

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Analýza exprese tyrosin aminotransferázy a 4-hydroxyfenylpyruvát
dioxygenázy v klíčtécích tkáních a vývojových stádií pomocí RT-qPCR**

Bakalářská práce

Barbora Plačková

Školitel: Jan Perner Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Lenka Grunclová, Ph.D.

České Budějovice 2017

Plačková B., 2017: Analýza exprese tyrosin aminotransferázy a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy v klíštěcích tkáních a vývojových stádií pomocí RT-qPCR. [RT-qPCR analyse of tyrosine aminotransferase and 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tick tissues and tick development phases. Bc. Thesis, in Czech] - 44 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: Blood-feeding arthropods acquire and digest vast amounts of host blood meal, which often exceeds their body volume up to 100 times. Blood protein hydrolysis liberates amino acids which are recycled for *de novo* protein synthesis or are further catabolised. Transcripts encoding enzymes of tyrosine catabolism were found to be substantially enriched in digestive tract of blood-feeding hemipteran *Rhodnius prolixus*. This catabolic pathway was validated as a drug target by RNAi and viability assay with available inhibitors. In this bachelor thesis, I identified homologues of two genes encoding the first two enzymes of tyrosine catabolism, *tyrosine aminotransferase* and *4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase*, in the *Ixodes ricinus* tick and characterised their tissue expression patterns. Using RNAi, it was confirmed that HPPD is essential for tick survival after detachment of the host.

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

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

V Českých Budějovicích dne

.....

Barbora Plačková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala panu Petru Kopáčkovi, který se nebál a dovolil mi v jeho laboratoři získat cennou praxi v oboru a napsat tuto bakalářskou práci. Dále bych chtěla poděkovat svému školiteli Honzovi Pernerovi, který měl se mnou svatou trpělivost a i snahu mě něčemu naučit. Obrovské díky patří Lence Grunclové, která mi se vším pomohla a mnohdy velmi dobře poradila. Děkuji i svým rodičům za finanční podporu při studiu. Nemały dík také patří mým přátelům a to především slečně Pavlíně a mé drahé polovičce, kteří mi věřili a drželi ve mně vědeckého ducha. Těm všem upřímně děkuji.

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	2
2.1. Členovci a jejich přechod k parazitismu	2
2.1.1. Krevsající členovci	3
2.1.1.1. Roztoči	3
2.1.1.2. Klíště obecné	4
2.2. Zisk a degradace aminokyselin	5
2.2.1. Příjem a degradace hemoglobinu a albuminu u krevsajících členovců	6
2.2.2. Hlavní degradační dráha tyrosinu	7
2.2.3. Tyrosin aminotransferáza	11
2.2.4. 4-Hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza	12
3. Cíle práce	14
4. Materiály a metody	15
4.1. Klíšťata a získání tkání	15
4.2. Bioinformatická analýza	15
4.3. Izolace RNA a syntéza cDNA	15
4.4. RT-qPCR reakce	16
4.5. PCR reakce, elektroforéza a izolace z gelu	16
4.6. Klonování, transformace a získávání plazmidové DNA	17
4.7. Syntéza dvouvláknové RNA	18
4.8. RNA interference	21
5. Výsledky	22
5.1. Identifikace <i>tat</i> a <i>hppd</i> homologů v <i>I. ricinus</i>	22
5.2. Zjištění tkáňové exprese <i>tat</i> a <i>hppd</i>	24
5.3. Příprava dsRNA <i>tat</i> a <i>hppd</i> pro RNAi analýzu	26
5.3.1. Výsledky PCR reakce	26
5.3.2. Výsledky syntézy dvouvláknové RNA	27
5.4. RNAi <i>tat</i> a <i>hppd</i> a její ověření během a po sání dospělých samic klíšťat <i>I. ricinus</i>	28
5.5. Snížení <i>hppd</i> způsobuje zvýšenou mortalitu klíšťat po nasátí	33
6. Diskuze	34
7. Závěr	37
8. Seznam použité literatury	38

1. Úvod

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) patří mezi nejzávažnější nemoci-přenášející ektoparazity v Evropě. Na hostiteli saje krev několik dní (Volf & Horák, 2007). Střevo klíšťat je největším orgánem a slouží zejména ke skladování a trávení krve (Sonenshine, 1991) .

Trávení proteinové složky krve, zejména degradace hostitelského hemoglobinu a albuminu, probíhá ve střevních buňkách klíštěte (Sojka et al., 2013). Během zpracovávání krve dochází k velké produkci aminokyselin (Sterkel & Oliveira, 2017). Zejména degradace tyrosinu je citlivou dráhou pro některé krevsající členovce (ploštice, komár, klíště), jejíž narušení vede k letalitě během trávení hostitelské krve (Sterkel et al., 2016). Předpokládá se že, smrt je způsobena zvýšeným množstvím tyrosinu v hemolymfě a usazením tyrosinových krystalků v tkáních (Sterkel et al., 2016).

Bylo zjištěno, že ve střevě u krevsající ploštice *Rhodnius prolixus* byly během trávení přítomny v nadměrném množství transkripty kódující první dva enzymy degradační dráhy tyrosinu (tyrosin aminotransferázu a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázu) (Ribeiro et al., 2014).

Cílem této práce bylo provést bioinformatickou a laboratorní analýzu exprese tyrosin aminotransferázy (*tat*) a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy (*hppd*) v klíštěcích a vývojových stádií pomocí RT-qPCR. Jejich funkce a nezbytnost pro klíštěcí sání a reprodukci byla zkoumána pomocí metody RNAi.

2. Literární přehled

2.1. Členovci a jejich přechod k parazitismu

Členovci patří mezi druhově nejbohatší skupinu živočichů. Doposud je jejich počet odhadován přes milion druhů (Edward & Fox, 2004). Mezi nejznámější skupiny členovců patří klepítkatci (Chelicerata), korýši (Crustacea), stonožkovci (Myriapoda), šestinozí (Hexapoda) a nesmíme opomenout vymřelé mořské prvohorní živočichy trilobity (Sedlák, 2000).

Na první pohled je patrné charakteristické nestejnocenné (heteronomní) článkování těla (Kratochvíl, 1966). Tělo členovců je děleno na hlavu (cephalon), hrud' (thorax) a zadeček (abdomen). Jednotlivé segmentované články končetin jsou mezi sebou spojeny kloubem a kloubně jsou také připojeny k tělu (Sedlák, 2000).

Povrch těla je tvořen kutikulou obsahující α -chitin a proteiny. Za normálních podmínek je kutikula měkká, pružná, ale časem tvrdne. Dokonce může být sklerotizovaná nebo inkrustovaná a tím se podílí zejména na vnější opoře těla - exoskeletu. Tato povrchová vrstva těla je pravidelně svlékána. Proces ekdyse je řízen růstovými hormony - svlékáci hormon ekdyson (Edward et al., 2004).

V průběhu evoluce se u členovců několikrát objevil parazitický způsob získávání potravy. Na Zemi žije více než milion druhů členovců, z nichž pouze asi 14 000 druhů je schopno paraziticky sát krev na obratlovcích. Tento údaj naznačuje existenci závažných fyziologických omezení při vývoji tzv. hematofágie (Graça-Souza et al., 2006).

Hematofágní chování se u mnoha skupin členovců vyvinulo nezávisle. Příkladem jsou krevsající vši a blechy, jejichž monofyletická povaha, získaná od mnoha linií předků, je nezpochybnitelná (Mans, 2011).

První překážkou, se kterou se musí hladový krevsající živočich vypořádat, je proniknutí do pokožky hostitele a poškození dostatku krevních cév k uvolnění krve. Nevyhnutelnou překážkou je hemostáza. Jedná se o účinný obranný mechanismus hostitele, který zabraňuje ztrátě krve otevřenou ránou (Mans & Neitz, 2004). Další, ne úplně zřejmou překážkou v hematofáгии je vysoké množství hemoglobinu samotného. Hemoglobin (Hb) je nejhojnějším proteinem v krvi savců. Sám o sobě představuje asi 60% všech bílkovin v krvi. Degradaci Hb v trávicím systému krevsajících živočichů má sice za následek uvolnění velkého množství aminokyselin, důležitých pro tvorbu vaječných bílkovin (vitelogenezi), ale zároveň i velmi vysoké koncentrace hemu, které mohou působit cytotoxicky (Graça-Souza et al., 2006).

V neposlední řadě parazitismus a jeho vývoj také úzce souvisel s vývojem transportního systému živin po těle parazitujícího jedince (Mans, 2011).

2.1.1. Krevsající členovci

Parazitické členovce dělíme na parazity dočasné (temporární) a trvalé (permanentní). Permanentní parazité (vši, kloši) sají na hostiteli opakovaně a po celý svůj životní cyklus. Mezi dočasně krevsající ektoparazity řadíme roztoče, ploštice, dvoukřídlý hmyz a blechy. Tito krevsající zástupci bývají často označováni jako mikropredátoři (Volf & Horák, 2007).

Hostitele vyhledávají za účelem sání krve. Samotný proces sání může trvat několik minut (dvoukřídlí), ale i několik dní (klíšťata). K sání krve jsou tyto rody přizpůsobeni kousacím nebo bodavě sacím ústním ústrojím. Krevsající parazité velmi často přenášejí závažné nemoci (lymeskou boreliózu, klíšťovou encefalitidu, Chagasovu nemoc, malárii aj.) (Hübner, 1995).

2.1.1.1. Roztoči (Acari)

Roztoči jsou velmi početnou skupinou bezobratlých živočichů. Způsob parazitizmu u roztočů, jaký známe dnes, je znám již z fosilních nálezů starých přibližně 400 milionů let (Mans, 2011). Tělo roztočů můžeme rozlišit na dvě odlišné části. Část ústní (gnathonoma) nese ústní končetiny (klepítka, chelicery) uzpůsobené k příjmu potravy. Na zadní části těla (idiosoma) jsou končetiny a mohou být přítomny i oči. Roztoči dýchají vzdušnicemi, které ústí na povrchu otvory tzv. stigmaty. Na základě stigmat rozlišujeme čtyři podřády (Tab. I) (Volf & Horák, 2007).

Tab. I: Systematický přehled hlavních skupin roztočů.

Acariformes		
Astigmata (stigmata chybí)	Zákožkovci (Sarcoptiformes)	Zákožky (Sarcoptidae) Skladokazi (Acarididae)
Prostigmata (na přední část těla)	Sametkovci (Actinedida)	Trudníci (Demodicidae) Sametky (Trombiculidae)
Parasitiformes		
Mesostigmata (na bocích těla podél 2. až 4. pár nohou)	Čmelíkovci (Gamasida)	Čmelíci (Dermanyssidae) Kleštíci (Varroidae)
Metastigmata (za 4. párem nohou)	Klíšťatovci (Ixodida)	Klíšťata (Ixodidae) Klíšťáci (Argasidae)

2.1.1.2. Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

Klíště obecné je velmi běžný krevsající ektoparazit, patřící do třídy roztočů. Objevují se již na začátku dubna a aktivní jsou až do konce října (Motyčka & Roller, 2001). Dospělci mají na hřbetní části těla viditelný tvrdý štítek (scutum). Zatímco sameček je tmavý a má štítkem pokryté téměř celé tělo, samička je zbarvena více do oranžova a štítek jí zasahuje pouze do třetiny těla. Samička tedy může mnohonásobně zvětšit svůj objem při sání krve a zajistit tak dostatek potravy pro tvorbu vajíček (Ryšavý, 1989).

Hladová klíšťata čekají na svého hostitele na vrcholu vegetace, například na travních stéblech (Kerles, 2015). Jelikož jsou klíšťata slepá, důležité jsou pro ně chemické signály. Hostitele vyhledávají pomocí Hallerova orgánu, umístěného na konci článku prvního páru nohou. Jedná se o složitý senzorický orgán, který je schopen detekovat různé vůně, vlhkost, teplotu, mechanické podněty a množství oxidu uhličitého (Sonenshine, 1991).

Pro zástupce čeledě Ixodidae je charakteristický tzv. tři-hostitelský cyklus. Během svého vývoje (larva-nymfa-dospělec) vystřídají tři různé hostitele, na kterých sají několik dní krev. Po jejich opuštění, se přemění na vyšší vývojové stádium, popř. dospělá samice naklade vajíčka (Ryšavý, 1989). Některé druhy klíšťat však po nasátí na svém hostiteli zůstávají a mluvíme tak o dvou- či dokonce jedno-hostitelských klíšťatech (Volf & Horák, 2007). Změna hostitele hraje důležitou roli v přenosu nemocí (klíšťová encefalitida) (Horn et al., 2009).

Samci *I. ricinus* krev nesají, a na hostiteli dochází ke kopulaci se samicí. Pohlavní buňky samec předává pomocí hypostomu přímo do pohlavního otvoru samice (Obenchain & Galun, 1982).

Po vyhledání hostitele a nasátí krve, dochází k jejímu zpracování. Na rozdíl od ostatních hematofágních členovců, kdy je krev trávena extracelulárně a poměrně rychle (Billingsley, 1990), samotný proces trávení krve u klíšťat probíhá pomalu a intracelulárně (heterofágie) ve střevních buňkách.

Střevo jako největší orgán slouží zejména jako zásobárna krve (Sonenshine, 1991). Během trávení krve dochází k degradaci zejména hemoglobinu a albuminu. Tato degradace u klíšťat je způsobena aktivitou souboru cysteinových (katepsin B, L, C, legumain) a aspartátových proteáz (katepsin D) (Sojka et al., 2013). Degradací hemoglobinu se uvolňuje velké množství hemu, které může být pro klíště nežádoucí kvůli jeho potenciálu vytvářet oxidativní stres. Klíšťata nejsou schopna vlastní biosyntézy hemu (Braz et al., 1999). Využívají pouze malou část paraziticky získaného hemu, která je ukládána do endogenních hemoproteinů. Nedostatek hemu vede k potlačení embryogeneze (Perner et al., 2016).

2.2. Zisk a degradace aminokyselin

Krevsající členovci (zejména komáři, ploštice a klíšťat) jsou nuceni trávit velké množství živin z nasáté krve hostitele, která je velmi bohatá především na bílkoviny. Při trávení dochází k velké produkci volných aminokyselin (Tab. II) (Sterkel & Oliveira, 2017). Úloha metabolismu aminokyselin hraje velmi významnou roli i v regulaci reprodukce a imunity. Metabolity specifických aminokyselin jsou důležité pro tvorbu a zrání vaječného obalu-chorionu (Fuchs et al., 2014). Proces melanizace je zodpovědný za tvorbu chorionu. Produkce melaninových pigmentů představuje jedinečnou vrozenou imunitní odpověď v reakci proti patogenu či parazitu v říši členovců (Li, 1994).

Tab. II: Procentuální zastoupení aminokyselin hlavních proteinů hostitelské krve podle (Sterkel & Oliveira, 2017).

