyme disease (LD) and are spread by *Ixodes* spp. ticks. It is considered the most common tick-borne infectious disease in North America and in Eurasian countries with temperate climates⁴. More than 85,000 cases of LD are documented each year, with the highest prevalence observed in Central European countries such as the Czech Republic, Estonia, Lithuania, Slovakia, and Poland².

As in other arthropods, the defence of ticks is based on innate, non-specific immunity⁵. The cellular response in ticks is associated with hemocytes, which perform various functions such as phagocytosis, nodule formation and encapsulation⁶. The regulation of the humoral response in ticks occurs via four main signalling pathways: Nuclear factor-kappa B/Toll (NF- κ B/Toll), c-Jun N-terminal kinase (JNK) immunodeficiency (IMD) and Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT)^{6–8}. Although the JAK/STAT signalling pathway in the tick remains poorly understood, recent research has shown that it is indeed functional, suggesting its important role in pathogen control^{7–9}. The JAK/STAT pathway in ticks is activated in response to bacterial or protozoan pathogens. The expression of antimicrobial peptides (AMPs) in the salivary glands and hemocytes of *Ixodes scapularis* is controlled by the JAK/STAT pathway, which can both enhance and inhibit the regulation of

¹Department of Biochemistry, Faculty of Biology and Biotechnology, University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Oczapowskiego 1A, Olsztyn 10-719, Poland. ²Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Associate Laboratory in Translation and Innovation Towards Global Health (LA-REAL), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade NOVA de Lisboa (UNL), Rua da Junqueira 100, Lisbon 1349-008, Portugal. ✉email: magdalena.szczotko@uwm.edu.pl

infections^{6,10,11}. In *I. scapularis*, the JAK/STAT pathway plays a crucial role in mediating signals between the gut microbiota and pathogen colonisation^{6,11–13}.

Tick AMPs include lysosomes, cystatins, defensins and other novel AMPs that have been isolated from numerous tick species¹⁴. AMPs are an immediate response to danger, rapidly inhibit microbial replication and are an essential component of the protective mechanism^{15,16}. AMPs are naturally occurring molecules that can kill multidrug-resistant (MDR) bacterial strains. Therefore, clinical interest in these peptides has increased. The prevalence of microbial MDR pathogens in the environment is putting pressure to discover a new class of antibiotics^{17,18}.

A significant increase in the expression of defensin-like genes was observed in *I. ricinus* individuals infected with *B. burgdorferi*. Similar results were observed in studies with the ticks *Dermacentor reticulatus* and *Dermacentor variabilis*^{19–21}. Furthermore, the data suggest that the JAK/STAT signalling pathway in *I. scapularis* ticks plays a crucial role in the regulation of *A. phagocytophilum* infection in ticks by controlling the expression of AMPs¹¹. Previous studies of interactions between ticks and tick-borne pathogens (TBPs) have shown that both the IMD and JAK/STAT signalling pathways play a central role in the control of bacterial infections by organisms such as *B. burgdorferi*, *A. marginale* and *A. phagocytophilum*⁷. For this reason, the interactions between the spirochetes collected during host blood feeding and the innate immune system of ticks remain of interest to researchers. Understanding the mechanisms of infection control and its suppression in ticks forms the basis for the search for effective therapeutics against LD.

It is widely known that there are three key parts of JAK/STAT signalling: Janus kinases (JAKs), signal transducers and activators of transcription proteins (STATs), and receptors that bind chemical signals²². Fogaça et al.⁷ have summarised the conserved components of the JAK/STAT pathway as follows: the transmembrane cytokine receptor Domeless, the tyrosine kinase JAK, the transcription factor STAT, the signal-transducing adaptor molecule (STAM) and the inhibitor proteins PIAS (protein inhibitor of activated STAT) and SOCS (suppressor of cytokine signalling). The ligand of the Domeless receptor (UPD gene) has not yet been identified in ticks (Fig. 1A). Recently, *I. scapularis* ticks have been shown to ingest *Borrelia* and IFN- γ (interferon gamma) during a blood meal from infected hosts⁹. Rana et al.²³ identified an *I. scapularis* receptor, Dome1, which has high selectivity and affinity for IFN- γ in vertebrates (mouse, human and bird). Unlike Dome orthologues in other arthropods, including non-*Ixodes* ticks, Dome1 has unique extracellular regions like those of cytokine receptors in vertebrates. Dome1 is co-localised with IFN- γ on the luminal surface of the tick endemic epithelium and is induced by ingested IFN- γ , regulating microbicidal responses mediated by the JAK-STAT pathway. Dome1 enhances the immune responses of the tick and is essential for the development of *I. scapularis* (Fig. 1B)²³.

The role of signalling pathways and innate defence mechanisms in ticks that feed on infected host blood seems clear. On the other hand, taming the infection and establishing the balance between spirochetes and tick tissue seems inspiring in times of silence. Innate immune system during off-host period keeps the level of spirochete infection in check. Spirochetes, possibly have impact on the innate immune response in ticks.

Defensins are conserved defence mechanisms and one of the most important components of the innate immunity of ticks. We decided to test defensin-1 (*def1*), defensin-2 (*def2*) and ricinisin (*ric*), a tick AMP belonging to the defensin group²⁴. Lysozyme (*lys*) appears to be an equally important AMP. It has been shown to have a borreliacidal effect in combination with varisin, a defensin identified in *Dermacentor variabilis*²⁵. Our study is therefore based on the hypothesis that the expression of genes related to the JAK/STAT signalling pathway and AMPs (*def1*, *def2*, *ric*, *lys*) in ticks in the natural environment would increase in response to the presence of LD spirochetes. The aim of the present study was to analyse the gene expression of components of the JAK/STAT immune signalling pathway in questing female *I. ricinus* ticks infected with *B. burgdorferi* s.l. spirochetes and to investigate the selected AMPs expression patterns in different *I. ricinus* tissues. The study was conducted to identify gaps and elucidate the basic immune mechanisms in ticks in the presence of *Borrelia burgdorferi* s.l. spirochetes in *I. ricinus* ticks.

Materials and methods

Ticks collection

The study material for the present study consisted of 50 observably non-fed *I. ricinus* adult females. The individuals were collected in urban areas of the Warmia and Mazury region in north-eastern Poland in the period from April to October 2023. The ticks were collected in the housing estate of Olsztyn (Pieczewo) between 9 am and 4 pm using the standard flagging method²⁶. The ticks were stored in STAY RNA[™] buffer (A&A Biotechnology, Gdynia, Poland) until analysis. All individuals were identified by species, sex and developmental stage using a taxonomic key²⁷. Ticks classified as female *I. ricinus* were further analysed.

RNA extraction

The preserved ticks were rinsed three times in a sterile 0.9% NaCl solution. Dissection was performed under the microscope using sterile forceps and a scalpel in a sterile water drop. During dissection, three tissue groups of the examined individuals were distinguished from the samples: salivary glands (SG), midgut (MG) and the remaining tissues (REST). The genetic material of the 150 tissue samples was extracted individually using the NZYol reagent (NZYTech, Lisbon, Portugal) according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration obtained was checked with NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

cDNA synthesis

cDNA was obtained from RNA extracted from tick tissue using the TranScriba kit (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland). The quality and quantity of cDNA after reverse transcription were determined using NanoDrop[™] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) was also used to confirm the results obtained. cDNA was synthesised using the TranScriba Kit

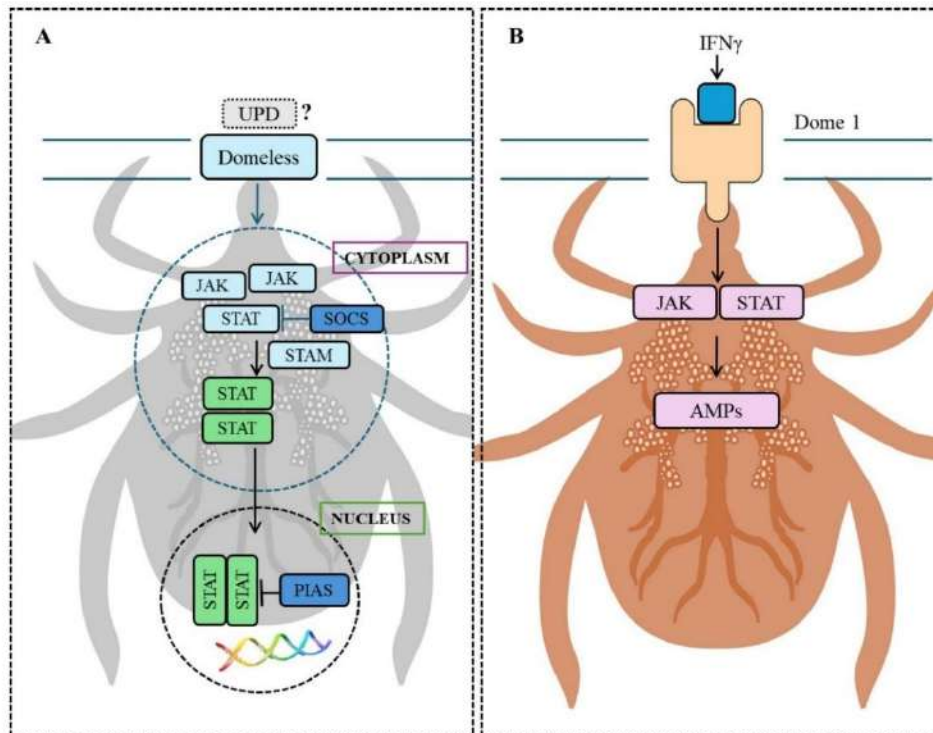


Fig. 1. (A) The components of the JAK/STAT signalling pathway: the transmembrane cytokine receptor Domeless, the tyrosine kinase (JAK), the transcription factor (STAT), the signal-transducing adaptor molecule (STAM) and the inhibitor proteins: protein inhibitor of activated STAT (PIAS) and suppressor of cytokine signalling (SOCS), UPD gene - has not been identified in ticks according Fogaca et al. 2021⁷ (B) Activation of JAK – STAT pathway in feeding ticks according Rana et al. 2023²⁴ (Made with SciPainter).

