

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4106 Zemědělská specializace

Studijní obor: Biologie a ochrana zájmových organismů

Katedra: Katedra biologických disciplín

Vedoucí katedry: doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard Ph.D.

Bakalářská práce

Identifikace genu ureázy v klíštěti *Ixodes ricinus*

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ondřej Hajdušek, Ph.D.

Školitel bakalářské práce: doc. RNDr. Irena Šetlíková, Ph.D.

Autor bakalářské práce: Zuzana Zemanová

České Budějovice 2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Zuzana ZEMANOVÁ**

Osobní číslo: **Z16612**

Studijní program: **B4106 Zemědělská specializace**

Studijní obor: **Biologie a ochrana zájmových organismů**

Název tématu: **Charakterizace genu ureázy v klíštěti *Ixodes ricinus***

Zadávací katedra: **Katedra biologických disciplin**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Analýza literatury
 - ureáza, močovinový cyklus
 - klíšata a jejich interakce s patogeny
 - trávení klíšat, jejich odpadní látky
2. In-silico analýza
 - genom klíšat, najít ureázu v klíštěti, BLAST
3. Navrhnout qRT a RNAi primery pro ureázu.
4. Ověřit přítomnost ureázy v klíštecích tkáních pomocí kvantitativní PCR.
 - klíštecí tkáň neinfikovaných vs infikovaných klíšat borreliemi
5. Knockdown ureázy v nymfách a dospělých klíštěte *Ixodes ricinus*.
 - posoudit vliv knockdownu na sání a převlékání klíšat

Rozsah grafických prací: dle potřeby
Rozsah pracovní zprávy: 30
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

- ” Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens. Hajdušek O, Síma R, Ayllón N, Jalovecká M, Perner J, de la Fuente J, Kopáček P. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013 Jul 16;3:26. doi: 10.3389/fcimb.2013.00026. eCollection 2013.
- ” Biology of Ticks. Daniel E. Sonenshine, R. Michael Roe. OUP USA, 2013.
- ” The occurrence of urease in the blood cells, blood plasma, and tissues of *Limulus*. Loeb L, Bodansky O. *J. Biol. Chem.* 1926, 67:79-90.
- ” Interplay of metal ions and urease. Eric L. Cartera, Nicholas Fluggaa, Jodi L. Boerb, Scott B. Mulrooneya, and Robert P. Hausinge. *Metallomics.* 2009 January 1; 1(3): 207-221. doi:10.1039/b903311d.
- ” Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. Barbara Krajewska. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 59 (1-3): 9-21. doi:10.1016/j.molcatb.2009.01.003.

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ondřej Hajdušek, Ph.D.


Katedra medicínské biologie

Školitel bakalářské práce: doc. RNDr. Irena Šetlíková, Ph.D.

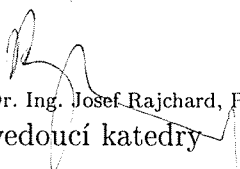
Katedra biologických disciplin

Datum zadání bakalářské práce: 24. února 2017

Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2018


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA 
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentůvká 1668, 370 05 České Budějovice


doc. RNDr. Ing. Josef Rajchard, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 24. února 2017

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci 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 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.

Datum: 15. 4. 2018

Podpis:

Abstrakt

Trávení a vylučování odpadních látek je pro heterotrofní organismy esenciální. Klíšťata během svého vývoje přijímají obrovské množství hostitelské krve, kterou musí metabolicky zpracovat. Narušení těchto procesů by mohlo být klíčové pro vývoj a sání klíšťat. V genové databázi klíšťete *Ixodes scapularis* byl nalezen gen pro enzym ureázu. Protože zdaleka ne všichni členovci tímto genem disponují, předpokládala se jeho důležitá funkce v metabolismu klíšťete. Pro studium byly vybrány podjednotky *ureA* a *ureD* ureázy klíšťete *I. ricinus*. V rámci této práce byla nejprve provedena analýza relativní exprese těchto podjednotek v jednotlivých klíšťecích tkáních a stádiích. Nejvyšší exprese byla zaznamenána v Malpighiho trubicích a ve střevech, tedy v orgánech spojených s vylučováním a trávením. Následně bylo provedeno umlčení těchto genů pomocí metody RNA interference a porovnány základní charakteristiky sání (délka sání nymf a dospělých samic, jejich váha po plném nasátí, úspěšnost svlékání nymf a úspěšnost vykladení dospělých samic) mezi experimentální a kontrolní skupinou. Nebyl prokázán významný vliv ureázy na přežívání a vývoj klíšťat, s výjimkou delší doby sání dospělých samic u skupiny *ureD* oproti kontrolní skupině. Důkladné poznání mechanismu trávení a vylučování u klíšťat a jeho jednotlivých složek je nezbytným předpokladem pro hledání vhodných kandidátních genů, na které bude možné zaměřit vývoj účinné vakcíny.