Hemoglobin ($\alpha+\beta$)		Albumin	
Leucin	12,55%	Leucin	10,51%
Alanin	11,74%	Alanin	10,34%
Valin	9,72%	Kyselina glutamová	10,18%
Lysin	7,69%	Lysin	9,85%
Glycin	6,88%	Valin	7,06%
Serin	6,48%	Kyselina asparagová	5,91%
Histidin	6,07%	Fenylalanin	5,75%
Threonin	6,07%	Cystein	5,75%
Kyselina asparagová	6,07%	Threonin	4,76%
Fenylalanin	5,26%	Serin	4,60%
Prolin	4,86%	Arginin	4,43%
Kyselina glutamová	4,45%	Prolin	3,94%
Asparagin	3,24%	Glutamin	3,28%
Arginin	2,43%	Tyrosin	3,12%
Methionin	2,02%	Asparagin	2,79%
Tyrosin	1,62%	Histidin	2,63%
Tryptofan	1,21%	Glycin	2,13%
Cystein	0,81%	Isoleucin	1,48%
Glutamin	0,81%	Methionin	1,15%
Isoleucin	0,00%	Tryptofan	0,33%

2.2.1. Příjem a degradace hemoglobinu a albuminu u krevsajících členovců

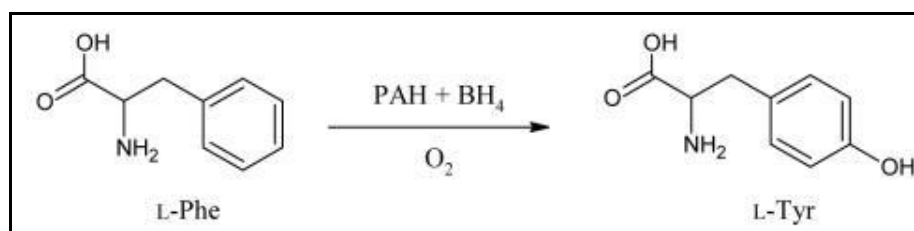
Na primární kultuře klíčících střevních buněk bylo demonstrováno, že hemoglobin a albumin je získáván do trávicích střevních buněk různými způsoby. Zatímco albumin je získáván nespecifickou endocytózou/pinocytózou, hemoglobin je zřejmě internalizován pomocí receptoru určující endocytózu (Lara et al., 2005).

Při trávení krve probíhá degradace hemoglobinu a albuminu (Sojka et al., 2016). S degradací hemoglobinu je spojeno uvolňování nadměrného množství hemu, které je pro hematofágy škodlivé (Sojka et al., 2013). Hem, hlavní složka hemoglobinu, katalyzuje tvorbu volných kyslíkových radikálů a navíc dokáže reagovat s fosfolipidovými membránami a narušit tak jejich struktury (Lara et al., 2003). S degradací hemoglobinu (hemu) se hematofágní zástupci vyrovnávají různým způsobem. Evolučně vzniklo hned

několik mechanismů zaměřených na detoxikaci hemu (Paiva-Silva et al., 2006 ; Graca-Souza et al., 2006). Zástupci rodu *Rhodnius* ukládají přebytečný hem v podobě krystalických struktur (Oliveira et al., 1999). Komáři (*Aedes aegypti*) dokáží hem přeměnit v odlišný produkt, který dále zpracovávají (Pereira et al., 2009). Klíšťata jsou schopna ukládat hem do speciálních organel zvaných hemosomy nebo-li residuální tělíska (Lara et al., 2003).

2.2.2. Hlavní degradační dráha tyrosinu

Prekurzorem pro tyrosin je fenylalanin. Jedná se o základní esenciální aminokyselinu nezbytnou pro syntézu bílkovin, která je přijímána v potravě. Para-hydroxylation je fenylalanin přeměňován na tyrosin (Obr. 1). Tato přeměna je katalyzována enzymem fenylalanin hydroxylázou (PAH). Alternativní metabolismus L-fenylalaninu probíhá dekarboxylací nebo transaminací za vzniku produktů, které se vylučují močí (Williams et al., 2008).



Obr. 1: Přeměna L-fenylalaninu na L-tyrosin. Reakce je zúčastní enzym fenylalanin hydroxyláza (PAH), kofaktor (tetrahydrobiopterin) BH_4 a molekulární kyslík (Williams et al., 2008).

Genetické poruchy degradace fenylalaninu a tyrosinu vyvolávají u lidí řadu závažných onemocnění (např. fenylketonurie, tyrosinémie typ I, typ II a typ III) (Scott, 2006). Deficit právě zmiňovaného enzymu PHA u člověka vede k vážnému onemocnění, fenylketonurii (Widaman, 2010). Fenylketonurie je autosomálně recesivně dědičné onemocnění a většina jejích forem je způsobena mutacemi na chromosomu 12q23.2. Charakteristickým znakem je selhání růstu, špatná pigmentace pokožky, mikrocefalie, záchvaty, závažné trvalé poruchy mozku vedoucí až k mentální retardaci (Williams, Mamotte, & Burnett, 2008). V lidském těle se tak zvyšuje hladina fenylalaninu a naopak snižuje obsah tyrosinu v krvi (Widaman, 2010).

Genetické tyrosinémie jsou charakterizovány akumulací tyrosinu v tělních tekutinách a tkáních. Nejtěžší formou tyrosinémie je tyrosinémie typ I. Typickým znakem je porucha dětství, bolestivé neurologické obtíže, rachitida, často hepatokarcinom vedoucí k selhání jater. Toto onemocnění je způsobeno nedostatkem fumarylacetoacetát hydrolázy (FAH). Nemoc se projevuje brzy po narození, a pokud se neléčí, úmrtí

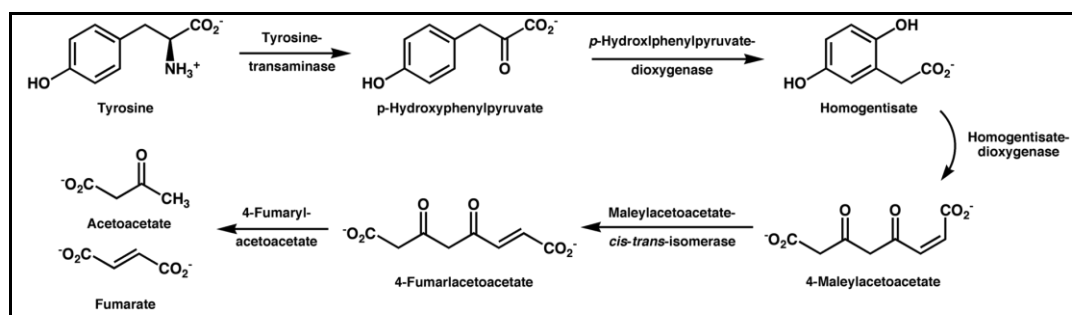
následuje do dvou let pacienta. Frekvence tohoto onemocnění je přibližně 1 na 100 000 novorozenců v celkové populaci. Léčbou je myšleno zejména dodržování přísné diety s nízkým obsahem fenylalaninu a tyrosinu pro každou z tyrosinemií a 2-(2-nitro-4-trifluormethylbenzoyl)-1, 3-cyklohexandionu (nitisinon, NTBC) pro tyrosinémii typ I (Scott, 2006).

Tyrosin (Obr. 2) je semi-esenciální aminokyselina, která vzniká hydroxylací z fenylalaninu nebo se získává přímo z potravy (Sterkel & Oliveira, 2017). Je také důležitým prekurzorem klíčových neurotransmiterů a hormonů, včetně epinefrinu, norepinefrinu a dopaminu (Widaman, 2010). Eukaryotické bílkoviny, včetně proteinů vyskytujících se v krvi nejsou zvláště bohaté na tyrosin (cca 3% ze všech aminokyselin) (Kopáček & Perner, 2016).

Odbourávání tyrosinu probíhá v následujících pěti dílčích reakcích, které vedou ke konečným produktům a to k fumarátu a k acetoacetátu (Obr. 2). V hlavní degradační dráze tyrosinu je zahrnuto pět důležitých enzymů (Tab. III) (Voet et al., 2006), z nich každý je kódován jedním genem (Kopáček & Perner, 2016).

Tab. III: Enzymy zahrnuté v degradaci tyrosinu.

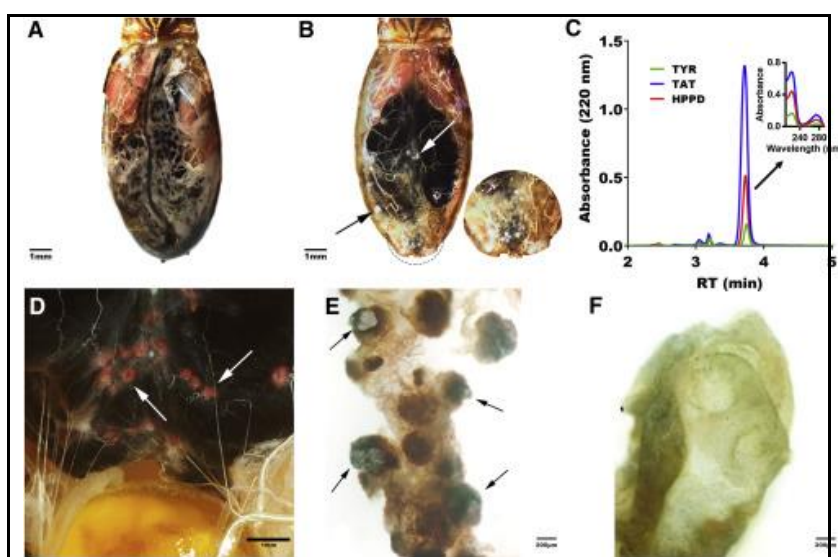
Tyrosinová aminotransferáza (TAT)
p-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza (HPPD)
Homogentisát dioxygenáza
Maleylacetoacetát izomeráza
Fumarylacetoacetát hydroláza (FAH)



Obr. 2: Hlavní degradační dráha tyrosin (<https://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosine#Metabolism>).

U krevsajících živočichů dochází během zpracování krve k velké produkci volných aminokyselin (Tab. II) (Sterkel & Oliveira, 2017). Ukázalo se, že pro samotné přežití těchto organismů je nezbytná nejen účinná degradace proteinů, ale i fungující katabolismus tyrosinu (Kopáček & Perner, 2016). Zatímco katabolická dráha tyrosinu u savců je soustředěna pouze do jater a ledvin, u krevsajících členovců konkrétně u plošnice *R. prolixus* byly detekovány potřebné enzymy pro tento katabolismus ve všech tkáních a

to především ve střevě (Sterkel et al., 2016). Bylo zjištěno, že ve střevě krevsajících ploštice byly během trávení přítomny v nadměrném množství právě první dva enzymy degradační dráhy tyrosinu (tyrosin aminotransferáza a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza) (Ribeiro et al., 2014). Nedostatek těchto enzymů u tohoto krevsajícího hmyzu není slučitelný se životem. Předpokládá se, že smrt je způsobena zvýšeným množstvím tyrosinu v hemolymfě a usazením tyrosinových krystalků v tkáních (Obr. 3). Nejvíce postiženou tkání je střevo, kde jsou patrné viditelné krystalky tyrosinu, které mohou narušit epitel tkáně a tím způsobit smrt jedince (Sterkel et al., 2016).



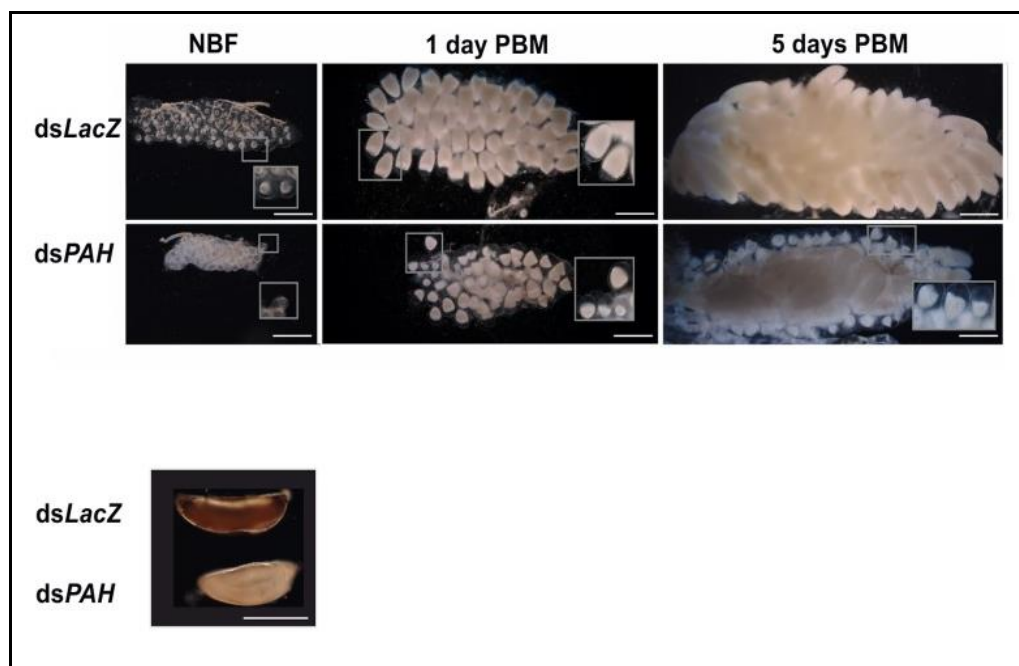
Obr. 3: Utlumení exprese enzymů tyrosinové aminotransferázy (TAT) a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázi (HPPD) v degradační dráze tyrosinu u ploštice *Rhodnius prolixus*. **A:** Kontrola - injekce dsMAL 7 dní po dokončení sání (PBM = post-bloodmeal). **B:** Utlumení exprese HPPD pomocí injekce dsRNA *hppd*, 7. den PBM. Šipky naznačují viditelné bílé krystalky. **C:** Bílé krystalky byly ručně vyzolovány, omyty, rozpuštěny ve vodě a byla provedena jejich identifikace kapalinovou chromatografií jako tyrosin. **D:** Utlumení exprese TAT pomocí injekce dsRNA *tat*, 4. den PBM. Šipky naznačují krystalky tyrosinu, lokalizované v přední části střeva, interagující se střevním epitelem. **E:** Přední část střeva po utlumení exprese TAT. Viditelné tyrosinové krystalky uvnitř epitelu. **F:** Přední část střeva bez krystalků tyrosinu u kontrolní ploštice (Sterkel et al., 2016).

Dalším příkladem krevsajícího členovce je komár rodu *Anopheles*, vektor malárie. Opakovaným sáním krve zvyšují samičky komárů nejen svou reprodukční kapacitu, ale i potenciál přenosu nemoci díky šíření parazitů rodu *Plasmodium* od hostitele k hostiteli. Velmi významnou roli v reprodukci a v imunitě hraje právě tyrosin. Jeho metabolity jsou důležité pro tvorbu a zrání vaječného obalu-chorionu. Tyrosin, který je součástí potravy nebo získán přeměnou z fenylalaninu, je považován za významný faktor v melanizační reakci (Fuchs, 2014).