(A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) with an equal amount of RNA (1 μ g). cDNA was diluted with nuclease-free water to achieve a concentration of 100 ng/ μ l.

***B. burgdorferi* s.l. detection**

The cDNA tick samples of the test groups were subjected to a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). All three tissues (MG, SG, REST) of each individual were tested for the presence of *B. burgdorferi* s.l. Specifically, the 23S rRNA sequence of *B. burgdorferi* s.l. was analysed using the primer pair Bb23Sf (5'-CGA GTC TTA AAA GGG CGA TTT AGT-3') and Bb23Sr (5'-GCT TCA GCC TGG CCA TAA ATA G-3') to obtain a 75-bp fragment with a Bb23Sp TaqMan probe (5'-AGA TGT GGT AGA CCC GAA GCC GGTG-3') labelled at the 5' end with FAM and at the 3' end with TAMRA. The 23S rRNA gene is highly conserved among *Borrelia* species. The method has been shown to be sensitive and specific for the detection of LD spirochaetes and is routinely used in scientific research^{29–31}. The reactions were performed in triplicate. The reaction mixture for spirochaete detection consisted of: 1 μ l cDNA (100 ng), 5 μ l RT PCR mix sample (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland), 0.2 μ l probe and 0.5 μ l of 10 μ mol per primer. The samples were adjusted to a final volume of 10 μ l with nuclease-free water. PCR was performed according to the protocol described by Cicculi et al.²⁸.

Genes expression assays

Five genes involved in the tick JAK/STAT signalling pathway - tyrosine kinase (*JAK*), transcription factor (*STAT*), transducing adaptor molecule (*STAM*), suppressor of cytokine signalling (*SOCS*), protein inhibitor of activated STAT (*PIAS*) and four genes encoding different AMPs - defensin-1 (*def1*), defensin-2 (*def2*)¹⁷, lysozyme (*lys*), ricinusin (*ric*) were selected for this study (Table S1 – Supplementary Data). The primers used were designed and subjected to an optimisation test to determine the optimal annealing temperature and concentration. A standard

curve with a sample series dilution of the target template was used to estimate qPCR efficiency. Each standard curve contained 6 concentrations of the target template prepared by 10-fold dilution. The qPCR efficiency varied between 98% and 100% for each assay. The qPCR was performed in triplicate using the QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System from Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The reaction mixture consisted of 1 µl cDNA (100 ng), 5 µl RT-PCR Mix SYBR® (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) and 0.2 µl ROX (5-carboxy-X-rhodamine) reference dye, 0.5 µl of 10 µmol each primer (Table S1 - Supplementary Data) and the volume was made up to 10 µl with nuclease-free water. Results were presented as fold changes in gene expression normalised to two endogenous reference genes, actin and elongation factor (ACT, EF) and calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method^{17,32,33} (Fig. 2). The components of the JAK/STAT immune signalling pathway (JAK, STAT, STAM, SOCS, PIAS) were examined in eight samples with confirmed presence of *B. burgdorferi*¹. Apart from the reference genes, the results were normalised to the controls of the each tested tissue of the tissue, SG - salivary glands, MG - midgut, REST - the remaining tissue after dissection (relative quantification (RQ) = 1; tissues from eight ticks without confirmed presence of spirochetes).

Statistical analysis

The data were analysed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, CA, USA) and Statistica 13.3 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA). The ΔCq values obtained were subjected to statistical analysis. The normality of the ΔCq values obtained was confirmed using the Shapiro-Wilk test³⁴. Analysis of variance (ANOVA) or its non-parametric equivalent was used to assess the difference between the means of the compared groups. P values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

***B. burgdorferi* s.l. detection.** *B. burgdorferi* were detected in the genetic material of eight *I. ricinus* individuals. The overall prevalence was 16%. The cDNA of each dissected tissue (24 samples) was subjected to JAK/STAT pathway analysis. Eight ticks showing negative results of *B. burgdorferi* s.l. were randomly selected and used as controls (24 samples from 8 individuals).

JAK/STAT pathway genes expression in ticks. No changes were detected in the gene expression of STAT, PIAS in individual *B. burgdorferi* s.l. - positive ticks. Significant changes were observed in the JAK (down-regulation of its expression in rest of the tissues), STAM and SOCS genes (Fig. 3).

JAK gene expression was downregulated in tissues other than the midgut and salivary glands (8.3-fold change, $p=0.0054$). Comparison of fold change between the tissues examined showed significant differences between the salivary glands and the rest of the body, with expression being 13.3-fold higher ($p=0.0054$) in the salivary glands. The STAM gene was upregulated in all tissues examined. Gene expression was 3.11-fold higher in the salivary glands ($p=0.0150$), 3.27-fold higher in the midgut ($p=0.0052$) and 3.39-fold higher in the rest of the tissues ($p=0.0095$). The SOCS gene was upregulated 3.79-fold ($p=0.0019$) in the salivary glands 2.96-fold ($p=0.079$) in the midgut and 2.8-fold ($p=0.0209$) in the rest of the body (Fig. 3).

JAK/STAT genes expression - Salivary glands. Analysis of pathway gene expression in the salivary glands showed that the STAM gene was upregulated (3.1-fold change, $p=0.454$). Statistical analysis revealed that the STAM gene was 4.1 ($p=0.0103$), 3.1 ($p=0.0322$) and 2.6 ($p=0.0020$) times higher than the STAT and PIAS, respectively (Fig. 4).

JAK/STAT genes expression - Midgut. SOCS gene was observed to be expressed 9.8 ($p=0.0005$), 5.9 ($p=0.0007$), 3.4 ($p=0.0024$) times higher than JAK, STAT and PIAS genes. The analysis showed significant differences between the STAM and JAK, STAT and PIAS genes, which were 25.4 ($p<0.0001$), 22.5 ($p<0.0001$) and 3.82 ($p=0.003$), respectively (Fig. 4).

JAK/STAT genes expression - Rest of the body. The analysis showed significant differences between the JAK and STAM, SOCS genes. STAM and SOCS genes were upregulated 25.4 ($p<0.0001$), 22.5 ($p=0.0001$) times, respectively. The STAM gene was significantly more strongly expressed than the STAT gene (fold change: 4.5; $p=0.0468$) (Fig. 4).

AMPs gene expression in ticks with confirmed presence of *B. burgdorferi* s.l. The comparison of gene expression between the tested tissues showed significant differences in all tested AMPs (Fig. 1A). The *def1* and

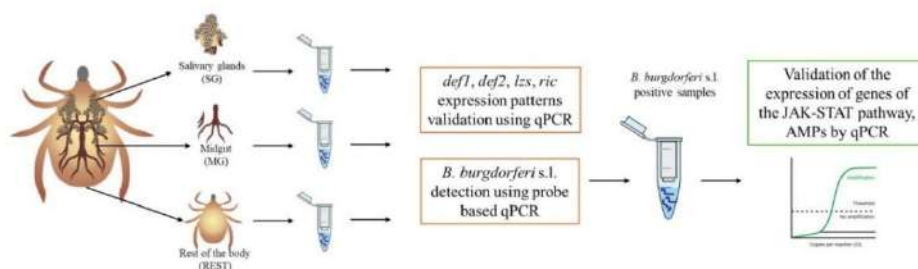


Fig. 2. Experimental study scheme (Made with SciPainter).

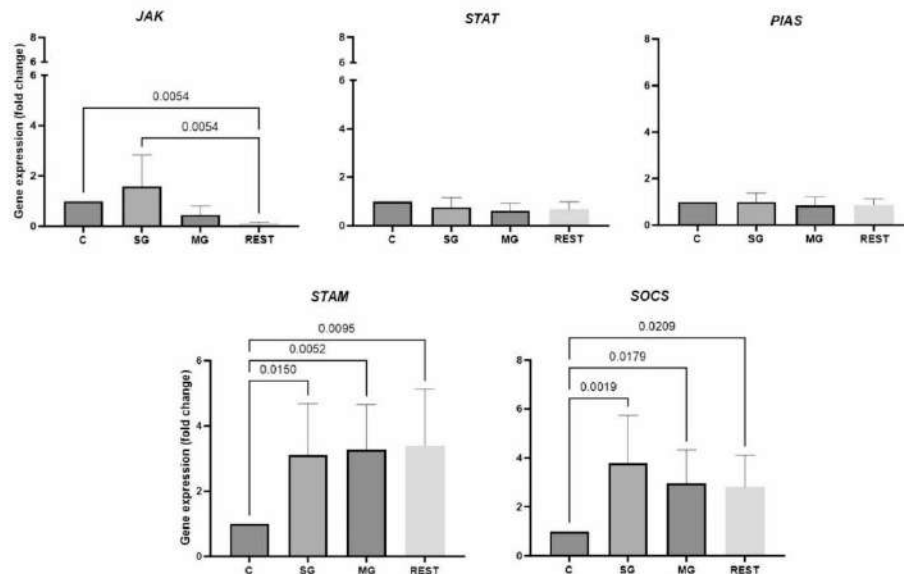


Fig. 3. Differences in *JAK*, *STAT*, *PIAS*, *STAM* and *SOCS* expression levels in *I. ricinus* ticks with confirmed presence of *B. burgdorferi* s.l. The results shown are means and standard deviations of gene expression levels. Results in control and ticks were analysed by parametric or non-parametric ANOVA (* $p < 0.05$) and normalised to two endogenous reference genes, actin and elongation factor, and to the relative controls (relative quantification (RQ) = 1; *B. burgdorferi* s.l. negative tissue). C- relative control of the each tissue tested, SG - salivary glands, MG - midgut, REST - the remaining tissue after dissection.