Klíčová slova: klíšťe, *Ixodes ricinus*, ureáza, *ureA*, *ureD*, Malpighiho trubice, umlčení genu.

Abstract

Digestion and excretion of waste products is essential for the heterotrophic organisms. Ticks digest during their lifetime enormous amount of host blood, which has to be metabolically processed. Disruption of these processes can be of the key importance for the tick development and food intake. The gene for urease was found in genome database of the tick *Ixodes scapularis*. Since not all arthropods possess this gene, it was hypothesized to have an important role in the tick metabolism. Subunits *ureA* and *ureD* were chosen to study role of the urease in tick *Ixodes ricinus*. In this study, analysis of relative expression of the chosen subunits was performed, focusing on various tissues and tick developmental stages. The highest relative expression was found in Malpighian tubules and guts, e.g. in tissues connected with excretion and digestion. Subsequently, I performed gene silencing of the chosen urease subunits and evaluated basic feeding characteristics (length of nymph and adult female feeding, weight of fully fed nymphs and females, success of nymph molting and success of oviposition) among experimental and control group. I did not find any substantial influence of the gene silencing on tick survival and development with exception of longer period of feeding of the adult females (group *ureD* in comparison with control group). Thorough knowledge of digestion and excretion mechanisms and their pathways in ticks is necessary prerequisite in search for suitable gene candidates, on which can be aimed development of effective vaccine.

Key words: tick, *Ixodes ricinus*, urease, *ureA*, *ureD*, Malpighian tubules, gene silencing.

Poděkování

Děkuji svému školiteli RNDr. Ondřeji Hajduškovi, Ph.D. za příležitost pracovat v jeho laboratoři a možnost vypracovat si zde svou bakalářskou práci. Dále děkuji RNDr. Radkovi Šimovi, Ph.D. za jeho cenné rady a ochotu vždy odpovědět na všechny mé otázky. Ráda bych poděkovala své kolegyni Gábi Loosové za pracovní podporu a její přátelství, stejně tak celému týmu naší laboratoře za přátelskou atmosféru. Největší díky patří mému příteli Markovi za jeho porozumění a velkou podporu.

Obsah

1. Úvod a cíle práce	7
2. Literární přehled	8
2.1 Systematika klíšťat	8
2.2 Životní cyklus klíšťat	8
2.3 Morfologie klíšťat	9
2.4 Vylučování odpadních látek	10
2.4.1 Vylučování odpadních látek u klíšťat	11
2.5 Ureáza.....	12
2.5.1 Struktura ureázy	13
2.6 RNA interference	14
3. Metodika	16
3.1 Identifikace ureázy v genomu klíštěte a získání její kompletní sekvence... 16	
3.2 Navrhnutí primerů	16
3.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR).. 16	
3.4 RNA interference	17
3.4.1 Klonování.....	17
3.4.2 Syntéza dvouvláknové RNA	19
3.4.3 Injikace dsRNA do nymf a dospělých samic <i>I. ricinus</i>	20
3.5 Sání klíšťat na pokusných zvířatech.....	21
3.6 Pitva tkání dospělých samic <i>I. ricinus</i>	21
3.7 Izolace RNA a příprava cDNA	21
3.8 Elektroforetická separace nukleových kyselin	22
3.9 Analýza dat.....	22
4. Výsledky	23
4.1 Identifikace ureázy a získání její sekvence	23
4.2 Exprese <i>ureA</i> a <i>ureD</i> v jednotlivých klíštěcích tkáních	23
4.3 Exprese <i>ureA</i> a <i>ureD</i> v jednotlivých vývojových stádiích klíšťat.....	24
4.4 Umlčení <i>ureA</i> a <i>ureD</i>	25
4.4.1 Klonování.....	25
4.4.2 Syntéza dsRNA	26
4.5 Ověření umlčení <i>ureA</i> a <i>ureD</i> po RNAi.....	26

4.6	Vliv umlčení <i>ureA</i> a <i>ureD</i> na sání a další vývoj klíšťat	27
4.6.1	Vliv na délku sání.....	27
4.6.2	Vliv na váhy klíšťat po dosátí	28
4.6.3	Vliv na další vývoj klíšťat.....	29
5.	Diskuze	30
6.	Závěr	32
7.	Přehled použité literatury	33
8.	Příloha	37

1. Úvod a cíle práce

Klíšťata jsou významnými přenašeči lidských i zvířecích onemocnění způsobených viry, bakteriemi, houbami či prvoky (Jongejan & Uilenberg, 2004). Ve střední Evropě je nejběžnějším druhem klíště obecné (*Ixodes ricinus*). Tento druh je významným přenašečem klíšťové encefalitidy, Lymfské boreliózy, anaplasmózy a babesiózy (Sonenshine, 2014). Zatímco pro klíšťovou encefalitidu je pro člověka dostupná komerční vakcína, pro Lymfskou boreliózu doposud žádná není (Steele et al., 1998). Důkladné poznání metabolismu klíšťat je nezbytným předpokladem pro hledání vhodných kandidátních genů, na které bude možné zaměřit vývoj účinné vakcíny.