Produktem, vedlejší degradační dráhy tyrosinu, je dopamin (prekurzor melaninu). Zároveň je také silným neurotransmiterem, který musí být přísně regulován. Narušení regulace přeměny aminokyselinových prekurzorů, jako je právě fenylalanin a tyrosin, na

dopamin vede k poruchám chování (především u obratlovců) a ke snížení životaschopnosti organismů (Williams et al., 2008).

Utlumením fenylalanin hydroxylázy (*pha*) u komára *Anopheles gambiae* mělo za následek nedokončený proces dozrávání vajíček s výrazně nižším obsahem žloutku. Enzym PHA významně ovlivňuje počet a vývoj vajíček. Nedostatek tyrosinu a dopaminu se u samic projeví přerušáním melanizace chorionu (Obr. 4) (Fuchs et al., 2014).



Obr. 4: Utlumení enzymu fenylalanin hydroxylázy (*pha*) vede ke snížení plodnosti komára *Anopheles gambiae*. Po injekci dsRNA *pha* (double-strand RNA pro fenylalanin hydroxylázu) a dsLacZ (double-strand non-related bacterial gene) jako kontroly byla provedena disekce ovárií (N = 6 na jeden časový interval, NBF = Non-blood-fed = nenásáté samice, 1 day PBM = 1 day post-blood-meal = 1 den po nasátí, 5 days PBM = 5 days post-blood-meal = 5 dnů po nasátí). Ovária samic injikovaným dsRNA *pha* byly výrazně menší. Zároveň ovária u samic 5 days PBM obsahovaly velké množství nevyvinutých vajíček. U samic, injikovaných dsRNA *pha*, byla pozorována nemelanizovaná vajíčka (špatná biosyntéza melaninu) (Fuchs et al., 2014).

Pro ověření fyziologické důležitosti fungující degradace tyrosinu u klíšťat, které jsou rovněž nuceni pro svůj vývoj zpracovávat velké množství krve, bylo vybráno modelové klíště obecné (*I. ricinus*).

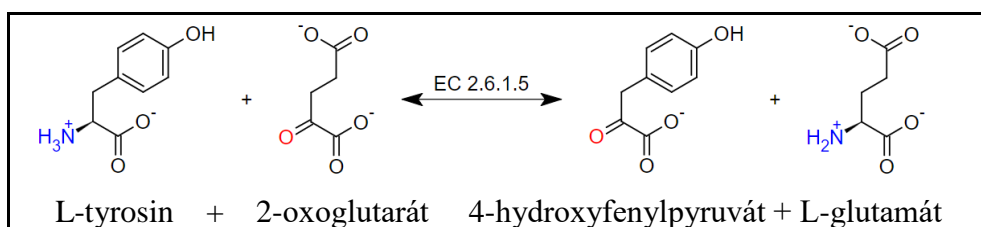
2.2.3. Tyrosin aminotransferáza

Enzym tyrosin aminotransferáza (TAT) je enzym katalyzující přeměnu tyrosinu na 4-hydroxyfenylpyruvát (Obr. 5) (Voet et al., 2006).

Nedostatek tohoto enzymu u člověka může vést k onemocnění zvané tyrosinémie typ II (Richner-Hanhart syndrom, RHS). Dochází ke hromadění tyrosinu v důsledku nepodléhání aminotransferázové reakci (Rettenmeier et al., 1990). Toto onemocnění je autosomálně recesivně dědičné a charakterizované zvýšenou hladinou tyrosinu v krvi, mentální retardací a keratitidou (Natt et al., 1992).

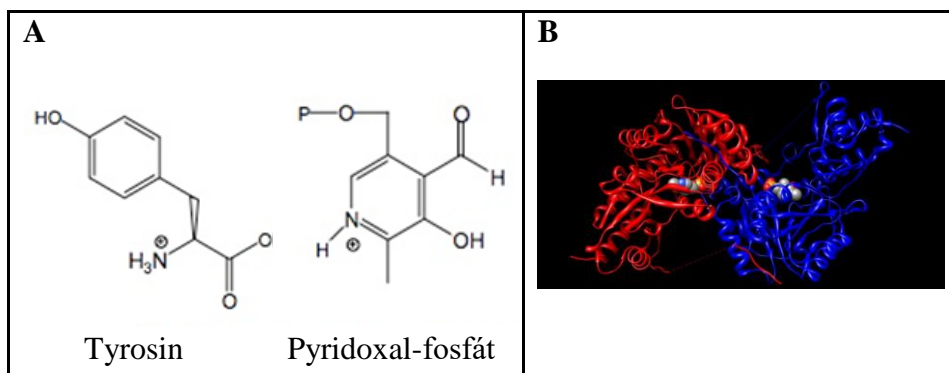
Keratitida u pacientů s tyrosinémií typu II je způsobena ukládáním tyrosinových krystalů do rohovky a vede později k zánětu rohovky (Minami-Hori et al., 2017).

Gen *tat* se nachází na lidském chromozómu 16q22-24 a doposud je popsáno dvanáct rozdílných genových mutací (Rettenmeier et al., 1990).



Obr. 5: Přeměna L-tyrosinu na 4-hydroxyfenylpyruvát v přítomnosti enzymu tyrosin aminotransferázy (https://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosine_aminotransferase).

V první fázi degradační dráhy tyrosinu je zapotřebí přítomnost samotné molekuly tyrosinu a molekuly pyridoxal-fosfátu (Obr. 6A). Průběh této chemické reakce (transaminace) je katalyzován tyrosin aminotransferázou a výsledným produktem je molekula 4-hydroxyfenylpyruvátu (Voet et al., 2006). Enzym TAT je dimer (Obr. 6B) a každý monomer obsahuje pyridoxal-fosfát (PLP), který je kovalentně vázaný na zbytek molekuly lysinu tyrosin aminotransferázy (Moreno et al., 2014). Výsledkem transaminace mezi tyrosinem jako donorem aminové skupiny a pyruvátem jako aminoakceptorem je p-hydroxyfenylpyruvát (HPP). Pyruvát dále reaguje za vzniku alaninu (Moreno et al., 2014).



Obr. 6: A: Struktury dvou hlavních molekul zapojených do chemické reakce katalyzované enzymem tyrosin aminotransferázy (<https://en.wikipedia.org/wiki/File:3strucfinal.jpg>).

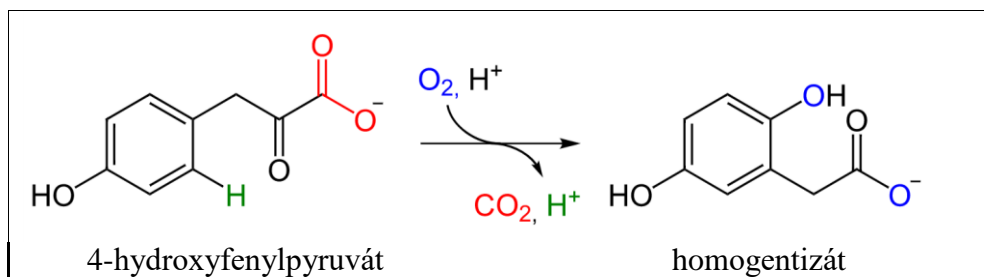
B: Schéma dimeru tyrosin aminotransferázy. Pyridoxal fosfát (PLP) je viditelný u obou monomerů. (https://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosine_aminotransferase#/media/File:DimerTAT.jpg).

2.2.4. 4-Hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza

Enzym 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza (HPPD) je enzym katalyzující především přeměnu 4-hydroxyfenylpyruvátu na homogentisát (Obr. 7) (Voet et al., 2006). Dále také katalyzuje konverzi fenylpyruvátu na 2-hydroxyfenylacetát (Kohlmeier, 2015).

Změny v aktivitě i struktuře HPPD jsou u člověka spojeny se dvěma různými metabolickými poruchami, tyrosinemií typu III a hawkinsinurií. Nedostatek tohoto enzymu vede k onemocnění zvané tyrosinémie typ III. Jedná se o extrémně vzácnou autozomálně recesivní nemoc (Tomoeda et al., 2017), charakterizovanou ataxií, mentální retardací, zhoršeným zrakem a nadměrným vylučováním derivátů tyrosinu do moči (Scott, 2006). Hawkinsinurie je autosomálně dominantní porucha charakterizovaná vylučováním "hawkinsinu". Hawkinsin je síru obsahující aminokyselina se systematickým názvem (2-l-cystein-S-yl, 4-dihydroxycyklohex-5-en-1-yl) octová kyselina. Pacienti s hawkinsinurií vylučují tento metabolit ve své moči po celý svůj život, i když se symptomy metabolické acidózy a tyrosinémie v prvním roce života zlepšují (Tomoeda et al., 2017).

S genetickou poruchou *hppd* je také spojována jedna nejstarší známá metabolická porucha známá jako alkaptonurie, která je způsobena nízkou hladinou homogentisátu v krevním oběhu (Garrod, 1902).



Obr. 7: Přeměna 4-hydroxyfenylpyruvátu na homogentizát v přítomnosti enzymu 4-hydroxyfenylpyruvátu dioxygenázy (https://en.wikipedia.org/wiki/4-Hydroxyphenylpyruvate_dioxygenase).

Enzym HPPD má obvykle u prokaryot strukturu homotetramerů, avšak u eukaryot představuje homodimery (Obr. 8) (Rijksen & Staal, 1976). U eukaryotních organismů se *hppd* používá zejména k regulaci hladiny tyrosinu v krvi, avšak u rostlin je tento enzym využíván pro výrobu kofaktorů plastochinonu a tokoferolu-složky chloroplastu u vyšších rostlin (Gunsior et al., 2004), které jsou nezbytné pro přežití rostliny (Goodwin & Mercer, 1983). Inhibitory enzymu HPPD mají velký zemědělský význam jako účinné herbicidy (Huber et al., 2004). Je zajímavé, že molekuly HPPD mají i terapeutický účinek na řadu vrozených vad v degrační dráze tyrosinu (tyrosinémie typ I). Brání akumulaci toxických metabolitů (Moran, 2005).



Obr. 8: Schéma homodimer 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy. Červená barva schématu představuje katalytickou doménu obsahující železo (šipky naznačují oblasti s Fe^{2+} - oranžová kulička). Modrá barva představuje oligomerní doménu (https://en.wikipedia.org/wiki/4-Hydroxyphenylpyruvate_dioxygenase).

3. Cíle práce

1. Shromáždění a sepsání současné relevantní literatury.
2. Získání celé sekvence genů *tat* a *hppd* z klíštěte *I. ricinus*.
3. Mikrodisekce tkání klíštěte *I. ricinus*.
4. Extrakce totální RNA a syntéza cDNA.
5. RNA a DNA elektroforetická separace.
6. PCR, RT-qPCR.
7. Klonování, syntéza dsRNA a fenotypizace RNAi-klíšťat.

4. Materiály a metody

4.1. Klíšťata a získání tkání

Samice klíšťat *I. ricinus* byly nechány sát na laboratorních morčatech. Na záda morčat byl připevněn pryžový klobouček a posléze uzavřen síťovinou. Po uplynutí předem stanovených časových intervalů byla klíšťata odebrána a pod binokulárním stereomikroskopem Stemi DV4 (Zeiss) byly vypitvány jednotlivé tkáně (Tab. IV). Tkáně byly důkladně promyty v roztoku PBS v diethyl pyrokarbonát vodě (DEPC voda), přeneseny do RA1 pufru s beta-merkapt ethanolom (143 mM) z kitu NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) a zhomogenizovány pomocí 29G insulinové stříkačky.

Tab. IV: Časové intervaly sání a jednotlivé tkáně. 3D = 3 denní klíšťata, FF = plně nasátá klíšťata, GT = intervaly sání klíšťat pouze pro střevo, GUT = střevo, SG = slinné žlázy, OV = ovária, TR = tracheje, MT = Malphigiho trubice, REST = zbytek, UF = nenásátá klíšťata, 3D = 3 denní klíšťata, 5D = 5 denní klíšťata, FF = plně nasátá klíšťata, 2AD = 2 dny po ukončení sání, 6AD = 6 dní po ukončení sání.

3D	GUT, SG, OV, TR, MT, REST
FF	GUT, SG, OV, TR, MT, REST
GT	UF, 3D, 5D, FF, 2AD, 6AD

4.2. Bioinformatická analýza

Kompletní sekvence genů *tat* a *hppd* z *I. ricinus* byly získány pomocí serveru National Center for Biotechnology (NCBI). Sekvence byly nalezeny pomocí programu blast v dostupných databázích klíštěte *I. ricinus*. Identifikované sekvence genů *tat* a *hppd* z klíštěte *I. ricinus* byly porovnávány v Bioeditu pomocí ClustelW programu s dostupnými sekvencemi *Ixodes scapularis*, *Rhodnius prolixus*, *Aedes aegypti*, *Arabidopsis thaliana* a *Homo sapiens*.

4.3. Izolace RNA a syntéza cDNA

Z připravených vzorků (Tab. IV) byla izolována totální RNA podle protokolu dodavatele (Macherey-Nagel). Posléze byla syntetizována cDNA z oligo-dT primerů pomocí kitu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche), jejímž templátem byla použito 200 ng vyizolované RNA.

4.4. RT-qPCR reakce

Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) byla použita pro identifikaci relativního množství mRNA a analýzu exprese *tyrosin aminotransferázy (tat)* a *4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy (hppd)* v klíčtčích tkáních a vývojových stádiích (Tab. IV). Reakce byly provedeny v technických triplikátech. S použitím Master mix FastStart Universal Sybr Green Master (Roche) byly připraveny reakční směsi (Tab. V). Reakce probíhaly vždy v 50 cyklech v přístroji LightCycler 480 (Roche). Výsledné C_t hodnoty byly zaznamenány díky programu LightCycler 480 Software release 1.5.0 SP4 (Roche).

Získaná data byla vyhodnocena pomocí delta ct metody (Excel, GraphPad Prism6). Relativní hladina *tat* a *hppd* byla normalizována relativní hladinou referenčního (tzv. *housekeeping*) genu, *elongačního faktoru (ef)*.

Tab. V: Reakční směs pro 1 PCR reakci.

Master Mix	12,50 μ l
Primery (100 μ M)	0,15 μ l
Templát + sterilní H ₂ O	12,20 μ l

4.5. PCR reakce, elektroforéza a izolace z gelu

PCR reakce byla prováděna s Taq Purple polymerázou (Top-Bio), s navrženými primery (Tab. VI) a vhodným cDNA templátem v přístroji T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Reakce probíhaly ve 25–30 cyklech. Získané PCR produkty byly separovány pomocí elektroforézy v agarózovém gelu (1% agaróza v 1x Tris-acetát-EDTA pufu (TAE), ethidium bromid 0,5 μ g/ml) probíhající cca 25 minut při konstantním napětí 100 V. V UV transiluminátoru pomocí UV záření byly separované produkty zviditelněny.

Tab. VI: Seznam použitých primerů. Podtržená restrikční místa pro ApaI a XbaI.