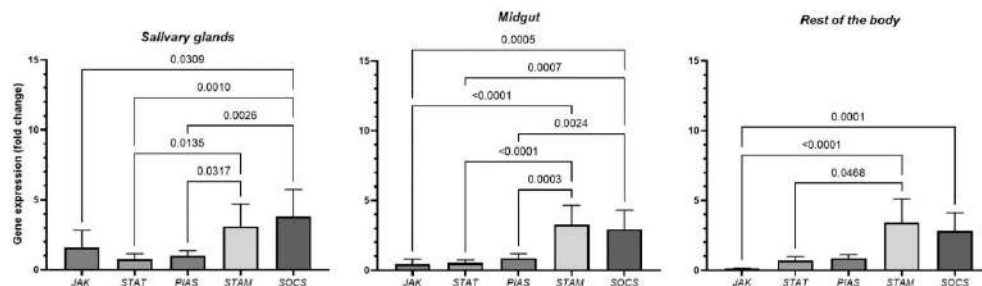


Fig. 4. Differences in *JAK*, *STAT*, *PIAS*, *STAM*, *SOCS* expression levels in *I. ricinus* ticks with confirmed presence of *B. burgdorferi* s.l. The results shown are means and standard deviations of gene expression levels. Results in control and ticks were analysed by parametric or non-parametric ANOVA (* $p < 0.05$) and normalised to two endogenous reference genes, actin and elongation factor, and to the relative controls of the each tissue tested (relative quantification (RQ) = 1; *B. burgdorferi* s.l. negative tissue).

ric genes were upregulated 4.1-fold ($p = 0.0394$) and 5.0-fold ($p = 0.0452$) respectively, in the midgut (Fig. 5A1, 5A4). In addition, *def1* was expressed 3.7-fold higher in the midgut than in other tissues ($p = 0.0471$) (Fig. 5A1). Expression of the *def2* gene was downregulated 11.8-fold in other tissues ($p = 0.0017$). A comparison of *def2* expression between the examined tissues showed a significant down-regulation in other tissues compared to

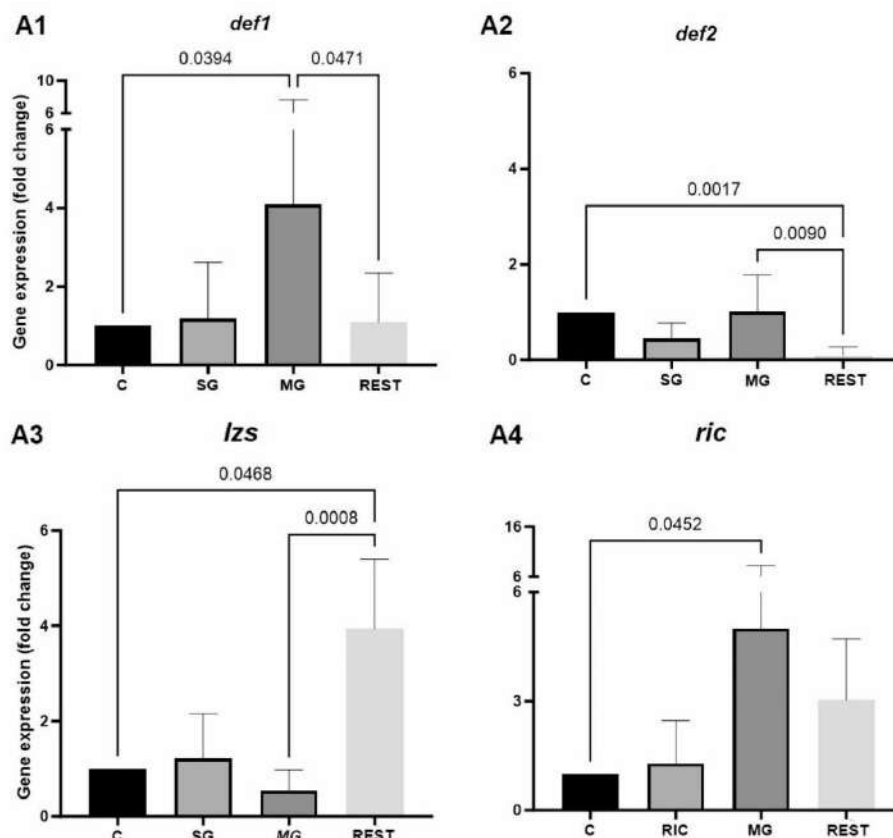


Fig. 5. (A) Differences in the expression levels of *def1*, *def2*, *lzs* and *ric* in *I. ricinus* ticks with confirmed presence of *B. burgdorferi* s.l. The results shown are means and standard deviations of the gene expression levels. Results in control and ticks were analysed using parametric or non-parametric ANOVA ($p < 0.05$) and normalised to two endogenous reference genes, actin and elongation factor, and relative controls (relative quantification (RQ) = 1; *B. burgdorferi* s.l. negative tissue). C- relative control of the each tissue tested, SG - salivary glands, MG - midgut, REST - the rest of the tissue after dissection.

the midgut, which was 12-fold lower ($p = 0.0090$) (Fig. 5A2). The *lzs* gene was upregulated 3.93-fold in the other tissues ($p = 0.0468$). *Lzs* gene expression was significantly higher in other tissues than in the midgut (7.45-fold, $p = 0.0008$) (Fig. 5A3).

Discussion

Here we show how gene expression of the JAK/STAT signalling pathway and AMPs genes expression changes in the presence of *B. burgdorferi* in different tissues of questing *I. ricinus* ticks. Since transcriptomics does not always correlate with proteomics, only gene expression and not protein expression was analysed here. The research material was questing ticks. A limitation of the study is the possible influence of other microbes that might be present in the investigated individuals on JAK/STAT and AMPs expression. All individuals were collected from one geographical location and were most likely exposed to the same microhabitat. This allowed us to rule out the influence of changing environmental conditions on the expression of the genes analysed.

Activation of the JAK/STAT signalling pathway has already been observed to be triggered by bacteria, viruses or protozoa and has been shown to play a role in combating infections in ticks, whether beneficial or harmful³⁵. The JAK/STAT signalling pathway is a widely expressed intracellular signal transduction pathway that plays

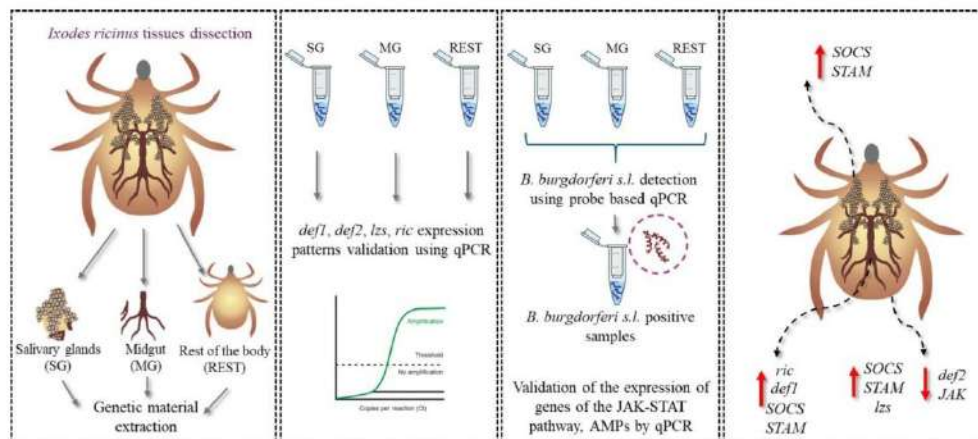


Fig. 6. Analyses performed to determine the expression of the JAK/STAT (JAK, STAT, STAM, SOCS, PIAS) and AMPs (*def1*, *def2*, *lzs*, *ric*) genes expression (Made with SciPainter).

a role in numerous biological processes, such as cell proliferation, differentiation, apoptosis, and immune regulation³⁶. Rosa et al.³⁷ have shown that *Anaplasma marginale* causes downregulation of immune-related genes in *Rhipicephalus microplus*. These data suggest that the pathogen can manipulate the tick's immune system to promote its survival and colonisation in the tick vector.

Although the tick JAK/STAT signalling pathway remains poorly understood, other reports suggest its functionality and crucial role in the control of pathogens^{7–9}. Therefore, we decided to monitor the expression profile of genes related to this signalling pathway in the presence of spirochetes. We did not observe overexpression of JAK, STAT and PIAS genes in ticks from the natural environment that were infected with spirochetes (Fig. 6). It is known that *B. burgdorferi* s.l. spirochetes are transmitted to the host through the bite of an infected tick vector (*Ixodes*). When the tick feeds, the spirochetes located in the tick's midgut are induced to migrate through the tick's hemolymph to the salivary glands, from where they are then injected into the host. Although *Borrelia* bacteria may be present in the salivary glands of non-fed ticks, these bacteria do not appear to be infectious. *Borreliae* capable of infection regularly do not reach the salivary glands until approximately 60 to 72 h after attachment³⁸. However, we found genetic material of *B. burgdorferi* s.l. in the salivary glands of the analysed questing ticks.