Cíle práce

1. Analýza relevantní literatury.
2. Získání sekvence genu ureázy z genomu klíštěte *I. ricinus* a navrhnutí primerů.
3. Stanovení exprese ureázy v klíštěcích tkáních a jejich vývojových stádiích pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce.
4. Příprava dvouvláknové RNA pro umlčení ureázy metodou RNA interference.
5. Posouzení vlivu umlčení ureázy v nymfách a dospělých samicích *I. ricinus* na sání a jejich další vývoj.

2. Literární přehled

2.1 Systematika klíšťat

Klíšťata jsou pavoukovci patřící do podtřídy Acari, nadřádu Parasitiformes a řádu Ixodida (Sonenshine, 2014). Řád Ixodida se dále dělí do 3 čeledí – Argasidae neboli "měkká klíšťata" (186 druhů), Ixodidae tzv. "tvrdá klíšťata" (692 druhů) a Nuttallielidae (1 druh; Nava, 2009). Čeleď Argasidae obsahuje 5 rodů – *Antricola*, *Argas*, *Nothoaspis*, *Ornithodoros* a *Otobius* a čeleď Ixodidae obsahuje 14 rodů (Guglielmone et al., 2010). Mezi medicínsky nejvýznamnější Ixodidae patří *Ixodes* (např. *I. ricinus* – Evropa a *I. scapularis* – Severní Amerika), *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Boophilus* a *Rhipicephalus* (Sonenshine, 2014). Čeleď Nuttallielidae je monotypická, obsahující pouze jeden druh – *Nuttalliella namaqua* (Guglielmone et al., 2010).

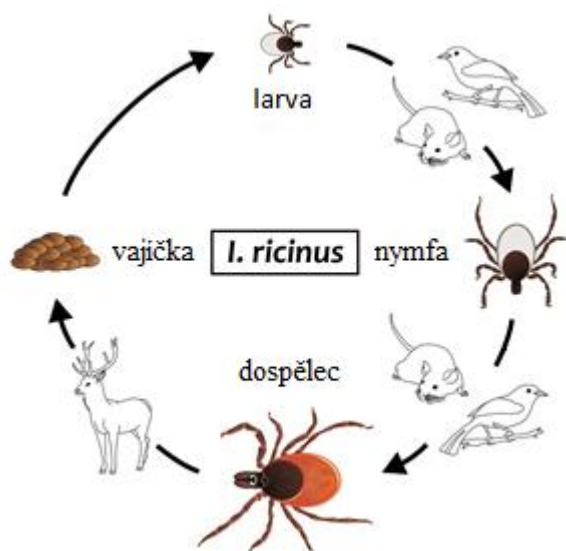
2.2 Životní cyklus klíšťat

Vývoj všech klíšťat prochází čtyřmi stádii – vajíčko, larva, nymfa a dospělec. Životní cyklus trvá nejčastěji jeden až čtyři roky v závislosti na druhu a vnějších podmínkách. Sexuální dimorfismus je patrný pouze u dospělého stádia (Sonenshine, 2014).

Argasidae za svůj životní cyklus vystřídají několik hostitelů (Hoogstraal & Aeschlimann, 1982) a mají více nymfálních stádií (Hoogstraal, 1985). Každý z těchto nymfálních instarů se musí nasát a znovu se svléct do dalšího instaru. Sání nymf i dospělců obou pohlaví trvá velmi krátkou dobu (15 až 30 minut). Samice kladou jen několik stovek vajíček a jsou schopné se během života několikrát nasát a vyklást. Celý životní cyklus je velmi dlouhý, v některých případech může trvat až 20 let. Všechna stádia se zdržují u obydlí jejich hostitelů – tj. v hnízdech, jeskyních apod. Hostiteli jsou endotermní i ektotermní živočichové (Sonenshine, 2014).

Klíšťata čeledi Ixodidae mají tříhostitelský, dvouhostitelský či jednohostitelský životní cyklus. U většiny druhů převládá tříhostitelský cyklus (např. *I. ricinus*, Obr. 1). Každé stádium saje na hostiteli pouze jednou a následně se svléká do dalšího stádia (Balashov, 1972). Na rozdíl od samic dospělí samci krev nesají, ale pouze hledají samici za účelem spáření. Samice nasají obrovské množství krve a po dosátí nakladou tisíce vajíček. Sání každého stádia trvá několik dní a skládá se z fází tzv.

pomalého a rychlého sání; u samic je fáze rychlého sání podmíněna předchozím oplozením. Celý životní cyklus většinou trvá jeden až tři roky. Většina těchto klíšťat žije na vegetaci v lesích a houštinách (Sonenshine, 2014).