Primery pro qRT-PCR	
TATqPCRforw	5'TGG CTG ACG AAG TGT ACC AA-3'
TATqPCRrew	5'ATA GGG CGA CCC CAT TTC-3'
HPPDqPCRforw	5'GGA ACG TGG CAT GGA GTT-3'
HPPDqPCRrew	5'ACT GTG ATC TTG GCG GTC TT-3'
Primery pro RNAi	
TATRNAiforw	5' <u>atg ggc cc</u> A GGT GAA GAA GGT CCT GCT C-3'
TATRNAirew	5' <u>att cta ga</u> C GTT CCT TCA GCG AAC TCA G-3'
HPPDRNAiforw	5' <u>atg ggc cc</u> T GTG CTA CAA GGG TCT GGA G-3'
HPPDRNAirev	5' <u>att cta ga</u> G AAA GTG TGG GTC GTG TCT C-3'
Primery pro sekvenaci	
M13forw	5'GTAAAACGACGGCCAG-3
M13rev	5'CAGGAAACAGCTATGAC-3'

4.6. Klonování, transformace a izolace plazmidové DNA

Produkt, získaný pomocí standardní PCR reakce, byl vyříznut z gelu a posléze vyčištěn pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) a eluován do 20 µl PCR H₂O. Takto získaný produkt byl s použitím kitu TOPO TA Cloning Kit For Sequenci ng (Life technologies) ligován do vektoru pCR 4-TOPO. Metodou Heat Shock (teplotní šok, 42 °C) byl plazmid zatransformován do kompetentních buněk One Shot TOP10 Chemically Competent *Escherichia coli* (Lifetechnologies). K buňkám bylo přidáno 200 µl S.O.C. média a byly inkubovány cca 45 minut ve 37 °C. Po uplynutí časového intervalu byly buňky rozetřeny na agarovou plotnu (1,5% agar v LB médiu, ampicilin 50 µg/ml) a inkubovány přes noc ve 37 °C.

Úspěšnost transformace byla ověřena pomocí PCR z jednotlivých kolonií (použity primery pro RNAi a sekvenaci) (Tab. VI). Jednotlivé kolonie bakterií byly resuspendovány ve 20 µl PCR H₂O, přičemž vždy 1 µl byl použit jako templát do 10 µl PCR reakce o 25–30 cyklech. Pozitivní klony byly posléze přidány do 4ml LB/*amp* média (LB médium: 1% trypton, 0,5% kvasnicový extrakt, 0,5% NaCl, pH 7,0; ampicilin-*amp*: 50 µg/ml) a opět inkubovány přes noc (220 RPM, 37 °C). Plazmidová DNA byla získána pomocí kitu High Pure Plasmid Isolation kit (Roche) a eluována do 50 µl PCR H₂O a poté sekvenována.

4.7. Syntéza dvouvláknové RNA

Syntéza dvouvláknové RNA (dsRNA) byla provedena následovně:

Z ovárií plně nasátých samic *I. ricinus* (zjištěna největší exprese) byl z cDNA pomocí PCR (Tab. VII) amplifikován fragment genu *tat* o velikosti 92 bp. Ze slinných žláz z 3D samic *I. ricinus* (opět největší exprese) byl z cDNA amplifikován fragment genu *hppd* o velikosti 84 bp. Navržené primery (Tab. V) obsahovaly restriční místa pro *ApaI* a *XbaI*.

Tab. VII: PCR reakce o objemu 50 μ l.

Buffer	5 μ l
dNTP	1 μ l
Primery (100 μ M)	0,5 μ l
Taq Purple polymeráza	4 μ l
Templát + sterilní H ₂ O	39 μ l

Přečištěný PCR produkt byl ligován do vektoru *pl10*. Restriktce samotného plazmidu a získaného PCR produktu pro ligaci byla provedena následovně (Tab. VIII):

Tab. VIII: Restriktce plazmidu a PCR produktu.

Restriktce plazmidu <i>pl10</i> (30 μ l)	
Buffer TA NGO 10x	3 μ l
Enzym (<i>ApaI</i> , <i>XbaI</i>)	1+1 μ l
DNA	3 μ l
Sterilní H ₂ O	22 μ l
Restriktce PCR produktu (30 μ l)	
Buffer TA-NGO 10x	3 μ l
Enzym (<i>ApaI</i> , <i>XbaI</i>)	1+1 μ l
DNA	20 μ l
Sterilní H ₂ O	5 μ l

Obě restriční reakce byly inkubovány ve 37 °C po dobu 2 hodin. Po přečištění restričních směsí pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) byl PCR produkt zaligován do vektoru *pl10* (Tab. IX).

Tab. IX: Příprava ligační směsi 10 μ l.

Buffer 2x	5 μ l
Šťípnutý plazmid p110	2 μ l
DNA	2 μ l
T4 ligáza	1 μ l

Ligační směs byla inkubována hodinu při laboratorní teplotě a následovně přes noc ve 4 °C. Metodou Heat Shock (teplotní šok, 42 °C) byl plazmid zatransformován do 50 μ l kompetentních buněk TOP10 (Life technologies). Následně po kultivaci buněk byla provedena izolace plazmidové DNA pomocí kitu High Pure Plasmid Isolation kit (Roche) a ověřeny pozitivní klony. Osekvenovaný pozitivní klon byl kultivován ve 100ml LB média. Plazmid byl izolován pomocí kitu Nucleo Bond Xtra Midi (Macherey-Nagel). Plazmid, který obsahoval sekvenci amplifikovaného úseku *tat* a *hppd* byl linearizován ve dvou oddělených 50 μ l restrikčních reakcích (Tab. X).

Tab. X: Reakční směs pro lineární plazmid.

10 μ g plazmidu	x μ l
Buffer TA NGO	5 μ l
Enzym ApaI	6 μ l
Enzym XbaI	6 μ l
Sterilní H ₂ O	do 50 μ l

Získaný lineární plazmid byl přečištěn následujícím postupem:

K plazmidu bylo přidáno 25 μ l proteinázy K (zásobní roztok: 20 μ g proteinázy K v 150 μ l 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 a 2 mM CaCl₂) a 3,75 μ l 10% SDS. Směs byla inkubována v 50 °C po dobu 30 minut. Po přidání 80 μ l fenol-chloroformu (Sigma) byla směs pečlivě promíchána pomocí vortexu a centrifugována 5 minut při maximálních otáčkách. K vodní fázi bylo přidáno 80 μ l chloroformu (Lach-Ner) a opět byla směs promíchána a centrifugována při maximálních otáčkách po dobu 5 minut. K odebrané vodní fázi bylo přidáno 56 μ l isopropanolu (Lach-Ner) a směs byla inkubována 30 minut v -20 °C a posléze centrifugována opět 30 minut (max. otáčky při 4 °C). K samotnému peletu bylo přidáno 80 μ l 80% ethanol (-20 °C) a směs byla centrifugována po 8 minut při maximálních otáčkách. Viditelný pelet byl vysušen a následně rozpuštěn v 10-20 μ l DEPC vodě.

Přečištěný linearizovaný plazmid sloužil jako templát pro syntézu jednovláknové RNA (ssRNA) (Tab. XI) pomocí sady MEGAscript T7 High Yield Transcription kit (Ambion).

Tab. XI: Reakční směs pro syntézu ssRNA.

dNTPs	8 μ l (každý po 2)
Buffer (37 °C)	2 μ l
Lineární plazmid	x μ l (1 μ g, max = 8 μ l)
Enzyme mix	2 μ l
Sterilní H ₂ O	do 20 μ l

Reakční směs byla inkubována přes noc ve 37 °C. Získaná jednovláknová RNA byla přečištěna následujícím postupem:

K ssRNA byl přidán 1 μ l Turbo DNázy a směs byla inkubována 15 minut ve 37 °C. Po přidání 115 μ l H₂O a 15 μ l octanu amonného byla směs zamíchána. Ke směsi bylo přidáno 150 μ l fenol-chloroformu (Sigma Life Science) a důkladně vše promícháno na vortexu. Po centrifugaci (5 minut, maximální otáčky) byla odebrána vodní fáze, ke které bylo následně přidáno 150 μ l chloroformu (Lach-Ner) a směs byla opět pečlivě promíchána a centrifugována po dobu 5 minut při maximálních otáčkách. K odebrané vodní fázi bylo přidáno 110 μ l isopropanolu (Lach-Ner) a směs byla inkubována 30 minut v -20 °C a následně centrifugována 30 minut (max. otáčky při 4 °C). Vysušený pelet byl rozpuštěn ve 20 μ l DEPC vodě.

V odměrném válci s vroucí vodou došlo přes noc k hybridizaci komplementárních vláken RNA (3 μ g/ml) v poměru 1:1. Pomocí elektroforézy v 1% agarózovém TAE gelu s použitím nanášejícího pufru Ambion loading dye (Ambion) byla ověřena úspěšnost syntézy. Kvůli zamezení degradace RNA RNázami se pracovalo vždy šetrně v RNA boxu.

4.8. RNA interference

Pomocí mikromanipulátoru (Narishige) bylo injikováno 60 nenasátých samic klíšěte *I. ricinus*. Každá samice byla injikována do haemocoelu přibližně 0,5 µl (3 µg/µl) dsRNA pro *tat* či *hppd*. Pro kontrolu bylo injikováno stejným množstvím dsRNA pro *gfp* (green fluorescent protein) 30 nenasátých samic *I. ricinus*. Tato dsRNA byla předpřipravená. Po 24 hodinách byly samice společně se samci za účelem plného nasátí (možné jen u oplozených samic) aplikovány na morčata (30 samic na 1 morče).

Během dvou nezávislých experimentů byly samice nechány sát na morčeti a po odpadnutí byly zváženy a uloženy k přeživacímu pokusu. V každém předem stanoveném časovém intervalu (3D, FF, 6AD) byla provedena extrakce RNA ze střev a ovárií u třech náhodně vybraných samic *I. ricinus*.

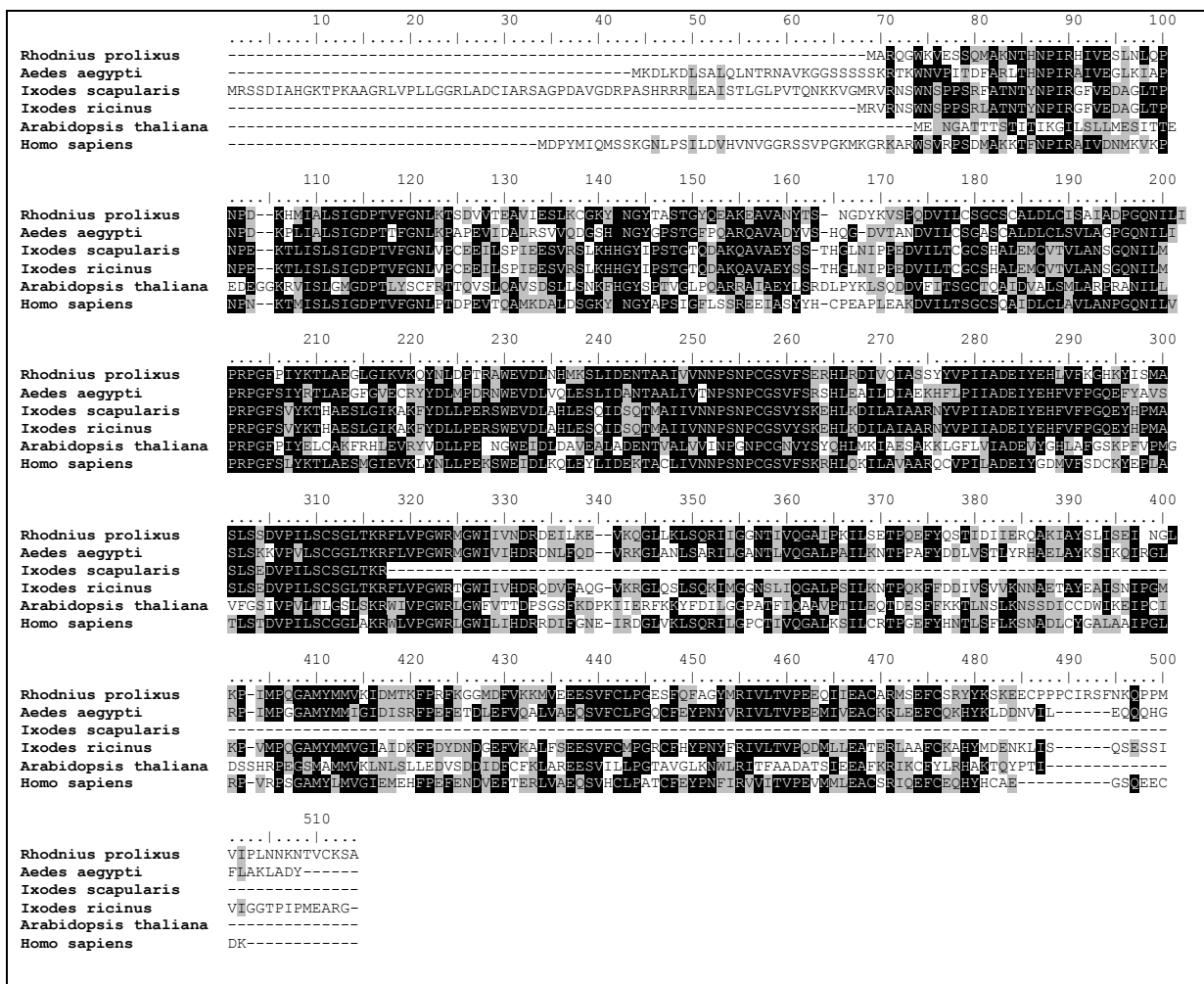
V průběhu pokusu bylo hlavním cílem pozorování fenotypových projevů u KD (knock-down, utlumení) klíš'at a kontrolních (*gfp*) klíš'at. Zaznamenán byl počet nasátých samic, tělesná hmotnost samic, schopnost vyklást snůšku, hmotnost samotné snůšky a schopnost líhnutí.