In this part of the study, our initial hypothesis about the overexpression of these genes during the presence of the pathogen was not confirmed. On the other hand, in all examined tissues of infected arachnids, we observed an increase in the expression of genes encoding the STAM and SOCS (Fig. 6). STAM, which is phosphorylated in response to the presence of cytokines, binds to JAKs and links cytokine stimulation to DNA synthesis³⁹. We observed overexpression of the STAM gene in the salivary glands, midgut and rest of the tissues of *I. ricinus* (Fig. 6). We suggest the possibility of linking this to the gradual suppression of the JAK/STAT pathway during off-host period of the tick and the establishment of a balance between the immune system of the tick and that of the spirochetes. SOCS inhibit the JAK/STAT signalling pathway, resulting in reduced transcription of JAK/STAT genes⁴⁰. Moreover it can affect the continuity of signal transduction by inhibiting the catalytic activity of JAK, which initiates intracellular signalling. Thus, when SOCS is expressed at elevated levels, it may interfere with signalling transduction by inhibiting JAK³⁵. In vertebrates, PIAS controls the duration of JAK/STAT signalling by causing the degradation of active STAT. In *Drosophila*, PIAS is localised in the cytoplasm and nucleus and fulfils the functions expected of a protein that regulates the degradation of activated STAT⁴¹. In our study, no significant changes in PIAS gene expression were observed. It is possible that activation of the JAK/STAT signalling pathway occurs during feeding, as in other ticks²³.

In *I. scapularis*, studies in which the STAT and JAK transcription factors were silenced have provided evidence for the importance of the signalling pathway in controlling infection with *A. phagocytophilum*. Arthropods, like all other multicellular animals, must control the spread of invading pathogens⁷. For ticks, this is particularly challenging because they consume large quantities of blood, which can contain harmful microorganisms. To defend against infections, arthropods rely on innate immune responses that involve pathways such as Toll, Imd and JAK/STAT¹⁰. Cappelili-Peixoto et al.¹³ show that the survival, development and proliferation of *A. marginale* in the salivary glands and midgut cells of *R. microplus* depend on molecular interactions between the bacterium and its biological vector. The midgut serves as the first site of interaction between ticks and pathogens and is probably the most important organ for the survival and multiplication of the pathogen¹⁰. On the other hand, the salivary glands are the most important site for the transmission of pathogens to the vertebrate host^{13,42}. Another aim of the study was to analyse AMPs expression patterns in *I. ricinus* ticks. AMPs are key components

of the innate immune system against pathogens. *Ixodes* ticks produce several AMPs. In *I. ricinus*, for example, a defensin-like gene is upregulated in the gut after infection with *B. burgdorferi*⁹. Tick defensins are generally active against Gramme-positive bacteria. Some isoforms are potentially active against Gramme-negative bacteria, protozoa, yeasts, intracellular rickettsiae, protozoa and fungi^{43–45}. AMPs are mainly expressed in hemocytes, fat body, gut, ovaries, and salivary glands of ticks. They react to both blood-feeding and microbial stimuli, and their release into the haemolymph is crucial for an immune system response⁶. Our study confirms that in the presence of the pathogens AMPs such as *def1*, *ric*, *lzs* are overexpressed in different tissues. In this part of the study, the results obtained confirmed our research hypothesis. The highest expression level of *def1* and *def2* was found in the midgut. The *ric* gene was significantly more strongly expressed in the midgut. The expression of the *lzs* gene was almost the same in all tissues examined, only in the rest of the body it was overexpressed. We observed that the presence of borelliae induced the gene expression of defensin 1 and ricinisin in the midgut of questing *I. ricinus* females (Fig. 6). The likely increased expression of these AMPs may contribute to the silencing of infection in ticks during starvation. Similarly, Paulino et al.³⁵ observed overexpression of the defensin gene in response to high load of *Theileria equi* in the intestine of *R. microplus*. Ricinisin is an antimicrobial peptide of ticks and belongs to the group of defensins, a well-preserved defence mechanism that is one of the most important components of innate immunity in ticks^{46,47}. Ricinisin has been shown to be induced in *Rhipicephalus annulatus* in response to infection with *Babesia bigemina*. Although significantly higher levels of ricinisin mRNA were observed in infected ticks compared to uninfected ticks, knockdown of the gene under the conditions of this study had no effect on infection with the pathogen. This suggests that ricinisin is not critical for the control of *B. bigemina* infection in *Rhipicephalus* spp. ticks⁴⁸. This therefore, requires further research. In rest of the body tissues, we have observed overexpression of the *lzs* gene, which encodes lysozyme. This seems to support previous studies showing that lysosomes were active in the gut of soft ticks but not in the gut of hard ticks. In the hemolymph and hemocytes of hard ticks, however the opposite is true. Here an increased expression of lysozymes was found¹⁴.

To summarise, AMPs are considered promising candidates for the development of novel anti-infective therapies. In arthropods such as ticks, AMPs act as the first line of defence against pathogens as part of the innate immune response⁴⁸. On the other hand, it has been shown that the JAK/STAT signalling pathway is activated in response to pathogens and controls the expression of AMPs^{6,11}. Although ticks employ a variety of molecules as antimicrobial agents, there is a notable lack of information on the regulation of their synthesis, as mentioned above. Therefore, further research on the regulation of tick AMPs by immune signalling pathways is needed to improve our understanding of their involvement in combating various pathogens⁸.

Conclusion

The JAK/STAT pathway genes were upregulated only in the case of the *STAM* and *SOCS* genes in the salivary glands, midgut and rest of the tissues of questing *I. ricinus*. The results suggest a possible link with the gradual suppression of the JAK/STAT pathway during off-host period and the establishment of a balance between the immune system of the tick and the presence of spirochetes. AMPs have been shown to be expressed in all analysed tissues of questing ticks collected in natural environments, although there are differences between their expression patterns. There was multiple overexpression of *def1* and *ric* in the midgut. *Lzs* gene expression was significantly increased in the rest of the body tissues. We hypothesise that these AMPs may be involved in the suppression of infection during the off-host period in the midgut and the remaining tissues of the tick and that AMPs may be involved in infection management in ticks. Understanding the function and regulation of tick immune pathways is an important part of elucidating the mechanisms underlying the fitness of ticks and their vector competence. Research into their potential could lead to new strategies for managing tick-borne diseases and mitigating their impact on public health.

Data availability

The datasets used and analyzed in this study are available upon reasonable request from the corresponding author (M.S.).

Received: 19 July 2024; Accepted: 20 January 2025

Published online: 22 January 2025

References

- Michalski, M. M., Kubiak, K., Szczotko, M., Chajęcka, M. & Dmitryjuk, M. Molecular detection of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato and *Anaplasma phagocytophilum* in ticks collected from dogs in urban areas of North-Eastern Poland. *Pathogens* **9**, 1–11 (2020).
- Kubiak, K., Szymańska, H., Dmitryjuk, M. & Dzika, E. Abundance of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) and the diversity of *Borrelia* species in Northeastern Poland. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **19**, (2022).
- Medlock, J. M. et al. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites Vectors*. **6**, 1–11 (2013).
- Stanek, G., Wormser, G. P., Gray, J. & Strle, F. Lyme borreliosis. *Lancet (London England)*. **379**, 461–473 (2012).
- Chrudimská, T., Chrudimský, T., Golovchenko, M., Rudenko, N. & Grubhoffer, L. New defensins from hard and soft ticks: similarities, differences, and phylogenetic analyses. *Vet. Parasitol.* **167**, 298–303 (2010).
- Aguilar-Díaz, H., Quiroz-Castañeda, R. E., Salazar-Morales, K., Cossio-Bayúgar, R. & Miranda-Miranda, E. Tick immunobiology and extracellular traps: An integrative vision to control of vectors. *Pathogens* **10**, (2021).
- Fogaça, A. C. et al. Tick Immune System: What Is Known, the Interconnections, the Gaps, and the Challenges. *Frontiers in Immunology* vol. 12 at (2021). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.628054>
- Narasimhan, S. et al. Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. *Cell. Host Microbe*. **15**, 58–71 (2014).
- Smith, A. A. et al. Cross-species Interferon Signaling boosts Microbicidal Activity within the Tick Vector. *Cell. Host Microbe*. **20**, 91–98 (2016).