Obr. 1. Schématický diagram reprezentující tříhostitelský životní cyklus klíštěte *I. ricinus*. Larva saje na prvním hostiteli (např. drobní hlodavci, ptáci), pouští se a svléká se do dalšího stádia, nymfy. Následně nenasátá nymfa hledá hostitele (např. drobní hlodavci, ptáci i větší obratlovci), saje a po dosátí se pouští a svléká se do dospělého stádia, samce nebo samice. Obě pohlaví hledají hostitele (např. větší savce), oplozené samice sají a po odpadnutí z hostitele nakladou tisíce vajíček a umírají (Sonenshine, 2014). Člověk může být hostitelem všech těchto stádií (Volf & Horák, 2007). Schéma M. Hajdušková (Biographix).

2.3 Morfologie klíšťat

Tělo klíštěte se skládá ze dvou základních částí – hlavová část (tzv. capitulum) a vlastní tělo neboli idiosoma. Hlavovou část tvoří klepítka, makadla a hypostom. Na hypostomu jsou zpětné háčky, které slouží k uchycení v kůži hostitele během sání (Volf & Horák, 2007). Na vlastním těle jsou umístěné páry nohou, larvy mají tři páry nohou, nymfy a dospělci mají čtyři páry nohou. První pár nohou nese Hallerův orgán, díky kterému klíště najde svého hostitele, rozpoznává pach hostitele a zvýšenou koncentraci CO₂. „Tvrdá“ klíšťata mají na hřbetní části tvrdý chitinizovaný štítek (Sonenshine, 2014). Samci mají tento štítek po celé hřbetní části, u samic, nymf a larev dosahuje jen do poloviny těla, zbytek tvoří elastická kutikula, která

umožňuje klíšťatům několikanásobně zvětšit svůj objem během sání (Roberts & Janovy, 2000). „Měkká“ klíšťata štítek postrádají, místo toho mají kožovitou kutikulu (Sonenshine, 2014).

2.4 Vylučování odpadních látek

Vyšší živočichové se různými strategiemi zbavují nadbytečného dusíku, který vzniká při odbourávání proteinů (Voet & Voetová, 1995). Proteiny jsou hydrolyzovány na aminokyseliny, které mohou být použity pro tvorbu nových proteinů. Nadbytečné aminokyseliny jsou odbourávány na 2-oxoglutarát a toxický amoniak. Amoniak je buď vyloučen, nebo konvertován na močovinu či kyselinu močovou v močovinovém cyklu. U živočichů, kteří jsou na amoniak citliví (např. savci), je amoniak transportován krví ve formě glutaminu předtím, než je přeměněn na močovinu (Wright, 1995). Amoniak také může vznikat uvolněním z močoviny činností ureázy, např. u některých měkkýšů (Campbell & Speeg, 1968) nebo korálů (Barnes & Crossland, 1976). Především se však amoniak objevuje v trávicím traktu mnoha živočichů působením mikroorganismů. Příkladem může být aktivita mikroorganismů v trávicím traktu přežvýkavců, močovina produkovaná v játrech je degradována na amoniak působením mikrobiální ureázy (Church, 1975).

Živočichové vylučují dusíkaté odpadní látky různými způsoby – nejčastěji ve formě amoniaku, močoviny a kyseliny močové, ale také ve formě guaninu, kreatinu, kreatininu či aminokyselin. V jaké formě bude dusík vylučován, závisí na řadě faktorů vnějšího prostředí. Zatímco vodní organismy (bezobratlí, ryby a larvální stádia obojživelníků) vylučují především amoniak, suchozemští živočichové vylučují nejčastěji močovinu nebo kyselinu močovou (Wright, 1995).

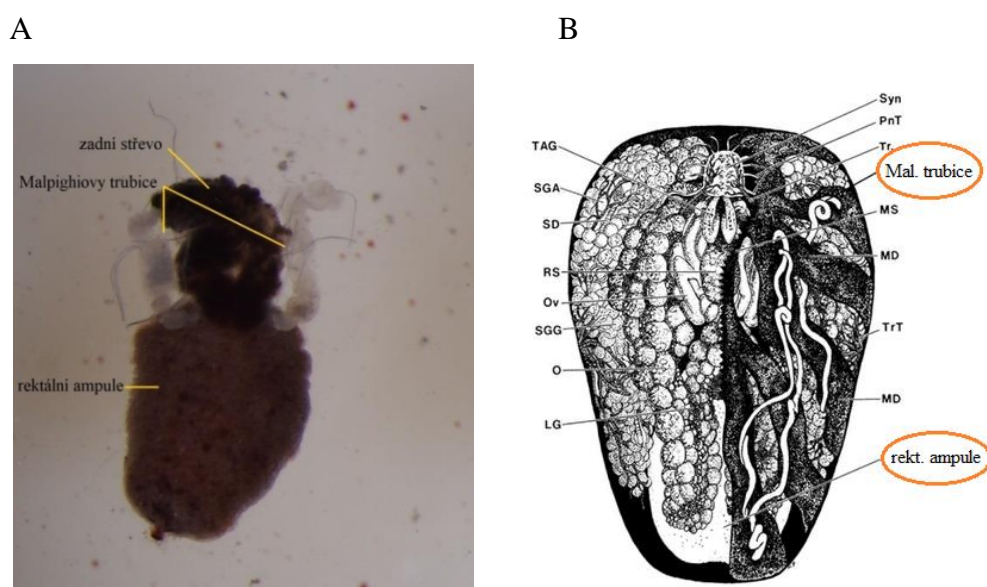
Močovina je hlavní odpadní produkt většiny suchozemských živočichů včetně lidí. Je syntetizována z amoniaku v játrech v močovinovém cyklu a přenášena krví do ledvin a následně vyloučena močí ven z těla (Voet & Voetová, 1995).