5. Výsledky

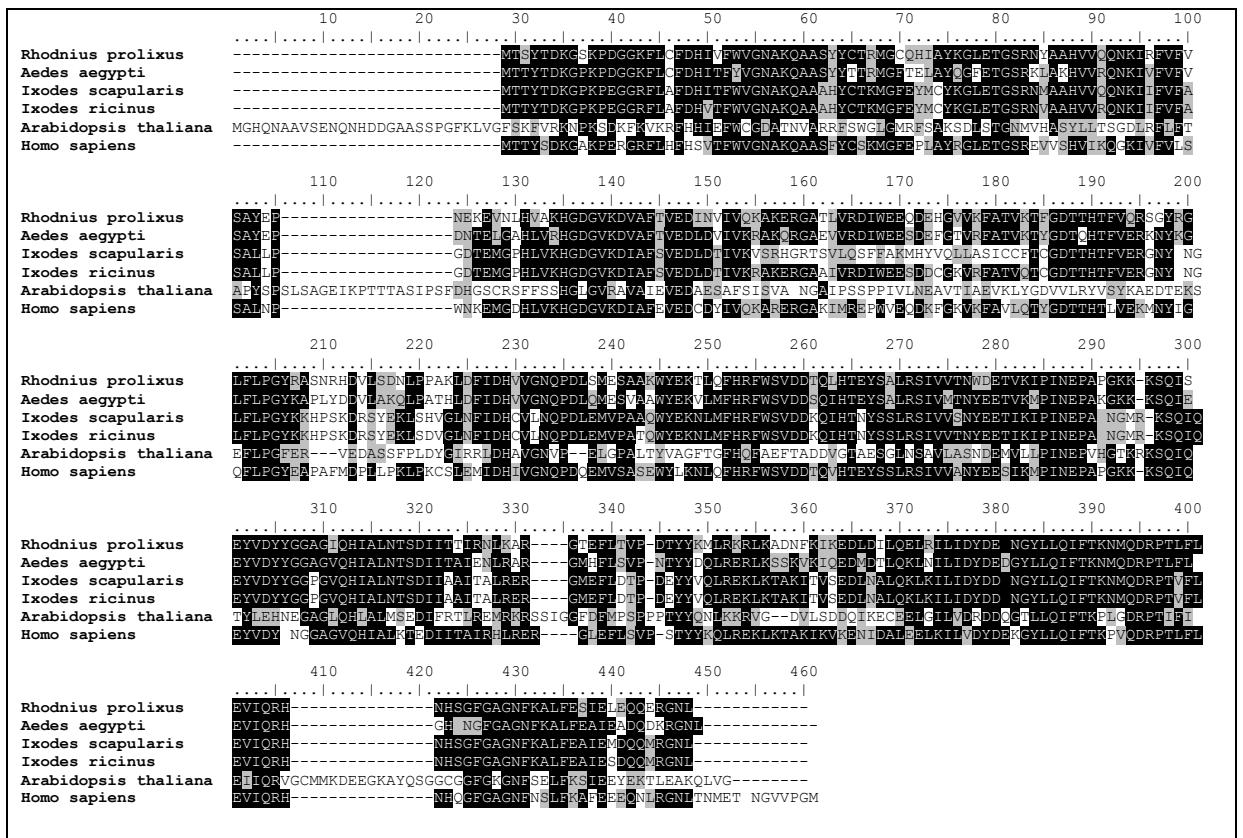
5.1. Identifikace *tat* a *hppd* homologů v *I. ricinus*

Práce byla zaměřena zejména na analýzu exprese tyrosin aminotransferázy (*tat*) a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy (*hppd*) v jednotlivých klíštěcích tkáních a vývojových stádiích pomocí metody RT-qPCR.

K získání kompletní sekvence *tat* a *hppd* z klíštěte *I. ricinus* byl využit genom úzce příbuzného klíštěte *I. scapularis*. Porovnáním sekvence metodou BlastN z plošnice *Rhodnius prolixus* jsme získali sekvence homologů z genomu *I. scapularis* (*tat*: ISCW014463, *hppd*: ISCW018238). Oba homology jsou kódované jen jedním genem a nemají v genomu *I. scapularis* další paralogy. Porovnáním sekvence metodou BlastN proti dostupným transkriptům klíštěte *I. ricinus* jsme získali sekvence i ortologů našeho klíštěte. Aminokyselinové sekvence pro TAT (Obr. 9) a HPPD (Obr. 10) z obou druhů klíšťat byly srovnány v sekvenčním alignmentu s homology z plošnice (*R. prolixus*), komára (*A. aegypti*), huseníčku (*A. thaliana*) a člověka (*H. sapiens*).



Obr. 9: Srovnání aminokyselinové sekvence TAT z klíštěte *Ixodes ricinus* a pravděpodobnými ortology z jiných organismů. *Rhodnius prolixus* (RPRC000370), *Aedes aegypti* (AAEL008963), *Ixodes scapularis* (ISCW014463), *Ixodes ricinus* (Ir2-31032), *Arabidopsis thaliana* (BAB10727.1), *Homo sapiens* (NP_000344.1).



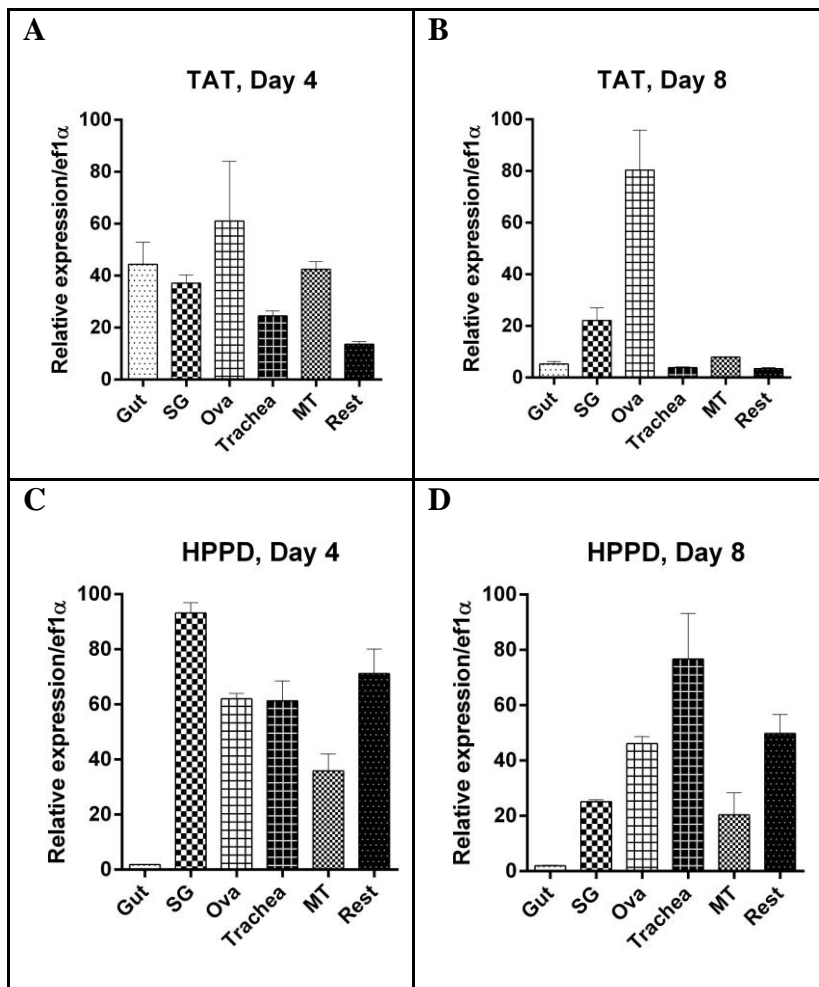
Obr. 10: Srovnání aminokyselinové sekvence HPPD z klíštěte *Ixodes ricinus* a pravděpodobnými ortology z jiných organismů. *Rhodnius prolixus* (RPRC003878), *Aedes aegypti* (AAEL014600), *Ixodes scapularis* (ISCW018238), *Ixodes ricinus* (Ir2-24382), *Arabidopsis thaliana* (AEE28006.2), *Homo sapiens* (CAA51082.1).

5.2. Zjištění tkáňové exprese *tat* a *hppd*

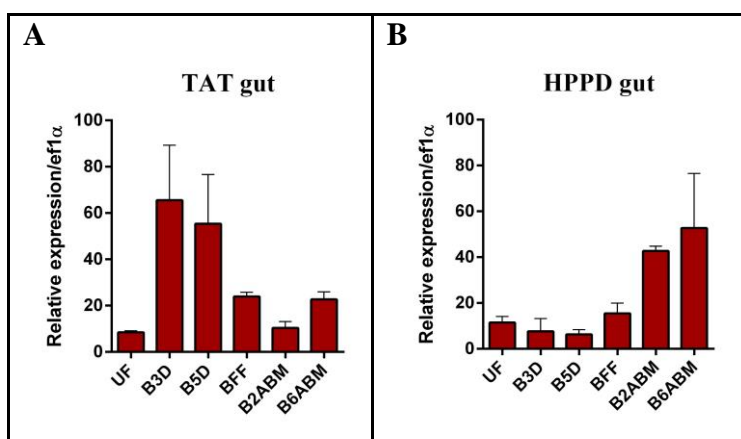
Pro identifikaci relativního množství mRNA a analýzu exprese *tat* a *hppd* v klíštěcích tkáních a vývojových stádiích (Tab. IV) byla použita metoda kvantitativní real-time PCR (RT-qPCR, Obr. 11). Překvapivě nízká hladina ve střevě naznačuje, že spíše periferní tkáň, zejména tukové těleso asociované s trachejemi nebo ovária budou hlavními tkáněmi podílejících se na katabolismu tyrosinu.

Největší exprese *tat* byla zaznamenána u plně nasátých samic v ováriích (Obr. 11B). Pro *hppd* byla největší exprese zaznamenána u polonasátých samic ve slinných žlázách (Obr. 11C).

Dále jsme analyzovali, jak je regulována hladina jednotlivých transkriptů ve střevě klíštěte v průběhu sání a po odpadnutí z hostitele. Zatímco exprese *tat* se ve střevě zvyšovala během sání, a po dosátí opět klesala (Obr. 12A), exprese u *hppd* se přímo úměrně zvyšovala se sáním i odpadnutím (Obr. 12B).



Obr. 11: RT-qPCR analýza exprese tyrosin aminotransferázy (*tat*) a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy (*hppd*) v klíšťecích tkáních. **A:** Exprese *tat* v klíšťecí tkáni polonasátých samic. **B:** Exprese *tat* v klíšťecí tkáni plně nasátých samic. **C:** Exprese *hppd* v klíšťecí tkáni polonasátých samic. **D:** Exprese *hppd* v klíšťecí tkáni plně nasátých samic. (Gut = střevo, SG = slinné žlázy, Ova = ovária, Trachea = tracheje, MT = Malpighiho trubice, Rest = zbytek). Grafy znázorňují průměr a směrodatnou odchylku, n = 3.

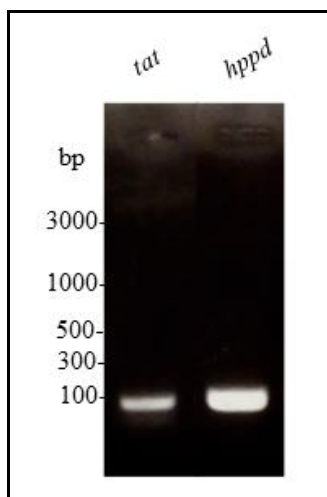


Obr. 12: RT-qPCR analýza exprese tyrosin aminotransferázy (*tat*) a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy (*hppd*) v klíšťecím střevě. **A:** Exprese *tat* ve střevě u nenasátých samic, během sání a po odpadnutí samice klíšťete. **B:** Exprese *hppd* ve střevě u nenasátých samic, během sání a po odpadnutí samice klíšťete. (UF = nenasátá klíšťata, B3D = 3 denní klíšťata, B5D = 5 denní klíšťata, BFF = plně nasátá klíšťata, B2ABM = 2 dny po ukončení sání, B6ABM = 6 dní po ukončení sání). Grafy znázorňují průměr a směrodatnou odchylku, n = 3.

5.3. Příprava dsRNA *tat* a *hppd* pro RNAi analýzu

5.3.1. Výsledky PCR reakce

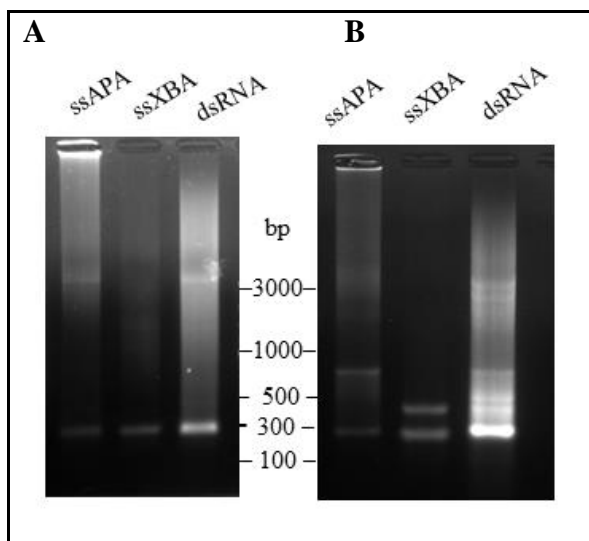
PCR reakce, amplifikující cílený úsek sekvence pro RNAi, byla prováděna s Taq Purple polymerázou, navrženými primery (Tab. V) a vhodným cDNA templátem. Jako cDNA templát pro dsRNA *tat* byl použit vzorek s největší expresí pro *tat* - OV (ovária) u plně nasátých samic (Obr. 11B). Pro dsRNA *hppd* byl použit vzorek s největší expresí pro *hppd* - SG (slinné žlázy) u polonasátých samic (Obr. 11C). Získané PCR produkty byly separovány pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu (Obr. 13). Navržené primery TATRNAiforw, TATRNAirev, HPPDRNAiforw a HPPDRNAirev (Tab. VI) obsahovaly restrikční místa pro *Apa*I a *Xba*I. Po extrakci z gelu pak byla DNA danými enzymy vyšťipnuta, stejně jako plasmid a zaligována.



Obr. 13: Amplifikovaný fragment genu tyrosin aminotransferázy (*tat*) a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy (*hppd*) pomocí PCR reakce. DNA marker. Elektroforetická separace na 1% agarózovém TAE gelu. Amplikony byly vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

5.3.2. Výsledky syntézy dvouvláknové RNA

Zaligovaný plasmid poté sloužil k syntéze jednovláknových RNA. Hybridizaci vzniklých komplementárních vláken RNA (3 μ g/ml) došlo přes noc v poměru 1:1. Úspěšnost syntézy dsRNA pro *tat* či *hppd* byla ověřena pomocí elektroforézy v 1% agarózovém TAE gelu s použitím nanášejícího pufru (Obr. 14).



Obr. 14: Ověření úspěšnosti syntézy pro obě dsRNA pomocí elektroforézy v 1% agarózovém TAE gelu. A: DNA marker syntetizovaná ssRNA (templát-plazmid pll10 se zaklonovaným inzertem pro *tat* linearizovaným restrikční endonukleázou ApaI), syntetizovaná ssRNA (templát-plazmid pll10 se zaklonovaným inzertem pro *tat* linearizovaným restrikční endonukleázou XbaI), dsRNA *tat*, marker. **B:** zleva: syntetizovaná ssRNA (templát-plazmid pll10 se zaklonovaným inzertem pro *hppd* linearizovaným restrikční endonukleázou ApaI), syntetizovaná ssRNA (templát-plazmid pll10 se zaklonovaným inzertem pro *hppd* linearizovaným restrikční endonukleázou XbaI), dsRNA *hppd*.