10. Hajdúšek, O. et al. Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 1–15 (2013).
11. Liu, L. et al. Ixodes scapularis JAK-STAT pathway regulates tick antimicrobial peptides, thereby controlling the agent of human granulocytic anaplasmosis. *J. Infect. Dis.* **206**, 1233–1241 (2012).
12. Shuai, K. et al. Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature* **366**, 580–583 (1993).
13. Capelli-Peixoto, J. et al. The transcription factor Relish controls *Anaplasma marginale* infection in the bovine tick *Rhipicephalus microplus*. *Dev. Comp. Immunol.* **74**, 32–39 (2017).
14. Taylor, D. Innate immunity in Ticks: a review. *J. Acarol. Soc. Japan.* **15**, 109–127 (2006).
15. Radek, K. & Gallo, R. Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. *Semin Immunopathol.* **29**, 27–43 (2007).
16. Gallo, R. L. & Nizet, V. Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **3**, 402–409 (2003).
17. Chrudimská, T., Slaninová, J., Rudenko, N., Růžek, D. & Grubhoffer, L. Functional characterization of two defensin isoforms of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Parasites Vectors.* **4**, 1–9 (2011).
18. Peters, B. M. & Shirliff, M. E. Jabra-Rizk, M. A. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* **6**, 4–7 (2010).
19. Sonenshine, D. E., Ceraul, S. M., Hynes, W. E., Macaluso, K. R. & Azad, A. E. Expression of defensin-like peptides in Tick Hemolymph and Midgut in response to challenge with *Borrelia burgdorferi*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Exp. Appl. Acarol.* **28**, 127–134 (2002).
20. Rudenko, N., Golovchenko, M., Edwards, M. J. & Grubhoffer, L. Differential expression of *Ixodes ricinus* tick genes induced by blood feeding or *Borrelia burgdorferi* infection. *J. Med. Entomol.* **42**, 36–41 (2005).
21. Szczotko, M., Antunes, S., Domingos, A., Kubiak, K. & Dmitryjuk, M. Tick-Borne pathogens and defensin genes expression: a closer look at *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*. *Dev. Comp. Immunol.* **160**, (2024).
22. Aaronson, D. S. & Horvath, C. M. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* **296**, 1653–1655 (2002).
23. Rana, V. S. et al. Dome1-JAK-STAT signaling between parasite and host integrates vector immunity and development. *Sci. (80-)* **379**, (2023).
24. Antunes, S. et al. Functional genomics studies of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* ticks in response to infection with the cattle protozoan parasite, *Babesia Bigemina*. *Int. J. Parasitol.* **42**, 187–195 (2012).
25. Johns, R., Sonenshine, D. E. & Hynes, W. L. Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 857–865 (2001).
26. Espada, C., Cummins, H., Gonzales, J. A., Notto, L. & Gaff, H. D. A comparison of tick collection materials and methods in Southeastern Virginia. *J. Med. Entomol.* **58**, 692–698 (2021).
27. Black, W. C. & Piesman, J. Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acar: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 91 (1994).
28. Cicculi, V. et al. Molecular investigation of tick-borne pathogens in ixodid ticks infesting domestic animals (cattle and sheep) and small rodents (black rats) of Corsica, France. *Ticks Tick. Borne Dis.* **10**, 606–613 (2019).
29. Miterová, Z. et al. Local population structure and seasonal variability of borrelia garinii genotypes in *Ixodes ricinus* ticks, Slovakia. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **17**, (2020).
30. Vencliková, K. et al. Human pathogenic borreliae in *Ixodes ricinus* ticks in natural and urban ecosystem (Czech Republic). *Acta Parasitol.* **59**, 717–720 (2014).
31. Courtney, J. W., Kostelnik, L. M., Zeidner, N. S. & Massung, R. F. Multiplex real-time PCR for detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi*. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3164–3168 (2004).
32. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
33. Perner, J., Kropáčková, S., Kopaček, P. & Ribeiro, J. M. C. Sialome diversity of ticks revealed by RNAseq of single tick salivary glands. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **12**, 1–17 (2018).
34. Shapiro, S. S. & Wilk, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples)†. *Biometrika* **52**, 591–611 (1965).
35. Paulino, P. G. et al. Differential expression of immune genes in the *Rhipicephalus microplus* gut in response to *Theileria equi* infection. *Pathogens* **11**, 1–13 (2022).
36. Xin, P. et al. The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. *Int. Immunopharmacol.* **80**, 106210 (2020).
37. Rosa, R. D. et al. Exploring the immune signalling pathway-related genes of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: from molecular characterization to transcriptional profile upon microbial challenge. *Dev. Comp. Immunol.* **59**, 1–14 (2016).
38. Gilmore, R. D. & Piesman, J. Inhibition of *Borrelia burgdorferi* migration from the midgut to the salivary glands following feeding by ticks on OspC-immunized mice. *Infect. Immun.* **68**, 411–414 (2000).
39. Takeshita, T. et al. STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction. *Immunity* **6**, 449–457 (1997).
40. Mansfield, K. L. et al. Tick-borne pathogens induce differential expression of genes promoting cell survival and host resistance in *Ixodes ricinus* cells. *Parasites Vectors.* **10**, 1–12 (2017).
41. Hombria, J. C. G. & Brown, S. The fertile field of *Drosophila* JAK/STAT signalling. *Curr. Biol.* **12**, 569–575 (2002).
42. Reuben Kaufman, W. & Ticks Physiological aspects with implications for pathogen transmission. *Ticks Tick. Borne Dis.* **1**, 11–22 (2010).
43. Nakajima, Y. et al. Antibacterial activity and mechanism of action of tick defensin against Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1624**, 123–130 (2003).
44. Tonk, M. et al. *Ixodes ricinus* defensins attack distantly-related pathogens. *Dev. Comp. Immunol.* **53**, 358–365 (2015).
45. Wang, J., Bian, G., Pan, W., Feng, T. & Dai, J. Molecular characterization of a defensin gene from a hard tick, *Dermacentor silvarum*. *Parasites Vectors.* **8**, 1–5 (2015).
46. Tsuji, N. et al. Babesial vector tick defensin against *Babesia* sp. parasites. *Infect. Immun.* **75**, 3633–3640 (2007).
47. Silva, F. D. et al. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J. Biol. Chem.* **284**, 34735–34746 (2009).
48. Miyoshi, N. et al. Functional structure and antimicrobial activity of persulcatusin, an antimicrobial peptide from the hard tick *Ixodes persulcatus*. *Parasites Vectors.* **9**, 1–11 (2016).

Acknowledgements

Authors would like to thank to Fundação para a Ciência e a Tecnologia for funds to GHTM - UID/04413/2020 and LA-REAL - LA/P/0117/2020.

Author contributions

Conceptualization: M.S., M.D., S.A., A. D. methodology: M.S., S.A., M.D.; validation: M.S. and M.D.; investigation, M.S.; resources, writing-original draft preparation: M.S.; writing-review and editing: M.S., M.D., S.A., and A.D.; visualisation: M.S. and M.D., supervision: M.D., S.A., and A.D.

Funding

This research was supported by the Science Development Fund of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, Poland [No.12.610.012-110].

Declarations

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Ethical approval

The manuscript complies with the standards currently in force in Poland. The study does not contain any factors requiring ethics committee approval.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-025-87506-6>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2025

Table S1. Primers used in the study to test genes expression

Target Gene	Primer Name	Primer Sequence 5'-3'	Reference
Actin	ACT_F	ATGTGTGACGACGAGGTTGCCGC	15
	ACT_R	GTACAGCGACAGCACGGCCTGG	
Elongation factor	EF_F	ACGAGGCTCTGACGGAAG	27
	EF_R	CACGACGCAACTCCTTCAC	
<i>I. ricinus_def1</i>	Def1_F	GGTGGCTACTACTGCCCATTTTTT	15
	Def_R	TCAGACGCAGATGCAGGTCTTTT	
<i>I. ricinus_def2</i>	Def2_F	GGTGGTTACTACTGCCCATTCCG	15
<i>Lysozyme</i>	LSZ_F	CTGGTTTCCGCCCATACACT	present study
	LSZ_R	CTCTCTCCACGATCGCAGAC	
<i>Ricinusin</i>	RIC_F	CGCTGAGAACGAAACTGCAA	present study
	RIC_R	ACTGACAGTGCTCAACGGTT	
<i>JAK</i>	JAK_F	AACCGCAAGCTGCCTATGAA	present study
	JAK_R	CGAGGTTCTCCTGAGTCACG	
<i>STAT</i>	STAT_F	AGGTCAAGGTGTCCATCATC	10
	STAT_R	GATACTCCATTGTTCTGTGTTG	
<i>STAM</i>	STAM_F	GCTCAGGAGACATCTCAGCC	present study
	STAM_R	GATACAGGCTCTTGGCAGGG	
<i>PIAS</i>	PIAS_F	GAGGCGAGTGATCCTGCAAT	present study
	PIAS_R	GCCCTCACATACCCACTCAC	
<i>SOCS</i>	SOCS_F	CTGTTCCACCCAGCAGAGAG	present study
	SOCS_R	CGGCTCTACGATAACCGGAC	

Oświadczenia współautorów

Publikacja 1

Szczotko, M., Antunes, S., Domingos, A., Kubiak, K., & Dmitryjuk, M. (2024). Tick-borne pathogens and defensin genes expression: A closer look at *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 160, 105231. DOI: 10.1016/j.dci.2024.105231

Olsztyn, dnia 2 czerwca 2025 r.

(miejscowość, data)

dr hab. Małgorzata Dmitryjuk, prof. UWM

(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Prof. dr hab. Nina Smolińska
Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem „Tick-Borne pathogens and defensin genes expression: A closer look at *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*” M. Szczotko, S. Antunes, A. Domingos, K. Kubiak, M. Dmitryjuk, *Developmental & Comparative Immunology* 2024, Volume 160 s. 1-11, 105231, ISSN 0145-305X, DOI: 10.1016/j.dci.2024.105231 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opiece naukowej, udziale w opracowywaniu koncepcji i metodologii badań, uczestnictwie w przeglądzie i edycji manuskryptu, a także w walidacji i wizualizacji wyników oraz pozyskiwaniu finansowania na badania.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Magdalenę Szczotko jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydatki mgr inż. Magdaleny Szczotko polegający na opracowywaniu koncepcji i metodologii badań, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, opracowaniu manuskryptu, doborze piśmiennictwa i korekcie opracowania. Odpowiadała również za wizualizację i administrację badań.