Kyselina močová se vyskytuje u ptáků, plazů, některých obojživelníků a u většiny hmyzu. Vzniká z metabolismu purinů (adeninu a guaninu). V malém množství se tvoří i u lidí, pokud se její koncentrace v krvi zvýší, může vést až k onemocnění dna. Poslední enzym dráhy formující kyselinu močovou, xanthin dehydrogenáza, chybí u pavoukoců a proto je u nich hlavním metabolitem guanin (Anderson, 1966).

2.4.1 Vylučování odpadních látek u klíšťat

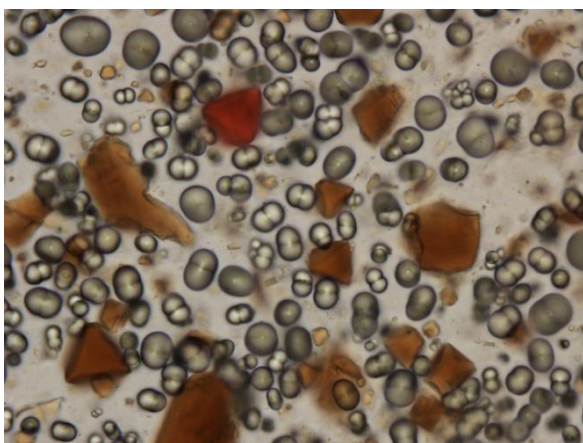
Jediným zdrojem potravy klíšťat je krev jejich hostitelů. Klíšťata během jednoho sání přijmou mnoho krve, kterou musí trávit; jejich hmotnost se až stonásobně zvýší oproti nenasátému stavu (Balashov, 1972). Trávení krve u klíšťat je pomalý proces probíhající uvnitř střevních buněk (Arthur, 1965). Zásadní je zpracování hlavních proteinů hostitelské krve, hemoglobinu a albuminu (Akov, 1982). Z trávení těchto proteinů vznikají aminokyseliny, které jsou nezbytné pro metabolismus a rozmnožování klíšťat (Hamdy, 1977). Při tomto procesu vznikají odpadní látky, které musí být dále odbourány. Hlavním odpadním produktem klíšťat je guanin (Anderson, 1966).

Vylučování odpadních látek je u klíšťat zprostředkováno pomocí Malpighiho trubic a zadního střeva, které se skládá z rektální ampule, rekta a řitního otvoru. Malpighiho trubice jsou hlavním orgánem zajišťujícím eliminaci dusíkatých odpadních látek, formuje se zde guanin. Jsou párové a napojené na každé straně na rektální ampuli, jedním koncem jsou připojené ke střevu (Obr. 2A). Jsou extrémně dlouhé a vinou se kolem vnitřních orgánů klíštěte, (Obr. 2B), (Sonenshine, 2014). Během sání a po sání se zvětšují tím, jak se plní krystaly guaninu (Balashov, 1972).



Obr. 2. Vnitřní anatomie klíštěte *I. ricinus*. A – Malpighiho trubice napojené na rektální ampuli a zadní střevo. Snímek ze stereomikroskopu, zvětšení 50x, autor Zuzana Zemanová. B – Schématický nákres tělních orgánů se zvýrazněnými Malpighiho trubicemi (Mal. trubice) a rektální ampulí (rekt. ampule), převzato z (Sonenshine, 2014).

Vlastní zadní střevo je krátké a jeho jedinou funkcí je transport nestrávených látek (především hematinu a nestráveného hemoglobinu) ze středního střeva a Malpighiho trubic do rektální ampule. Rektální ampule je velká struktura oválného tvaru umístěná v zadní části těla klíštěte. Během sání či těsně po sání je zbarvena do červena v důsledku nestráveného hemoglobinu a hematinu ze střeva. Mimo tuto dobu je zbarvena do bíla vzhledem k velkému množství krystalů guaninu (Obr. 3) (Sonenshine, 2014).



Obr. 3. Krystaly guaninu (šedé) a krystaly hemoglobinu (červené) v rektální ampuli. Snímek ze světelného mikroskopu, zvětšení 100x, autor Zuzana Zemanová.