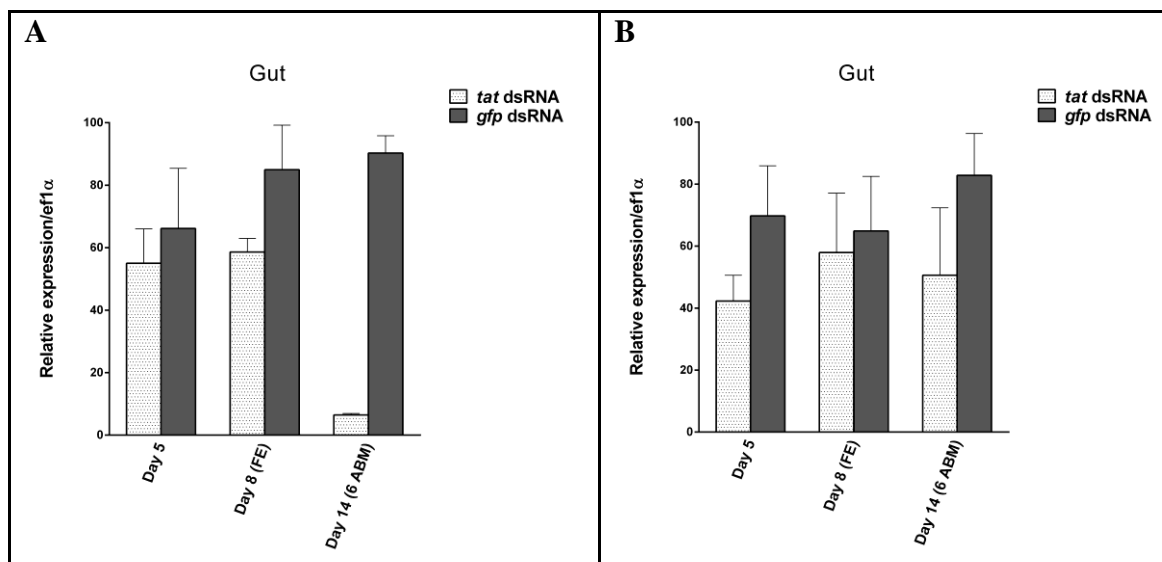
5.4. RNAi *tat* a *hppd* a její ověření během a po sání dospělých samic klíšťat *I. ricinus*

Pro RNAi pokusy a pozorování fenotypových projevů u KD klíšťat bylo 60 nenasátých samic *I. ricinus* injikováno do haemocoelu přibližně 0,5 μ l (3 μ g/ μ l) dsRNA pro *tat* či *hppd* (Obr. 14). Stejně množství dsRNA pro *gfp* bylo injikováno kontrolní skupině. U dvou nezávislých experimentů (Tab. XII) byl zaznamenán počet dosátých samic *I. ricinus* a počet samic pro přeživací pokus.

Tab. XII: Průběh dvou nezávislých experimentů při injikaci 0,5 μ l dsRNA *tat*, *hppd*, *gfp* (3 μ g/ μ l). (*tat* = tyrosin aminotransferáza, *gfp* = green fluorescent protein, *hppd* = 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza, izolace totální RNA střeva a ovárií u třech náhodně vybraných samic *I. ricinus* byla provedena dle stanovených časových intervalů během sání klíštěte-3D = 3 denní klíšťata, FF = plně nasátá klíšťata, 6AD = 6 dní po ukončení sání).

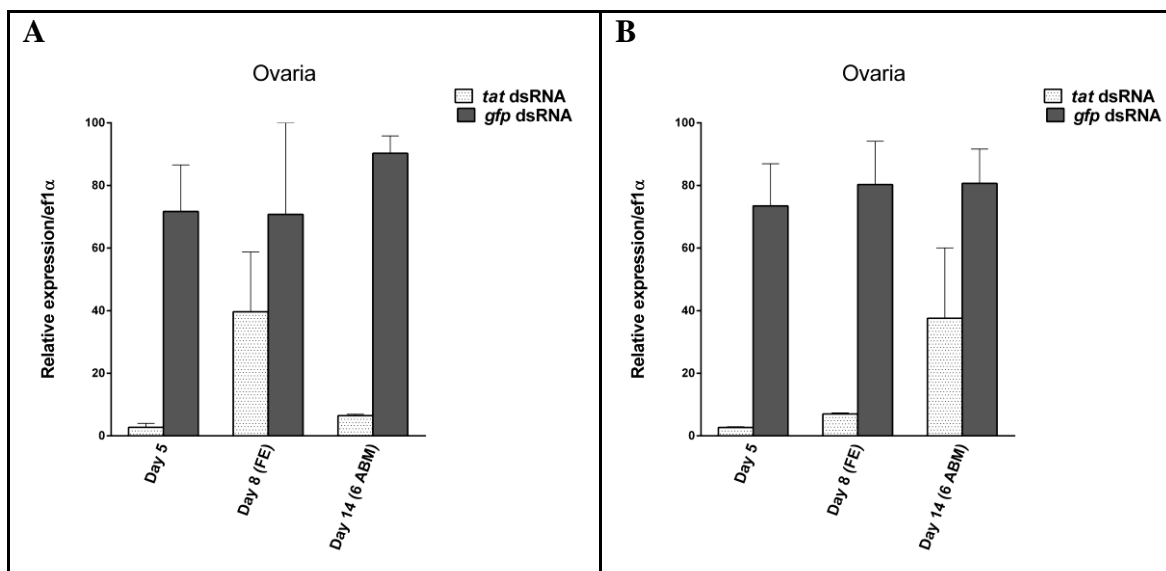
Exp. 1/ Exp. 2		Počet injikovaných samic <i>I. ricinus</i>		Počet přichycených samic na morče		Extrakce RNA pro ověření RNAi		Počet jedinců na přeživací pokus	
TAT 1	TAT 2	30	30	26	26	3/3/3	3/3/3	17	17
GFP 1	GFP 2	32	30	32	27	3/3/3	3/3/3	23	18
HPPD 1	HPPD 2	25	30	16	21	3/3/3	3/3/3	7	12
GFP 1	GFP 2	25	30	15	27	3/3/3	3/3/3	6	18

Na obrázku 15, 16, 17 a 18 jsou ukázány výsledky analýzy RT-qPCR pro dva nezávislé experimenty. Podle výsledků RT-qPCR analýzy hladinu mRNA ze střev a ovárií *tat* a *hppd* se podařilo snížit oproti dsRNA *gfp* injikované kontrolní skupině (Obr. 15,16,17,18).



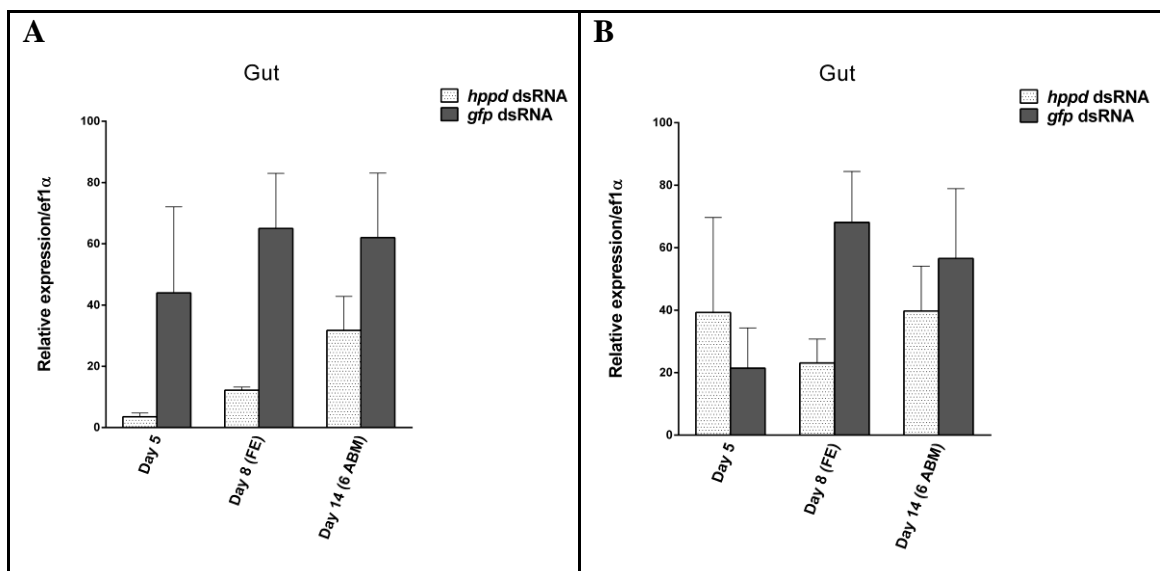
Obr. 15: RT-qPCR analýza exprese tyrosin aminotransferázy (*tat*) v klišťecím střevu během sání. **A: Exprese *tat* v klišťecím střevu u samic *I. ricinus* během sání a po odpadnutí klišťete po první injikaci přibližně 0,5 μ l (3 μ g/ μ l) dsRNA TAT do haemocelu (Experiment 1). **B:** Exprese *tat* v klišťecím střevu u samic *I. ricinus* během sání a po odpadnutí klišťete po druhé injikaci přibližně 0,5 μ l (3 μ g/ μ l) dsRNA *tat* do haemocelu (Experiment 2). Pro kontrolu bylo injikováno stejným množstvím dsRNA pro *gfp* (green fluorescent protein) 30 nenasátých samic *I. ricinus*. Intervaly sání klišťat: Day 5 = 5 denní klišťata, Day 8 (FE) = plně nasátá klišťata, Day 14 (6 ABM) = 6 dní po ukončení sání. Grafy znázorňují průměr a směrodatnou odchylku, n = 3.**

Z grafů (Obr. 15) je patrné, že došlo ke snížení hladiny exprese tyrosin aminotransferázy v klišťecím střevě během sání. Zejména v průběhu prvního experimentu se povedlo výrazně snížit hladinu exprese *tat* u samic *I. ricinus* v časovém intervalu 6 dní po ukončení sání (6 ABM) oproti kontrolní skupině, které byla injikována dsRNA *gfp*. Opakovaný druhý experiment nebyl tak úspěšný.



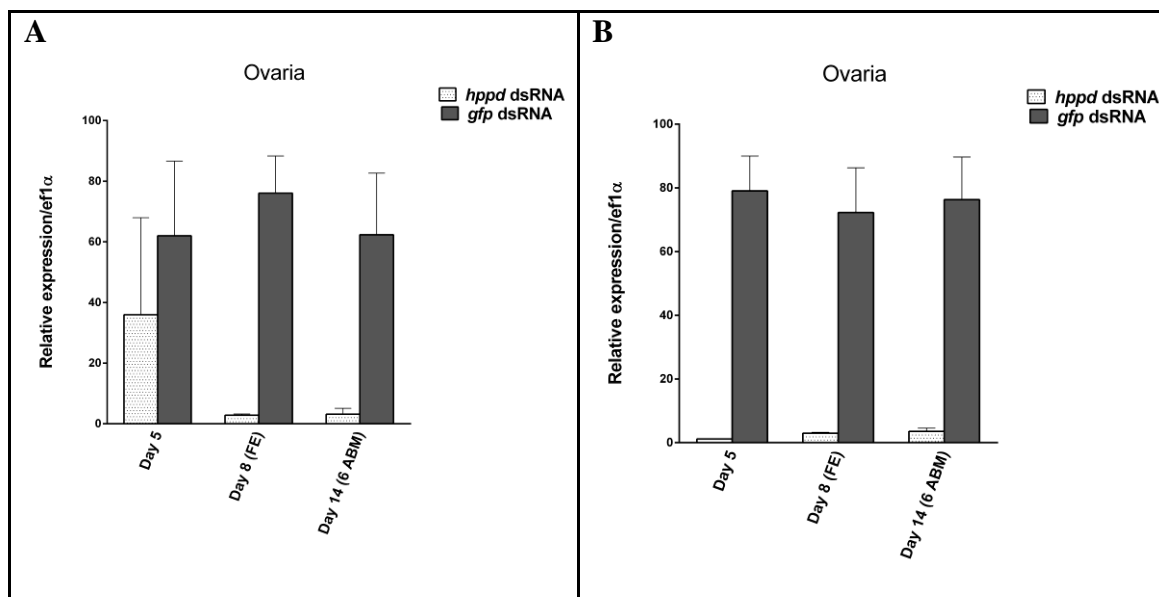
Obr. 16: RT-qPCR analýza exprese tyrosin aminotransferázy (*tat*) v klíštěcích ováriích během sání. **A:** Exprese *tat* v klíštěcích ováriích u samic *I. ricinus* během sání a po odpadnutí klíštěte po první injekci přibližně 0,5 μ l (3 μ g/ μ l) dsRNA TAT do haemocelu (Experiment 1). **B:** Exprese *tat* v klíštěcích ováriích během sání a po odpadnutí klíštěte po druhé injekci přibližně 0,5 μ l (3 μ g/ μ l) dsRNA TAT do haemocelu (Experiment 2). Pro kontrolu bylo injikováno stejným množstvím dsRNA pro *gfp* (green fluorescent protein) 30 nenasátých samic *I. ricinus*. Intervaly sání klíšťat: Day 5 = 5 denní klíšťata, Day 8 (FE) = plně nasátá klíšťata, Day 14 (6 ABM) = 6 dní po ukončení sání. Grafy znázorňují průměr a směrodatnou odchylku, n = 3.

Z grafů (Obr. 16) je patrné, že došlo k výraznějšímu snížení hladiny exprese tyrosin aminotransferázy v klíštěcích ováriích během sání. V průběhu prvního experimentu se povedlo signifikantně snížit hladinu exprese *tat* u samic *I. ricinus* v časovém intervalu 5 dní sání (Day 5) a 6 dní po ukončení sání (6 ABM) oproti kontrolní skupině, které byla injikována dsRNA *gfp*. V případě opakovaného druhého experimentu opět došlo k signifikantnímu snížení a to zejména v časovém intervalu Day 5 a Day 8.



Obr. 17: RT-qPCR analýza exprese 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy (*hppd*) v klíšťecím střevě během sání. A: Expresse *hppd* v klíšťecím střevě u samic *I. ricinus* během sání a po odpadnutí klíštěte po první injekci přibližně 0,5 μ l (3 μ g/ μ l) dsRNA HPPD do haemocelu (Experiment 1). **B:** Expresse *hppd* v klíšťecím střevě u samic *I. ricinus* během sání a po odpadnutí klíštěte po druhé injekci přibližně 0,5 μ l (3 μ g/ μ l) dsRNA HPPD do haemocelu (Experiment 2). Pro kontrolu bylo injikováno stejným množstvím dsRNA pro *gfp* (green fluorescent protein) 30 nenasátých samic *I. ricinus*. Intervaly sání klíšťat: Day 5 = 5 denní klíšťata, Day 8 (FE) = plně nasátá klíšťata, Day 14 (6 ABM) = 6 dní po ukončení sání. Grafy znázorňují průměr a směrodatnou odchylku, n = 3.

Z grafů (Obr. 17) je patrné, že došlo ke snížení hladiny exprese 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy v klíšťecím střevě během sání. První experiment byl úspěšnější a povedlo se poměrně výrazně snížit hladinu exprese *hppd* u samic *I. ricinus* v časovém intervalu 5 dní sání (Day 5) a 8 dní sání tj. plně nasátí (FE) oproti kontrolní skupině, které byla injikována dsRNA *gfp*. Zatímco u opakovaného druhého experimentu nedošlo ke snížení této hladiny v časovém intervalu 5 dní sání (Day 5), v případě časových intervalů FE a 6 ABM se podařilo hladinu exprese *hppd* opět úspěšně snížit.