Małgorzata Dmitryjuk
podpis

Olsztyn, 29.05.2025 r.

(miejscowość, data)

dr n. biol. Katarzyna Kubiak

(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie
Prof. dr hab. Nina Smolińska

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem „Tick-Borne pathogens and defensin genes expression: A closer look at *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*” M. Szczotko, S. Antunes, A. Domingos, K. Kubiak, M. Dmitryjuk, Developmental & Comparative Immunology 2024, Volume 160 s. 1-11, 105231, ISSN 0145-305X, DOI: 10.1016/j.dci.2024.105231 mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: uczestnictwie w przeglądzie i edycji manuskryptu, a także w doborze metodologii badań.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Magdalenę Szczotko jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje znaczący indywidualny wkład kandydatki mgr inż. Magdaleny Szczotko polegający na opracowywaniu koncepcji i metodologii badań, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, opracowaniu manuskryptu, doborze piśmiennictwa i korekcie opracowania. Odpowiadała również za wizualizację i administrację badań.

Katarzyna Kubiak
.....
podpis/podpisy

30th of May 2025, Lisboa Portugal

Sandra Antunes, PhD

**Chairperson of the Scientific Council
of the Discipline of Biological Sciences**

Prof. Nina Smolińska

University of Warmia and Mazury in Olsztyn

**DECLARATION
of the Co-author**

I hereby declare that in the article entitled „Tick-Borne pathogens and defensin genes expression: A closer look at *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*” by M. Szczotko, S. Antunes, A. Domingos, K. Kubiak, M. Dmitryjuk, *Developmental & Comparative Immunology* 2024, Volume 160 s. 1-11, 105231, ISSN 0145-305X, DOI: 10.1016/j.dci.2024.105231 my substantive contribution involved scientific supervision as well as participation in the review and editing of the manuscript.

At the same time, I give my consent for the above-mentioned article to be submitted by MSc Eng. Magdalena Szczotko as part of her doctoral dissertation in the form of a thematically coherent set of scientific articles published in peer-reviewed journals.

I declare that a self-contained and clearly identifiable portion of the aforementioned work constitutes the individual contribution of the candidate, MSc Eng. Magdalena Szczotko. This contribution includes the development of the research concept and methodology, execution of the experimental part, analysis and interpretation of the results, preparation of the manuscript, selection of literature, and final editing. She was also responsible for visualization and project administration.

Assinado por: Sandra Isabel da Conceição Antunes
Num. de Identificação: 12165983
Data: 2025.05.30 16:42:40+01'00'

.....
Signature

Lisbon, 02/05/2025

Ana Gonçalves Domingos, PhD

**Chairperson of the Scientific Council
of the Discipline of Biological Sciences**

Prof. Nina Smolińska

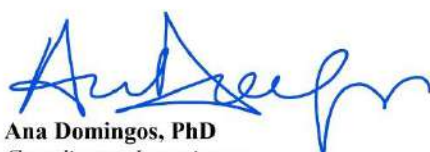
University of Warmia and Mazury in Olsztyn

**DECLARATION
of the Co-author**

I hereby declare that in the article entitled „Tick-Borne pathogens and defensin genes expression: A closer look at *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*” by M. Szczotko, S. Antunes, A. Domingos, K. Kubiak, M. Dmitryjuk, *Developmental & Comparative Immunology* 2024, Volume 160 s. 1-11, 105231, ISSN 0145-305X, DOI: 10.1016/j.dci.2024.105231 my substantive contribution involved scientific supervision as well as participation in the review and editing of the manuscript.

At the same time, I give my consent for the above-mentioned article to be submitted by MSc Eng. Magdalena Szczotko as part of her doctoral dissertation in the form of a thematically coherent set of scientific articles published in peer-reviewed journals.

I declare that a self-contained and clearly identifiable portion of the aforementioned work constitutes the individual contribution of the candidate, MSc Eng. Magdalena Szczotko. This contribution includes the development of the research concept and methodology, execution of the experimental part, analysis and interpretation of the results, preparation of the manuscript, selection of literature, and final editing. She was also responsible for visualization and project administration.



Ana Domingos, PhD
Coordinator Investigator
Instituto de Higiene e Medicina Tropical
Universidade NOVA de Lisboa



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DINHO T102

Publikacja 2

Szczotko, M., Antunes, S., Domingos, A. & Dmitryjuk M. (2025). Investigation of genes expression of the JAK/STAT signalling pathway and AMPs in the presence of *Borrelia* spirochetes in *Ixodes ricinus*. *Scientific Reports*, 15, 2869. DOI: 10.1038/s41598-025-87506-6

Olsztyn, dnia 2 czerwca 2025r.

(miejscowość, data)

dr hab. Małgorzata Dmitryjuk, prof. UWM

(tytuł zawodowy/stopień/tytuł naukowy, imię i nazwisko)

Prof. dr hab. Nina Smolińska
Przewodnicząca Rady Naukowej Dyscypliny
Nauki Biologiczne
Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

OŚWIADCZENIE
współautora

Oświadczam, że w pracy pod tytułem "Investigation of genes expression of the JAK/STAT signalling pathway and AMPs in the presence of *Borrelia* spirochetes in *Ixodes ricinus*" Szczotko M., Antunes S., Domingos A., Dmitryjuk M. Scientific Reports 2025, 15 (1): 2869. DOI: 10.1038/s41598-025-87506-6, mój wkład merytoryczny w jej przygotowanie polegał na: opiece naukowej, udziale w opracowywaniu koncepcji i metodologii badań, uczestnictwie w przeglądzie i edycji manuskryptu, a także w wizualizacji i walidacji wyników i badaniami oraz pozyskiwaniu finansów na realizację projektu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez mgr inż. Magdalenę Szczotko jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład kandydatki mgr inż. Magdaleny Szczotko polegający na opracowywaniu koncepcji i metodologii badań, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, opracowaniu manuskryptu, doborze piśmiennictwa i korekcie opracowania. Odpowiadała również za wizualizację i administrację badań.

Małgorzata Dmitryjuk
.....
podpis/podpisy

30th of May, 2025, Lisboa, Portugal

Sandra Antunes, PhD

**Chairperson of the Scientific Council
of the Discipline of Biological Sciences**

Prof. Nina Smolińska

University of Warmia and Mazury in Olsztyn

**DECLARATION
of the Co-author**

I hereby declare that in the article entitled “Investigation of genes expression of the JAK/STAT signalling pathway and AMPs in the presence of *Borrelia* spirochetes in *Ixodes ricinus*” Szczotko M., Antunes S., Domingos A., Dmitryjuk M. Scientific Reports 2025, 15 (1): 2869. DOI: 10.1038/s41598-025-87506-6, my substantive contribution involved participation in the scientific supervision, conceptualization, planning of the research methodology as well as in the review and editing of the manuscript.

At the same time, I give my consent for the above-mentioned article to be submitted by MSc Eng. Magdalena Szczotko as part of her doctoral dissertation in the form of a thematically coherent set of scientific articles published in peer-reviewed journals.

I declare that a self-contained and clearly identifiable portion of the work constitutes the individual contribution of the candidate, MSc Eng. Magdalena Szczotko. This contribution includes the development of the research concept and methodology, execution of the experimental part, analysis and interpretation of the results, preparation of the manuscript, selection of literature, and final editing. She was also responsible for visualization and project administration.

Assinado por: Sandra Isabel da Conceição Antunes
Num. de identificação: 12165983
Data: 2025.05.30 16:43:23+01'00'

.....
Signature

Lisbon, 02/05/2025

Ana Gonçalves Domingos, PhD

**Chairperson of the Scientific Council
of the Discipline of Biological Sciences**

Prof. Nina Smolińska

University of Warmia and Mazury in Olsztyn

**DECLARATION
of the Co-author**

I hereby declare that in the article entitled “Investigation of genes expression of the JAK/STAT signalling pathway and AMPs in the presence of *Borrelia* spirochetes in *Ixodes ricinus*” by Szczotko M., Antunes S., Domingos A., Dmitryjuk M. Scientific Reports 2025, 15(1), 2869. DOI: 10.1038/s41598-025-87506-6, my substantive contribution involved scientific supervision, conceptualization as well as participation in the review and editing of the manuscript.

At the same time, I give my consent for the above-mentioned article to be submitted by MSc Eng. Magdalena Szczotko as part of her doctoral dissertation in the form of a thematically coherent set of scientific articles published in peer-reviewed journals.

I declare that a self-contained and clearly identifiable portion of the aforementioned work constitutes the individual contribution of the candidate, MSc Eng. Magdalena Szczotko. This contribution includes the development of the research concept and methodology, execution of the experimental part, analysis and interpretation of the results, preparation of the manuscript, selection of literature, and final editing. She was also responsible for visualization and project administration.



Ana Domingos, PhD

Coordinator Investigator

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Universidade NOVA de Lisboa



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Krótką charakterystyka dorobku naukowego

Wykształcenie

2019 - 2025 Szkoła Doktorska Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, Wydział Biologii i Biotechnologii - Dziedzina nauk biologicznych.

2017 - 2019 - Studia magisterskie, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Kierunek: Biotechnologia farmaceutyczna, praca pt. „Molekularna identyfikacja *Borrelia burgdorferi* sensu lato i *Anaplasma phagocytophilum* w kleszczach *Ixodes ricinus* izolowanych z psów poddanych działaniu leków z grup neonikotynoidów i pyretroidów”.

2013 - 2017 - Studia inżynierskie, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Biologii i Biotechnologii, Kierunek: Biotechnologia praca pt. „Identyfikacja *Anaplasma phagocytophilum* w kleszczach *Ixodes ricinus* za pomocą reakcji PCR”.