Rektum je připojené k rektální ampuli a končí řitním otvorem. Stejně jako předchozí části může být vyplněno krystaly guaninu anebo zbytky hematinu černé barvy (Sonenshine, 2014). Kontrakce hladké svaloviny řitního otvoru zvětšují rektum a usnadňují defekaci (Balashov, 1972).

2.5 Ureáza

Ureáza je první enzym, který se podařilo zkrystalizovat. Zároveň se jedná o první enzym, u kterého se zjistilo, že enzymy jsou proteiny, když v roce 1926 izoloval Sumner ureázu z bobovité rostliny *Canavalia ensiformis* (Sumner, 1926). Ureáza je enzym katalyzující rozklad močoviny na amoniak a karbamát, který se následně rozkládá na kyselinu uhličitou a druhou molekulu amoniaku (Mack & Villars, 1923). Ureáza je v přírodě hojně zastoupená, vyskytuje se v rostlinách, bakteriích, houbách, řasách, v půdě a v řadě bezobratlých (Mobley et al., 1995; Witte, 2011). Močovina, substrát pro ureázu, je všudypřítomná díky její exkreci živočichy a dekompozici

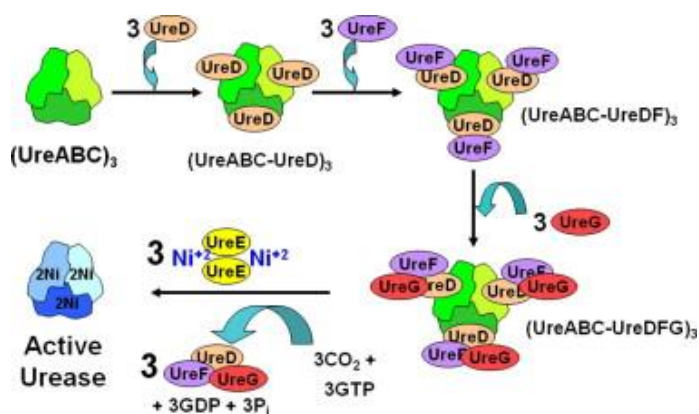
dusíkatých složek z uhynulých organismů (Wang et al., 2008). Ureáza hraje důležitou úlohu v celkovém metabolismu dusíku v přírodě. Její klíčová funkce je poskytnout amoniak organismům využívajícím dusík pro svůj růst, tj. rostlinám (Krajewska, 2009). Dále v rostlinách, díky tvorbě amoniaku, vykonává obrannou funkci proti rostlinným patogenům (Polacco & Holland, 1993) a navíc ureáza vykazuje insekticidní (Follmer et al., 2004) a antifungicidní účinky (Menegassi et al., 2008). Ureáza je v hojném množství zastoupena především v semenech luštěnin (např. *Glycine max*, *Canavalia ensiformis*) (Sumner, 1926).

Bakterie obsahující ureázu, tzv. ureolytické bakterie, jsou často patogenní pro lidi i zvířata. Tato patogeneze je způsobena hydrolýzou močoviny, která zůstala ve střevním traktu na toxický amoniak. Nejčastější bakterií je *Helicobacter pylori*, která kolonizuje trávicí trakt při zvýšeném pH a rozkládá močovinu na amoniak. Poškozuje tkáň hostitele a může vyústit až v žaludeční vředy či rakovinu žaludku (Krajewska, 2009).

Obrovský význam má ureáza v zemědělství. Díky její přítomnosti v půdě, je možné použít močovinu jako účinné dusíkaté hnojivo. Díky ureáze v půdě je amoniak dobře přístupný rostlinám. Tato hydrolýza ale může mít i opačný efekt. Pokud se močovinou intenzivně hnojí, vzniká činností ureázy příliš velké množství amoniaku, který je toxický pro klíčící zrna. Pro tyto účely se používají inhibitory ureázy, které zajistí oddálení vzniku nadměrného množství amoniaku do doby po vyklíčení (Sahrawat, 1980).

2.5.1 Struktura ureázy

Ureáza je metaloenzym obsahující ve svém aktivním místě dva atomy niklu (Dixon et al., 1975). Skládá se ze dvou hlavních podjednotek – strukturní podjednotky kódované geny *ureA*, *ureB* a *ureC* a přídatné podjednotky kódované geny *ureD*, *ureE*, *ureF* a *ureG*. Geny *ureA*, *ureB* a *ureC* dohromady tvoří strukturu (*ureABC*)₃. Proteiny, které jsou kódované přídatnými geny, jsou potřebné pro inkorporaci iontů niklu do apoenzymu ureázy a umožňují její aktivaci (Obr. 4), (Park & Hausinger, 1995).



Obr. 4. Dráha aktivace ureázy u bakterie *Klebsiella aerogenes*. Podjednotky *ureA*, *ureB* a *ureC* jsou spojeny do trimeru $(ureABC)_3$. *UreD*, *ureF* a *ureG* se postupně vážou na komplexy *ureABC* – *ureD*, *ureABC* – *ureDF* a *ureABC* – *ureDFG*. Ionty niklu umožňující aktivaci ureázy, jsou ke komplexu dopraveny pomocí *ureE* (Quiroz-Valenzuela et al., 2008).