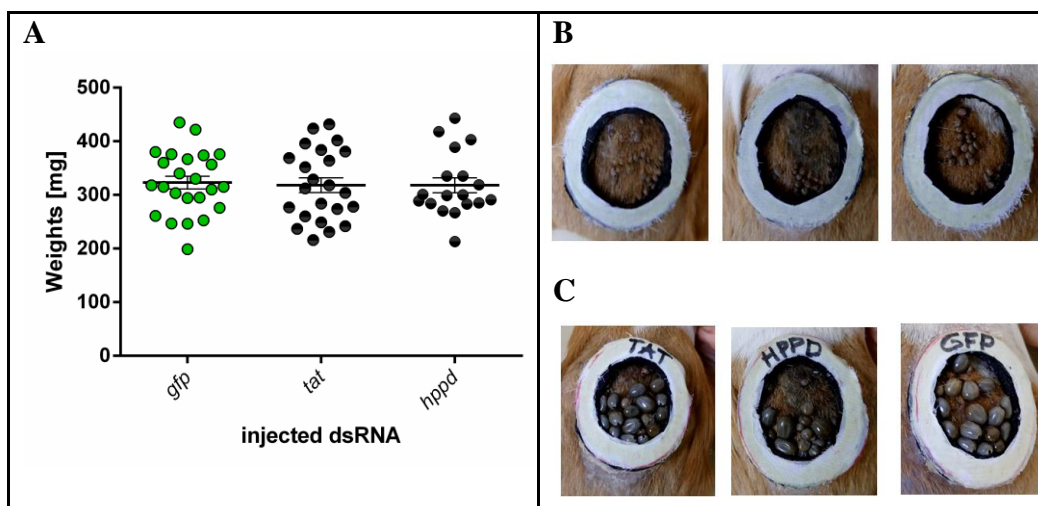


Obr. 18: RT-qPCR analýza exprese 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy (*hppd*) v klíštěcích ováriích během sání. **A: Exprese *hppd* v klíštěcích ováriích u samic *I. ricinus* během sání a po odpadnutí klíštěte po první injekci přibližně 0,5 μ l (3 μ g/ μ l) dsRNA HPPD do haemocelu (Experiment 1). **B:** Exprese *hppd* v klíštěcích ováriích u samic *I. ricinus* během sání a po odpadnutí klíštěte po druhé injekci přibližně 0,5 μ l (3 μ g/ μ l) dsRNA HPPD (Experiment 2). Pro kontrolu bylo injikováno stejným množstvím dsRNA pro *gfp* (green fluorescent protein) 30 nenasátých samic *I. ricinus*. Intervaly sání klíšťat: Day 5 = 5 denní klíšťata, Day 8 (FE) = plně nasátá klíšťata, Day 14 (6 ABM) = 6 dní po ukončení sání. Grafy znázorňují průměr a směrodatnou odchylku, n = 3.**

Z grafů (Obr. 18) je patrné, že došlo téměř úplnému snížení hladiny exprese 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy v klíštěcích ováriích během sání. Během prvního experimentu se povedlo velmi výrazně snížit tuto hladinu exprese *hppd* u samic *I. ricinus* v časovém intervalu zejména 8 dní sání tj. plné nasátí (FE) a 6 dní sání po ukončení sání (6 ABM) oproti kontrolní skupině, které byla injikována dsRNA *gfp*. Opakovaný druhý experiment byl úspěšnější a podařilo se signifikatně snížit hladinu *hppd* ve všech časových intervalech tj. Day 5, FE, 6 ABM.

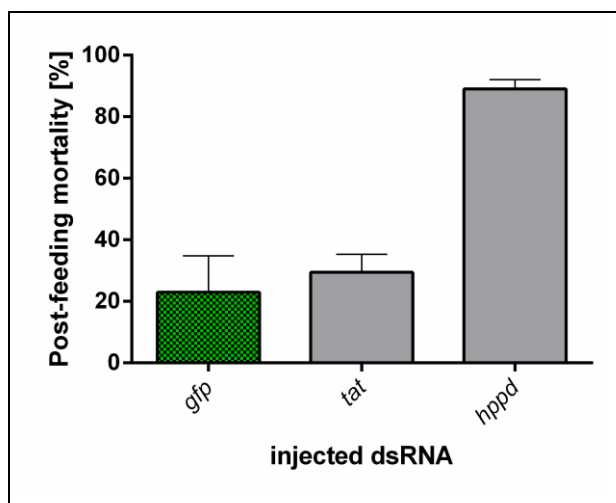
5.5. Snížení *hppd* způsobuje zvýšenou mortalitu klíšťat po nasátí

Účinek RNAi měl vliv i na fenotyp sání a reprodukce samic. Nepatrný rozdíl byl pozorován v době plného dosátí. Samice, injikované dsRNA *tat* či *hppd*, sály v průměru delší časový interval (8 – 10 dní) na rozdíl od kontrolních samic injikovaných dsRNA *gfp* (průměrně 7 – 8 dní). RNA interference neměla přímý vliv na váhu plně nasátých samic (Obr. 19).



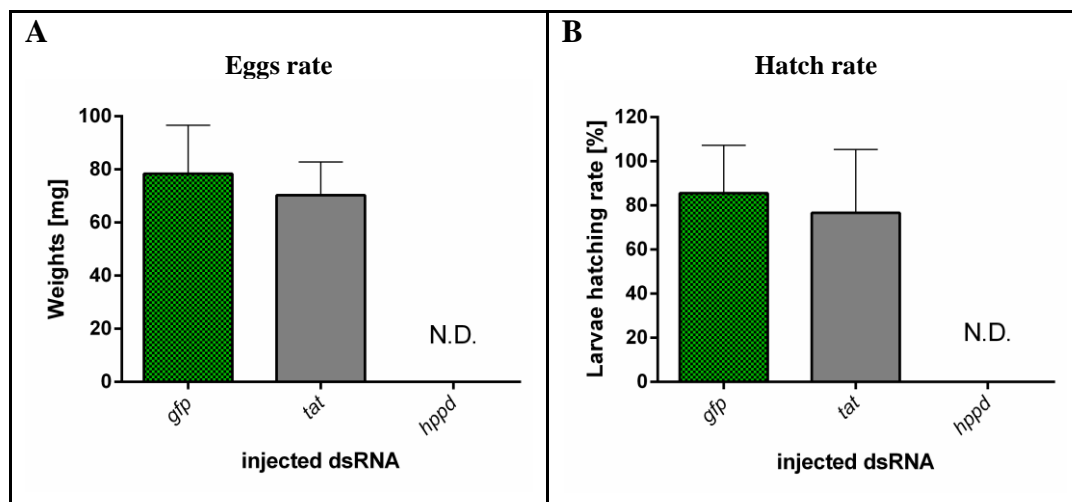
Obr. 19: Kontrolní váhy samic klíštěte *I. ricinus*. **A:** Graf sání v intervalu 5 dnů a po samovolném odpadnutí (tj. po plném dosátí). *tat* = tyrosinová aminotransferáza, *hppd* = 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza, *gfp* = Green fluorescent protein. **B:** Interval 5 dnů sání (*tat*, *hppd*, *gfp*). **C:** Interval plné dosátí (*tat*, *hppd*, *gfp*).

Rozdílný fenotyp byl pozorován až po dokončení samotného sání. Ačkoli *tat*-KD klíšťata přežívala podobně jako *gfp* kontroly, samice, injikované dsRNA *hppd*, po dokončení sání do týdne zemřely, s mortalitou sedmý den po odpadnutí 96% (Obr. 20).



Obr. 20: Mortalita samic klíštěte *I. ricinus* 7 dní po nasátí. *gfp* = green fluorescent protein, *tat* = tyrosinová aminotransferáza, *hppd* = 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza. Grafy znázorňují průměr a směrodatnou odchylku, $n \geq 6$.

Samice, injikované dsRNA *tat*, vykladly stejné množství vaječné snůšky (Obr. 21A) se stejným poměrem vylíhlých larev (Obr. 21B) jako kontrola. Naopak, *hppd*-KD samice díky vysoké mortalitě po odpadnutí z hostitele ve dvou nezávislých experimentech, nemohly vyklást žádné snůšky a nemohlo tedy dojít k reprodukci.



Obr. 21: Relativní hodnoty v jednotlivých stupních přeživacího pokusu. A: Velikost vykladené snůšky. **B:** Líhnutí larev. *gfp* = Green fluorescent protein, *tat* = tyrosin aminotransferáza, *hppd* = 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza.

6. Diskuze

Krevsající členovci kvůli přežití a reprodukci tráví velké množství živin z nasáté krve hostitele. Během zpracování krve dochází k velké produkci aminokyselin (Sterkel & Oliveira, 2017). Zejména degradace tyrosinu je velmi citlivou dráhou pro některé tyto zástupce (ploštice, komár, klíště) (Sterkel et al., 2016).

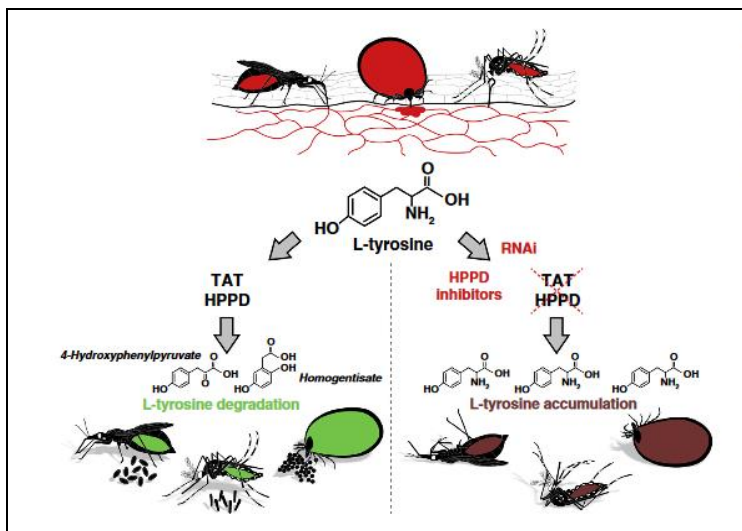
Tyrosin je semi-esenciální aminokyselina, která vzniká hydroxylací fenylalaninu nebo je přijímána přímo z potravy. Používá se pro syntézu bílkovin, biogenních aminů a melaninů (Sterkel & Oliveira, 2017). Jeho hlavní katabolická dráha vede přes pět enzymatických reakcí na acetoacetát a fumarát (Voet et al., 2006), které pak mohou být dále katabolizovány přes Krebsův cyklus (Sterkel & Oliveira, 2017). U člověka je známo několik genetických onemocnění, které jsou způsobeny nedostatečným katabolismem tyrosinu. Avšak tyto nemoci jsou připisovány především akumulaci meziproduktů vznikajících během degradačního cyklu než zvýšené hladině tyrosinu (Scott, 2006).

Významem katabolismu tyrosinu u krevsajících členovců se blíže zajímal Sterkel et al. (2016). Autoři využili metody RNAi k utlumení exprese všech pěti genů, avšak pouze vyřazení enzymů tyrosin aminotransferázy a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy, genů kódující první dva enzymy degradační dráhy tyrosinu, vedlo k významnému snížení přežití modelového organismu, ploštice *R. prolixus* (Sterkel et al., 2016).

Zvýšenou mortalitu připisovali autoři akumulaci tyrosinu a tvorbě krystalů v tkáních při trávení (Sterkel et al., 2016). Tento mechanismus může vzdáleně připomínat dnu, lidskou poruchu způsobenou nadměrnou konzumací bílkovin, která se projevuje tvorbou usazenin krystalů kyseliny močové v kloubech (Kopáček & Perner, 2016).

Na základě mého experimentu byl potvrzen výsledek předešlé studie. V tomto experimentu sloužil jako modelový organismus klíště *I. ricinus*. U tohoto krevsajícího členovce došlo k úspěšnému umlčení genů *tat* a *hppd* pomocí metody RNAi. Experiment ukázal, že injekcí dsRNA *hppd* způsobil předčasné úmrtí 96% nasátých klíšťat. Po utlumení hladiny exprese tyrosin aminotransferázy (*tat*) nebyl pozorován tak významný pokles v letalitě u samic *I. ricinus*. Tento rozdíl v pozorovaném fenotypu může být vysvětlen tím, že klíště *I. scapularis* má ve svém genomu tři homology pro aminovou sekvenci *tat* (ISCW014463, ISCW024380, ISCW013629), ale pouze jeden gen pro *hppd* (ISCW018238). Obdobná situace se dá předpokládat i u klíštěte *I. ricinus*. Snížení hladiny transkriptu jedné formy tak nemusí zaručit snížení dané enzymatické aktivity v určité tkáni za podmínky exprese dvou a více forem. Tento fakt tedy mohl mít vliv na projev letality u samic *I. ricinus* po injekci dsRNA *tat*.

Tyto výsledky dokládají důležitý fakt, že narušení prvních dvou enzymatických reakcí v degrační dráze tyrosinu efektivně zabíjí krevsající členovce (Obr. 22).



Obr. 22: Detoxifikace tyrosinu u krevsajících členovců. Hematofágní členovci, jako je (zleva doprava) ploštice *R. prolixus* (vektor Chagasovy choroby), komár *A. aegypti* (vektor žluté horečky) a klíště *R. microplus*, tráví velké množství živin získaných z hostitelské krve bohaté především na bílkoviny. RNAi-zprostředkované tlumení genu kódujícího 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázu (HPPD) nebo použití inhibitoru HPPD mezotriionu je pro tyto jedince smrtelné v důsledku akumulace krystalů vytvořených z přebytku nerozloženého tyrosinu. (Kopáček & Perner, 2016).