Artykuły naukowe:

Wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. **Szczotko, M.**, Antunes, S., Domingos, A. et al. Investigation of genes expression of the JAK/STAT signalling pathway and AMPs in the presence of *Borrelia* spirochetes in *Ixodes ricinus*. Sci Rep 15, 2869 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41598-025-87506-6>
2. **Szczotko, M.**, Antunes, S., Domingos, A., Kubiak, K., & Dmitryjuk, M. (2024). Tick-Borne pathogens and defensin genes expression: A closer look at *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*. *Developmental and comparative immunology*, 160, 105231. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2024.105231>

Niewchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

1. Moerbeck, L., Parreira, R., **Szczotko, M.**, Seixas, G., Velez, R., Dmitryjuk, M., Santos, A. S., Domingos, A., & Antunes, S. (2024). Ticks and Tick-Borne Pathogens Circulating in Peri-Domestic Areas in Mainland Portugal. *Microorganisms*, 12(5), 1006. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12051006>
2. **Szczotko, M.**, Kubiak, K., Michalski, M. M., Moerbeck, L., Antunes, S., Domingos, A., & Dmitryjuk, M. (2023). *Neoehrlichia mikurensis*-A New Emerging Tick-Borne Pathogen in North-Eastern Poland?. *Pathogens*, 12(2), 307. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020307>
3. Dmitryjuk, M., **Szczotko, M.**, Kubiak, K., Dziekońska-Rynko, J., Cichocka, J., Hliwa, P., & Mierzejewska, K. (2022). *Cystidicola farionis*, a Swim Bladder Parasite of

- European Smelt: Characterization of the Nematode Trehalose Strategy. International journal of environmental research and public health, 19(11), 6430. <https://doi.org/10.3390/ijerph19116430>
4. Michalski, M. M., Kubiak, K., **Szczotko, M.**, & Dmitryjuk, M. (2021). Tick-Borne Pathogens in Ticks Collected from Wild Ungulates in North-Eastern Poland. Pathogens, 10(5), 587. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050587>
 5. Kubiak, K., **Szczotko, M.**, & Dmitryjuk, M. (2021). *Borrelia miyamotoi*-An Emerging Human Tick-Borne Pathogen in Europe. Microorganisms, 9(1), 154. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010154>
 6. Dmitryjuk, M., **Szczotko, M.**, Kubiak, K., Trojanowicz, R., Parashchyn, Z., Khomitska, H., & Lubenets, V. (2020). S-Methyl-(2-Methoxycarbonylamino-Benzimidazole-5) Thiosulfonate as a Potential Antiparasitic Agent-Its Action on the Development of *Ascaris suum* Eggs In Vitro. Pharmaceuticals, 13(11), 332. <https://doi.org/10.3390/ph13110332>
 7. Michalski, M. M., Kubiak, K., **Szczotko, M.**, Chajęcka, M., & Dmitryjuk, M. (2020). Molecular Detection of *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato and *Anaplasma phagocytophilum* in Ticks Collected from Dogs in Urban Areas of North-Eastern Poland. Pathogens 9(6), 455. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060455>

Rozdziały w monografiach:

1. Chajęcka Marta, Buczkowska Martyna, **Szczotko Magdalena**. 2019. "Występowanie *Borrelia burgdorferi* sensu lato w kleszczach twardych izolowanych ze zwierzyny płowej" Nauka, badania i doniesienia naukowe 2019 : Nauki przyrodnicze i medyczne. Cz. II / Redakcja Tobiasz Wysoczański. Świebodzice : Idea Knowledge Future, 2019, s. 35-43 ; bibliogr. (5 pkt.)
2. **Szczotko Magdalena**, Dmitryjuk Małgorzata, Michalski Mirosław M. 2018. "Molecular identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from dogs in Olsztyn-city agglomeration". Stawonogi na początku nowego wieku / pod red. Alicji Buczek, Czesława Błaszaka. Lublin : Koliber - Oficyna Wydawnicza Fundacji na Rzecz Zwalczenia Kleszczy i Profilaktyki w Chorobach Odkleszczowych, 2018, s. 59-64 ; bibliogr. (5 pkt.)

Łącznie:

Całkowity IF: 32.712

Punkty MNiSW: 910

Referaty konferencyjne:

1. **Szczotko Magdalena**, Kubiak Katarzyna, Michalski Mirosław M., Moerbeck Leonardo, Antunes Sandra, Domingos Ana, Dmitryjuk Małgorzata. 2023. "Nowo pojawiające się patogeny w kleszczach północno-wschodniej Polski: *Borrelia miyamotoi* i *Neoehrlichia mikurensis*". III Konferencja Naukowo-Szkoleniowa: Parazytozy Zwierząt - aktualne zagrożenia - nowe rozwiązania terapeutyczne i profilaktyczne, Ciechanowiec 11-14 września 2023
2. **Szczotko Magdalena**, Antunes Sandra, Domingos Ana, Kubiak Katarzyna, Dmitryjuk Małgorzata. 2023. "Dlaczego kleszcze nie chorują? Zmiany ekspresji genów defensyn u kleszczy *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus* w obecności patogenów". III Konferencja Naukowo-Szkoleniowa: Parazytozy Zwierząt - aktualne zagrożenia - nowe rozwiązania terapeutyczne i profilaktyczne, Ciechanowiec 11-14 września 2023
3. **Szczotko Magdalena**, Dmitryjuk Małgorzata, Michalski Mirosław M. 2019. "Molekularna identyfikacja *Borrelia burgdorferi* sensu lato i *Anaplasma phagocytophilum* w kleszczach *Ixodes ricinus* izolowanych z psów poddanych działaniu leków z grupy neonikotynoidów i pyretroidów". X Konferencja Naukowo-Szkoleniowa w Piszcu 20-22 maja 2019 r.
4. Dmitryjuk Małgorzata, Michalski Mirosław M., **Szczotko Magdalena**, Chajęcka Marta, Buczkowska Martyna. 2019. "Prewalencja *Borrelia burgdorferi* sensu lato i *Anaplasma phagocytophilum* w kleszczach twardych izolowanych z psów i zwierzęcych płowej na terenie województwa warmińsko-mazurskiego - badania wstępne". X Konferencja Naukowo-Szkoleniowa w Piszcu 20-22 maja 2019 r.
5. **Szczotko Magdalena**, Dmitryjuk Małgorzata, Michalski Mirosław M. 2018. "Molecular identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from dogs in Olsztyn-city agglomeration". XX Międzynarodowe Sympozjum "Stawonogi pasożytnicze, alergogenne i jadowite - znaczenie medyczne i sanitarne" Janowiec nad Wisłą 05-07 czerwca 2018r.

Komunikaty konferencyjne:

1. Moerbeck Leonardo, Parreira Ricardo, **Szczotko Magdalena**, Seixas Gonçalo, Velez Rita, Dmitryjuk Małgorzata, Domingos Ana, Antunes Sandra. Investigating tick-borne pathogens in questing and potential reservoir ticks in Portugal. 11th Tick & Tick-borne Pathogen Conference, 1st - 6th September 2024, Havana, Varadero, Cuba

2. **Szczotko Magdalena**, Kubiak Katarzyna, Moreira Leonardo, Antunes Sandra, Domingos Ana, Dmitryjuk Małgorzata. 2022. „*Neoehrlichia mikurensis*, an emerging tick-borne pathogen in the north-eastern Poland: a preliminary screening”. XXVI Congress of the Polish Parasitological Society 12-15 September 2022, Olsztyn Annals of Parasitology 2022, 68 (Suppl. 2), s. 213-213.
3. **Szczotko Magdalena**, Dmitryjuk Małgorzata. 2022. „Preliminary studies on the prevalence of the selected pathogens in ticks collected from pets living in households and in shelter”. XXVI Congress of the Polish Parasitological Society 12-15 September 2022, Olsztyn Annals of Parasitology 2022, 68 (Suppl. 1), s. 12-13.
4. Michalski Mirosław M., Kubiak Katarzyna, **Szczotko Magdalena**, Dmitryjuk Małgorzata. 2022. "Preliminary studies on the prevalence of selected pathogens threatening human health in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* ticks collected from wild animals of Warmia and Mazury, part 1". ABSTRACTS of the II Scientific and Training Conference Animal Parasitoses – Current Threats – New Therapeutically and Prophylactically Solutions, Ciechanowiec, 6-9 September 2021. Annals of Parasitology 2022, 68 (Suppl. 1), s. 12-13.
5. Kubiak Katarzyna, Dmitryjuk Małgorzata, **Szczotko Magdalena**, Szymańska Hanna, Dzika Ewa. 2021. "*Borrelia miyamotoi* - an emerging risk for human health". International scientific and training conference Poland - Spain - Slovakia - "Nursing and midwifery in an interdisciplinary dimension in the face of contemporary challenges"; Olsztyn, February 19, 2021: abstracts.
6. Dmitryjuk Małgorzata, **Szczotko Magdalena**. 2021. "Choroby odkleszczowe - wektory, zagrożenia, profilaktyka". V Ogólnopolska Konferencja Naukowa Choroby zakaźne i pasożytnicze człowieka - problem współczesnego społeczeństwa. Abstrakty / Redakcja: Monika Iwaniuk, Kinga Kalbarczyk. Lublin 19.11.2021.
7. Buczkowska Martyna, Chajęcka Marta, **Szczotko Magdalena**, Dmitryjuk Małgorzata, Michalski Mirosław M. 2019. "Detection and identification of borrelia spirochaetes in hard ticks removed from deer in the Warmia_Mazury Voivodeship - preliminary studies". ABSTRACTS of the XXV Congress of the Polish Parasitological Society Warsaw, 9-12 September 2019 Annals of Parasitology 2019, 65 (suppl.), s. 175-176.
8. **Szczotko Magdalena**, Dmitryjuk Małgorzata, Michalski Mirosław M. 2019. "Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in hard ticks isolated from wildlife animals in the Warmia-Mazury Voivodeship". Annals of Parasitology 2019, 65 (suppl.), s. 200-