2.6 RNA interference

RNA interference (RNAi) je prastarý mechanismus, který se vyskytuje u řady eukaryotických organismů (Tijsterman et al., 2002). Slouží jako obrana před cizorodým genetickým materiálem a hraje významnou roli v regulaci vlastních vnitrobuněčných genů během vývoje organismu (Myers & Ferrell, 2005). U rostlin se významně podílí na obraně proti RNA virům (Waterhouse et al., 2001).

RNAi byla popsána v roce 1992, když se Fire a Mello zabývali studiem modelového organismu *Caenorhabditis elegans*. Po injekci dvouvláknové RNA (dsRNA) do hádátka, zaznamenali výrazné utlumení genové exprese (Fire et al., 1998). Díky tomuto objevu je možné studovat funkci genů či biochemických drah v organismech.

RNAi je post-transkripční mechanismus regulace genů. Je spuštěna přítomností cizí dsRNA, která je v buňce rozštěpena specifickou endonukleázou Dicer-2, na krátké dvouřetězcové úseky RNA, těmito úseky mohou být siRNA (short-interfering RNA) nebo rasiRNA (repeat-associated-short interfering RNA; Meister & Tuschli, 2004). Pro umlčení genů u klíšťat metodou RNAi je využíváno vpravení dsRNA, která je štěpena na siRNA. Tyto siRNA jsou následně uspořádány do komplexu zvaný RISC (RNA-induced silencing complex; Hammond et al., 2000). RISC komplex s navázaným proteinem Argonaute2 následně štěpí cílovou komplementární mRNA (Carmell et al., 2002).

Využívá se několik způsobů vpravení dsRNA do organismu. Buď *in vivo* injikací dsRNA do organismu nebo *in vitro* pomocí transfekce dsRNA do buněčné kultury (Hammond et al., 2000). U klíšťat je neúčinnější metodou *in vivo* vpravení dsRNA injikací do hemolymfy klíštěte. Poprvé byla tato technika provedena u dospělých nenasátých samic *Amblyoma americanum* (Aljamali et al., 2002).

3. Metodika

3.1 Identifikace ureázy v genomu klíštěte a získání její kompletní sekvence

Pro nalezení a lokalizaci ureázy v biochemických drahách klíštěte byla využita databáze KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) K bližší identifikaci ureázy a jejích podjednotek u klíštěte *I. ricinus* byla provedena *in silico* analýza genomu blíže příbuzného klíštěte *I. scapularis* z databáze Vector base a bylo ověřeno, zda jsou geny pro ureázu eukaryotického původu (<https://www.vectorbase.org/>). Kompletní sekvence byly získány v databázi National Center for Biotechnology (www.ncbi.nlm.nih.gov) pomocí programu BLASTN a ve vlastních cDNA databázích klíštěte *I. ricinus*. Pro zjištění exprese a funkce ureázy v klíštěti *I. ricinus* byly zvoleny podjednotky kódující geny *ureA* a *ureD*.

3.2 Navrnutí primerů

Genově specifické primery byly navrženy ze získaných sekvencí *ureA* a *ureD* z klíštěte *I. ricinus* v programu Primer3 (primer3.ut.ee). Primery pro RNAi byly navrženy tak, aby obsahovaly restriční místa pro enzymy ApaI a XbaI (GGGCCC a TCTAGA), teplota pro nasedání primerů na templát byla zvolena 55°C. Primery pro kvantitativní PCR byly navrženy tak, aby nasedaly na templát při teplotě 60°C. Vyrobené primery byly dodány firmou GENERI BIOTECH (Hradec Králové, Česká republika). Primery byly otestovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), jako templát byla použita cDNA z plně nasátých nymf, reakce probíhala ve 40 cyklech. Všechny použité primery a jejich sekvence jsou znázorněny v tabulce v příloze (Příloha 1).

3.3 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase (qRT-PCR)

Tato metoda byla použita pro srovnání exprese *ureA* a *ureD* v jednotlivých klíštěcích tkáních samic *I. ricinus* (vaječníky, střevo, slinné žlázy, hemolymfa (jen u polonasátých samic), Malpighiho trubice, tracheje a zbytek těla) a v jejich vývojových stádiích (vajíčka, larvy, nymfy, dospělci). Larvy, nymfy a dospělé samice byly analyzovány před sáním a po nasátí. Jako templát byla využita cDNA z dlouhodobých vzorků získaných Laboratoří klíšťaty přenášených onemocnění. V celkové reakci 10 µl bylo použito 5 µl SYBR Greenu (Roche), 2 µl cDNA, 0,5 µl

od každého primeru pro *ureA* (IR742+743), *ureD* (IR698+699) a elongační faktor (IR524+525) a zbývající objem byl doplněn sterilní vodou.