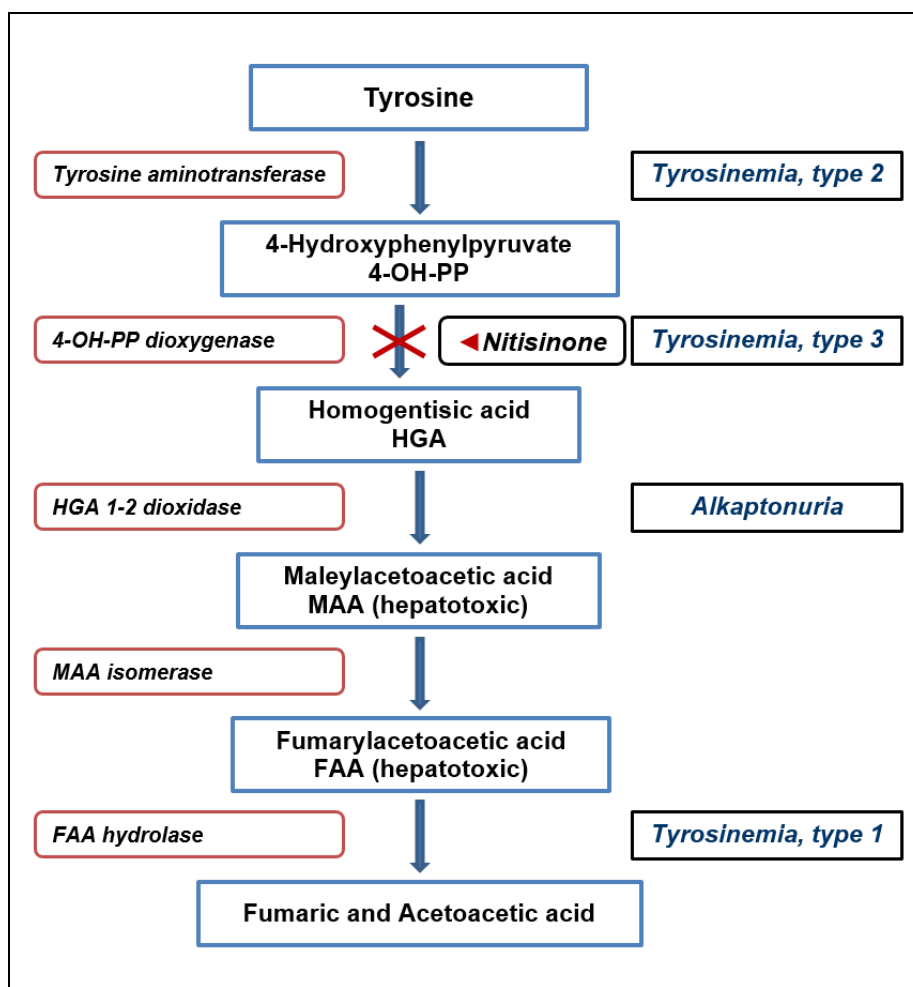
Fenotypový projev, zprostředkovaný RNAi, byl dále ověřen použitím inhibitoru HPPD mezotriionu, který selektivně zabil hematofágní členovce (*R. prolixus*, *A. aegypti*, *R. microplus*), ale neovlivnil nehematofágní hmyz (Sterkel et al., 2016).

Naše fenotypové pozorování bylo ověřeno také s využitím inhibitoru HPPD mezotriionu během umělého sání na krmítku pro juvenilní i dospělá stádia *I. ricinus*. Tento experiment měl za následek zvýšení hladiny fenylalaninu a tyrosinu v hemolymfě po odpadnutí klíšťat, která vedla k následné mortalitě (Matěj Kučera, nepublikovaná data).

Vzhledem k tomu, že inhibitory HPPD jsou ve velké míře používány jako herbicidy (Huber et al., 2004), bylo velmi překvapivé, že inhibice mezotriionem fungovala, protože sekvence *hppd* *A. thaliana* má pouze 30% shodnou aminokyselinovou identitu se sekvencí *I. ricinus* (Obr. 10).

Zatímco dominantní tkání pro akumulaci tyrosinu u ploštice *R. prolixus* bylo střevo (Sterkel et al., 2016), výsledky našeho experimentu na *I. ricinus* ukazují, že dominantní tkání jsou ovária (Obr. 11). Zároveň jsme byli schopni detekovat mezotriion v klíštěcí hemolymfě, což ukazuje na možnou systemickou toxicitu mezotriionu a nelze tedy jednoznačně přisoudit esenciálnost této dráhy jedné tkáni (Matěj Kučera, nepublikovaná data).

V lékařství se k léčbě tyrosinémie typ I využívá lék nitisinon (Kopáček & Perner, 2016), který je rovněž inhibítozem enzymu HPPD (Obr. 23). Intracelulární akumulace fumarylacetoacetátu (FAA) a jeho případná extracelulární konverze na sukcinylaceton může být toxická a zároveň zodpovědná za apoptózu hepatocytů vedoucí až k selhání jater (Scott, 2006). Lék nitisinon úspěšně inhibuje konverzi 4-hydroxyfenylpyruvátu (HPP) na homogentisát a tak inibuje vznik toxických meziproductů. (Moran, 2005). I s tímto inhibítozem, použitým pro membránové krmení klíšřat, bylo dosaženo podobných výsledků jako s mesotrionem.



Obr. 23: Metabolismus tyrosinu. Genetická mutace v genech kódujících enzymy katabolismu tyrosinu vede k různým typům tyrosinémii. Tyrosin aminotransferáza (TAT) - tyrosinémie typ II; 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza (HPPD) - tyrosinémie typ III, Hawkinsinurie; fumarylacetoacetát hydroxyláza (FAH) – tyrosinémie typ I (www.livertox.gov/Nitisinone.htm).

7. Závěr

Pomocí genomu úzce příbuzného klíštěte *I. scapularis* byla získána kompletní sekvence tyrosin aminotransferázy (*tat*) a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy (*hppd*) z klíštěte *I. ricinus*. Pomocí metody RT-qPCR byla provedena analýza exprese tyrosin aminotransferázy (*tat*) a 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy (*hppd*) v jednotlivých klíštěcích tkáních a vývojových stádiích. Největší exprese *tat* byla zaznamenána u plně nasátých samic v ováriích (Obr. 11B). Pro *hppd* byla největší exprese zaznamenána u polonasátých samic ve slinných žlázách (Obr. 11C). Exprese *tat* se zvyšovala během sání, avšak po dosání opět klesala (Obr. 12A). Exprese u *hppd* se přímo úměrně zvyšovala se sáním i odpadnutím (Obr. 12B). S využitím metody RNA interference byla potlačena exprese těchto genů ve střevě a v ováriích. Na základě stanovených časových intervalů byla pozorována změna fenotypového projevu pomocí injekce dsRNA *tat*, *hppd* a *gfp* (kontrolní skupina samic). Potlačení exprese enzymu *tat* nemělo vliv na přežití samic. Samice, injikované dsRNA *tat*, úspěšně vykladly, avšak ze subjektivního pohledu snůška i vylíhnutí byly menší než velikost snůžek i líhnutí u kontrolní skupiny samic, kterým byla injikována dsRNA *gfp*. Výrazný fenotyp byl pozorován po RNAi umlčení genu kódujícího HPPD, které vedlo k vysoké předčasné úmrtnosti plně nasátých samic *I. ricinus*.

8. Seznam použité literatury

- Billingsley, P. F. (1990).** The Midgut Ultrastructure of Hematophagous Insects. Annual Review of Entomology, 35 (1), 219–248.
- Braz, G. R., Coelho, H. S., Masuda, H., Oliveira, P. L. (1999).** A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. Current Biology : CB, 9 (13), 703–706.
- Fuchs, S., Behrends, V., Bundy, J. G., Crisanti, A., Nolan, T. (2014).** Phenylalanine metabolism regulates reproduction and parasite melanization in the malaria mosquito. PLoS ONE, 9 (1).
- Garrod, A. E. (1902).** The incidence of alkaponuria: a study in clinical individuality. Lancet, 2, 1616–1620.
- Goodwin, T. W., Mercer, E. I. (1983).** Introduction to plant biochemistry (2nd ed.). New York: Pergamon Press.
- Graca-Souza, A. V, Maya-Monteiro, C., Paiva-Silva, G. O., Braz, G. R. C., Paes, M. C., Sorgine, M. H. F., Oliveira, P. L. (2006).** Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 36 (4), 322–335.
- Gunsior, M., Ravel, J., Challis, G. L., Townsend, C. A. (2004).** Engineering p-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase to a p-Hydroxymandelate Synthase and Evidence for the Proposed Benzene Oxide Intermediate in Homogentisate Formation. Biochemistry, 43 (3), 663–674.
- Horn, M., Nussbaumerová, M., Šanda, M., Kovářová, Z., Srba, J., Franta, Z., Mareš, M. (2009).** Hemoglobin Digestion in Blood-Feeding Ticks: Mapping a Multipetidase Pathway by Functional Proteomics. Chemistry and Biology, 16 (10), 1053–1063.
- Huber, R., Steinbacher, S., Fritze, I. M., Linden, L. (2004).** The Crystal Structures of *Zea mays* and *Arabidopsis* 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase, 134, 1388–1400.
- Hübner, J. (1995).** Parazitární nákazy a onemocnění člověka a jejich laboratorní diagnostika. Praha: Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví.
- Kerles, M. (2015).** Člověk a klíště (1. vyd.). České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Kohlmeier, M. (2015).** Nutrient Metabolism: Structures, Functions, and Genes (2nd ed.). Press edition.
- Kopáček, P., Perner, J. (2016).** Vector Biology: Tyrosine Degradation Protects Blood Feeders from Death via La Grande Bouffe. Current Biology, 26 (16), 763–765.
- Kratochvíl, J. (1966).** Použitá zoologie (1. vyd.). Praha: Státní zemědělské nakladatelství.
- Lara, F. A. (2003).** A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. Journal of Experimental Biology, 206 (10),
- Lara, F. A., Lins, U., Bechara, G. H., Oliveira, P. L. (2005).** Tracing heme in a living cell: hemoglobin degradation and heme traffic in digest cells of the cattle tick *Boophilus microplus*. The Journal of Experimental Biology, 208 (16), 3093–3101.
- Li, J. (1994).** Egg chorion tanning in *Aedes aegypti* mosquito. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Physiology, 109 (4), 835–843.
- Mans, B. J. (2011).** Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods. Journal of Innate Immunity, 3 (1), 41–51.

- Mans, B. J., Neitz, A. W. H. (2004).** Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: Evolution from a functional perspective. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34 (1), 1–17.
- Minami-Hori, M., Ishida-Yamamoto, A., Katoh, N., Takahashi, H., Iizuka, H. (2017).** Richner-Hanhart syndrome: Report of a case with a novel mutation of tyrosine aminotransferase. *Journal of Dermatological Science*, 41 (1), 82–84.
- Moran, G. R. (2005).** 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 433 (1), 117–128.
- Moreno, M. A., Abramov, A., Abendroth, J., Alonso, A., Zhang, S., Alcolea, P. J., Larraga, V. (2014).** Structure of tyrosine aminotransferase from *Leishmania infantum*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*, 70 (5), 583–587.
- Moreno, M. A., Alonso, A., Alcolea, P. J., Abramov, A., de Lacoba, M. G., Abendroth, J., Larraga, V. (2014).** Tyrosine aminotransferase from *Leishmania infantum*: A new drug target candidate. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4 (3), 347–354.
- Motyčka, V., Roller, Z. (2001).** *Bezobratlí* (1. vyd.). Praha: Albatros.
- Natt, E., Kida, K., Odievre, M., Di Rocco, M., Scherer, G. (1992).** Point mutations in the tyrosine aminotransferase gene in tyrosinemia type II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89 (19), 9297–9301.
- Obenchain, F. D., Galun, R. (1982).** *Physiology of ticks* (1st ed.). Oxford: Pergamon Press.
- Oliveira, M. F., Silva, J. R., Dansa-Petretski, M., de Souza, W., Lins, U., Braga, C. M., Oliveira, P. L. (1999).** Haem detoxification by an insect. *Nature*. England. 400 (6744), 517–518
- Paiva-Silva, G. O., Cruz-Oliveira, C., Nakayasu, E. S., Maya-Monteiro, C. M., Dunkov, B. C., Masuda, H., Oliveira, P. L. (2006).** A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 8030–8035.
- Pereira, L. O. R., Oliveira, P. L., Almeida, I. C. (2009).** Biglutaminyl-biliverdin IX alpha as a heme degradation product in the dengue fever insect-vector *Aedes aegypti*. *Biochemistry*, 46(23), 6822–6829.
- Perner, J., Sobotka, R., Šíma, R., Konvičková, J., Sojka, D., Oliveira, P. L., Kopáček, P. (2016).** Acquisition of exogenous haem is essential for tick reproduction. *eLife*, 5, 1–20.
- Rettenmeier, R., Natt, E., Zentgraf, H., Scherer, G. (1990).** Isolation and characterization of the human tyrosine aminotransferase gene. *Nucleic Acids Res*, 18 (13), 3853–3861.
- Ribeiro, J. M. C., Genta, F. A., Sorgine, M. H. F., Logullo, R., Mesquita, R. D., Paiva-Silva, G. O., Oliveira, P. L. (2014).** An Insight into the Transcriptome of the Digestive Tract of the Bloodsucking Bug, *Rhodnius prolixus*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8 (1), 27.
- Rijksen, G., Staal, G. E. (1976).** Purification and some properties of human 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (I). *Biochimica et Biophysica Acta*, 445 (2), 330–341.
- Ruppert, E. E., Fox, R. S., Barnes, R. D. (2004).** *Invertebrate zoology. A Functional Evolutionary Approach* (7th ed.). Belmont, CA: Thomson-Brooks/Cole.

- Ryšavý, B. (1989).** Základy parazitologie (1. vyd.). Praha: Státní pedagogické nakladatelství.
- Scott, C. (2006).** The genetic tyrosinemias. American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics, 142C, 121–126.
- Sedlák, E. (2000).** Zoologie bezobratlých (1. vyd.). Brno: Masarykova univerzita.
- Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Caffrey, C. R., Mareš, M., Kopáček, P. (2013).** New insights into the machinery of blood digestion by ticks. Trends in Parasitology, 29 (6), 276–285.
- Sojka, D., Pytelková, J., Perner, J., Horn, M., Konvičková, J., Schrenková, J., Kopáček, P. (2016).** Multienzyme degradation of host serum albumin in ticks. Ticks and Tick-Borne Diseases, 7 (4), 604–613.
- Sonenshine, D. E. (1991).** Biology of Ticks, vol. 1. Oxford university Press, New York.
- Sterkel, M., Oliveira, P. L. (2017).** Developmental roles of tyrosine metabolism enzymes in the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. Proceedings. Biological Sciences, 284 (1854), 20162607.
- Sterkel, M., Perdomo, H. D., Guizzo, M. G., Barletta, A. B. F., Nunes, R. D., Dias, F. A., Oliveira, P. L. (2016).** Tyrosine Detoxification Is an Essential Trait in the Life History of Blood-Feeding Arthropods. Current Biology, 26 (16), 2188–2193.
- Tomoeda, K., Awata, H., Matsuura, T., Matsuda, I., Ploechl, E., Milovac, T., Endo, F. (2017).** Mutations in the 4-Hydroxyphenylpyruvic Acid Dioxygenase Gene Are Responsible for Tyrosinemia Type III and Hawkinsinuria. Molecular Genetics and Metabolism, 71 (3), 506–510.
- Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W. (2006).** Fundamentals of biochemistry (2nd ed.). Hoboken, NJ: Wiley.
- Volf, P., Horák, P. (2007).** Paraziti a jejich biologie. Praha: Triton.
- Widaman, K. F. (2010).** Phenylketonuria in Children and Mothers: Genes, Environments, Behavior, 18 (1), 48–52.
- Williams, R. A., Mamotte, C. D. S., Burnett, J. R. (2008).** Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism. The Clinical Biochemist. Reviews/Australian Association of Clinical Biochemists, 29 (1), 31–41.