201. ABSTRACTS of the XXV Congress of the Polish Parasitological Society Warsaw, 9-12 September 2019 Annals of Parasitology 2019, 65 (suppl.), s. 175-176.
9. Dmitryjuk Małgorzata, Chajęcka Marta, **Szczotko Magdalena**, Michalski Mirosław M. 2018. "Preliminary studies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato prevalence in *Ixodes ricinus* ticks collected from city-agglomeration dogs". XIIIth Slovak and Czech Parasitological Days: Parasites in the Heart of Europe 2: Book of Abstracts / editors: Martina Miterpáková, Zuzana Vasilková, Košice, 21-25.05.2018: Slovak Society for Parasitology at SAS, 2018, s. 41.
10. **Szczotko Magdalena**, Dmitryjuk Małgorzata, Michalski Mirosław M. 2018. Molecular identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected from dogs in Olsztyn-city agglomeration". XX Międzynarodowe Sympozjum "Stawonogi pasożytnicze, alergogenne i jadowite - znaczenie medyczne i sanitarne". Janowiec nad Wisłą, 05-07.06.2018.
11. Dmitryjuk Małgorzata, Michalski Mirosław M., **Szczotko Magdalena**. 2017. "Badania wstępne nad prevalencją *Anaplasma phagocytophilum* w kleszczach *Ixodes ricinus* pozyskanych z psów aglomeracji miejskiej". I Konferencja Naukowo-Szkoleniowa: "Parazytozy zwierząt - aktualne zagrożenia - nowe rozwiązania terapeutyczne i profilaktyczne", Ciechanowiec, 26-29.09.2017 r.
12. Dmitryjuk Małgorzata, **Szczotko Magdalena**, Michalski Mirosław M. 2017. "Identification of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks removed from city agglomeration dogs". XVI Conference of Ukrainian Scientific society of parasitologists (Lviv, 18-21 September 2017): Abstracts / Ed.: I.A. Akimov, V.V. Stibel, V.V. Korniyushin.

Staże krajowe:

03.07-28.07.2017 (1 miesiąc) - **Narodowy Instytut Leków, Warszawa**

Staże zagraniczne:

01.07-31.08.2018 (2 miesiące) - Praktyki studenckie w ramach programu Erasmus+, **Instytut Higieny i Medycyny Tropikalnej (IHMT), Portugalia, Lizbona** - Katedra Parazytologii, Laboratorium Chorób i Patogenów Przenoszonych przez Wektory (VBD) (opiekun: dr Ana Gonçalves Domingos)

06.05-06.07.2019 (2 miesiące) - Praktyki absolwenckie w ramach programu Erasmus+, **Instytut Parazytologii, Czeska Akademia Nauk, Czechy, Czeskie Budziejovice** – Laboratorium Genomiki i Proteomiki Wektorów Chorób (opiekun: dr Michail Kotsyfakis)

09.09-06.10.2021 (1 miesiąc) - Staż w ramach programu PROM, **Instytut Higieny i Medycyny Tropikalnej (IHMT), Portugalia, Lizbona** - Katedra Parazytologii, Laboratorium Chorób i Patogenów Przenoszonych przez Wektory (VBD) (opiekun: dr Ana Gonçalves Domingos)

06-08.2022 (2 miesiące) - Praktyki studenckie w ramach programu Erasmus+, **Instytut Higieny i Medycyny Tropikalnej (IHMT), Portugalia, Lizbona** - Katedra Parazytologii, Laboratorium Chorób i Patogenów Przenoszonych przez Wektory (VBD) (opiekun: dr Ana Gonçalves Domingos)

05-07.2023 (2 miesiące) - Praktyki studenckie w ramach programu Erasmus+, **Instytut Higieny i Medycyny Tropikalnej (IHMT), Portugalia, Lizbona** - Katedra Parazytologii, Laboratorium Chorób i Patogenów Przenoszonych przez Wektory (VBD) (opiekun: dr Ana Gonçalves Domingos)

Uczestnictwo w grantach naukowych

- Grant PRELUDIUM 23, pt.: „Prawdopodobny molekularny mechanizm transmisji krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato - badania porównawcze transkryptomu i proteomu kleszczy *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*” (2024/53/N/NZ6/00741) – kierownik projektu
- Grant rektora (2022 r.) pt.: „Candidatus *Neoehrlichia mikurensis* – nowo pojawiający się patogen w kleszczach *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*” (umowa 4/2022) – kierownik projektu
- „Badania monitorujące i przesiewowe wybranej populacji kleszczy twardych *Ixodes* pod kątem zakażenia czynnikami zakaźnymi wywołującymi boreliozę (i opcjonalnie anaplazmozę) na wybranych obszarach województwa warmińsko-mazurskiego” – projekt finansowany przez Marszałka Województwa Warmińsko-Mazurskiego (Nr1 UWM/2018, DOŚ.11.2018) – wykonawca projektu

Wykaz członkostwa w organizacjach i towarzystwach naukowych

1. 2021 - obecnie Członek Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego, Oddział Olsztyński PTP
2. 2021 - 2023 Przewodnicząca Koła Naukowego Parazytologii "Vermis", Katedra Biologii Medycznej, Szkoła Zdrowia Publicznego, UWM
3. 2018 - 2019 Członek Naukowego Koła Biotechnologów, Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Biologii i Biotechnologii, UWM

Promocja i popularyzacja Nauki

1. Organizacja i prowadzenie warsztatów w ramach Nocy Biologów, projektu „Spotkania z nauką”, Dnia Biologii i Biotechnologii oraz dla Licealistów Uniwersyteckiego XII Liceum Ogólnokształcącego w Olsztynie.
2. Audycja Student Aktywnie! w Radiu UWM FM – rozmowa na temat Studenckiego Grantu Rektora.
3. Rozmowa w TVP Olsztyn – Głos Regionu – rozmowa na temat otrzymanego grantu Preludium 23.
4. Uczestnictwo w realizacji projektu pt. "Molecular identification of tick-borne pathogens in *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus*" realizowanego w Katedrze Biochemii Wydziału Biologii i Biotechnologii w ramach działań The International Federation of Medical Students' Associations (IFMSA), do tej pory gościliśmy 2 studentki z Meksyku, Studenta z Sudanu oraz 2 studentów z Tajlandii.
5. 2023-2024 zatrudnienie jako edukator w Centrum Popularyzacji Nauki i Innowacji Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie "KORTOSFERA" (przygotowanie merytoryczne oraz prowadzenie warsztatów naukowych dla gości odwiedzających Centrum, odbiorcą warsztatów były różne grupy wiekowe).
6. Artykuł w czasopiśmie Weterynaria w praktyce pt. „Nowo pojawiające się patogeny odkleszczowe – *Borrelia miyamotoi* i *Neoehrlichia mikurensis*” - 05.2025. Magdalena Szczotko, Małgorzata Dmitryjuk.
7. Członek Komitetu Organizacyjnego XXVI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego, Olsztyn 12-15.09.2022.

Recenzent artykułów naukowych w czasopismach punktowanych (100 pkt. wg wykazu MNiSW):

- *BMC Infectious Diseases*,
- *Parasites & Vectors*,
- *Microbial Ecology*.

Dalsze plany naukowe

W listopadzie 2024 r. rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta na Wydziale Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Zatrudnienie to stwarza mi możliwość dalszego rozwoju naukowego oraz aktywnego uczestnictwa w działalności badawczej i dydaktycznej. W lutym 2025 r. zostałam kierownikiem projektu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM 23 pt. „Prawdopodobny molekularny mechanizm transmisji krętków *Borrelia burgdorferi* sensu lato – badania porównawcze transkryptomu i proteomu kleszczy *Ixodes ricinus* i *Dermacentor reticulatus*”. Celem planowanych badań jest identyfikacja różnic molekularnych pomiędzy badanymi gatunkami kleszczy, które mogą warunkować ich zdolność do transmisji krętków *Borrelia*. Prace będą obejmować analizę danych transkryptomicznych i proteomicznych, co może umożliwić identyfikację kluczowych różnic w odpowiedzi immunologicznej i mechanizmach molekularnych towarzyszących transmisji patogenu. Realizacja projektu pozwoli mi na rozwinięcie kompetencji w zakresie biologii molekularnej i analizy danych, a także umożliwi mi aktywną współpracę z innymi zespołami badawczymi w kraju i za granicą. W najbliższych latach zamierzam kontynuować działalność naukową w obszarze biologii molekularnej pasożytów i patogenów. Zdobyte doświadczenie i kompetencje zamierzam wykorzystać do dalszego doskonalenia warsztatu badawczego oraz rozwijania współpracy naukowej. W ramach projektu kontynuowana będzie współpraca z zespołem Instytutu Higieny i Medycyny Tropikalnej, Lizbona Portugalia, który będzie brał udział w analizie transkryptomicznej. Zaplanowane analizy proteomiczne będą wykonane we współpracy z Instytutem Badań Morskich Vigo, Hiszpania.