Dále byla qRT-PCR použita pro ověření snížení exprese *ureA* a *ureD* u polonasátých samic a plně nasátých nymf (viz kapitola 4.5). Jako templát byla použita cDNA z Malpighiho trubic a střev dospělých samic a cDNA z celých těl nymf. Na reakci 25 μ l bylo použito 12,5 μ l SYBR Green (Roche), 5 μ l cDNA, 1 μ l od každého primeru pro *ureA* (IR742+743), *ureD* (IR698+699) a elongační faktor (IR524+525) a zbývající objem byl doplněn sterilní vodou. qRT-PCR byly provedeny za teplotních podmínek uvedených v tabulce 1.

Analýzy byly provedeny s použitím přístroje Light-cycler 480 (ROCHE). Po ukončení reakce byla zkontrolována správnost průběhu reakcí podle amplifikační křivky a křivky tání. Vzorky byly analyzovány ve třech opakováních a hodnoty byly srovnány s genovou expresí referenčního genu elongačního faktoru. Relativní exprese *ureA* a *ureD* byla vyhodnocena metodou Δ Cp hodnot s použitím matematického algoritmu (Pfaffl, 2001). Úspěšnost RNAi byla vyjádřena jako procento snížení exprese oproti kontrolní skupině *gfp*.

Tab. 1. Podmínky použité pro kvantifikaci *ureA* a *ureD* při qRT-PCR.

	Teplota	Čas	
Zahájení	95°C	10 min	
Denaturace	95°C	15 s	
Nasednutí primerů	60°C	30 s	55x
Syntéza cDNA	72°C	30 s	

3.4 RNA interference

RNAi byla použita pro umlčení *ureA* a *ureD* v nymfách a samicích *I. ricinus*. Celý postup byl proveden podle protokolu zavedeného v Laboratoři klíšťaty přenášených onemocnění (Hajdusek et al., 2009).

3.4.1 Klonování

Požadovaná nukleotidová sekvence *ureA* a *ureD* byla namnožena pomocí PCR, při podmínkách 40 cyklů a 55°C. Jako templát byla pro tuto reakci použita cDNA z plně nasátých nymf s RNAi primery (IR704+705 pro *ureA*, IR700+701 pro *ureD*; Příloha 1) obsahujícími restrikční místa pro enzymy *Apa*I a *Xba*I. Byla provedena separace

namnožené cDNA v 1 % agarózovém gelu, požadované produkty byly vyříznuty a izolovány z gelu (NucleoSpin - Gel and PCR clean-up kit, Macherey-Nagel).

Pro vložení klonovaného úseku DNA plasmidu byl použit plasmid pll10 s dvěma T7 promotory v opačné orientaci (Levashina et al., 2001). Produkty i plasmid pll10 byly nejdříve štěpeny restriktivními enzymy ApaI a XbaI. Štěpení probíhalo při 37°C po dobu 2 hodin v reakci uvedené v tabulce 2.

Tab. 2. Složení restriktivní reakce pro plasmid pll10 a PCR produkt.

Komponenta	Plasmid (μl)	PCR produkt (μl)
Pufr TANGO 10x	3	3
Enzym ApaI	1	1
Enzym XbaI	1	1
DNA	3	20
Voda	23	6

Štěpené produkty a linearizovaný plasmid byly přečištěny (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit, Macherey-Nagel). Vyčištěné produkty byly vloženy do klonovacího vektoru pll10 v ligační reakci uvedené v tabulce 3. Reakce probíhala při pokojové teplotě po dobu 1 hodinu a poté při 4°C přes noc.

Tab. 3. Složení ligační reakce.

Komponenta	Množství (μl)
Pufr 2x (pGEM T-easy kit)	2,5
Štěpený plasmid pll10	1,0
Štěpený PCR produkt	1,0
T4 ligáza (pGEM T-easy kit)	0,5

Dále byla provedena transformace plasmidu do bakterií pomocí metody teplotního šoku. 50 μl chemokompetentních buněk *E. coli* (One Shot TOP10, Invitrogen – Life Technologies) bylo smícháno s 5μl plasmidu obsahujícím vložený gen a směs byla inkubována 30 minut na ledu. Poté byl proveden teplotní šok při 42°C a po uplynutí 1 minuty byla směs ihned zchlazena na ledu. Transformované bakterie byly vysety na Petriho misky s LB médiem a ampicilinem a kultivovány přes noc při 37°C.

Pomocí PCR (55°C, 40 cyklů) s genově specifickými primery pro *ureA* a *ureD* (IR704+705 pro *ureA*, IR700+701 pro *ureD*) byla provedena selekce pozitivních klonů, které byly dále inkubovány ve 100 ml LB média přes noc. Poté byly plasmidy izolovány pomocí Midiprep kitu (Macherey-Nagel). Pro ověření správné sekvence vloženého úseku DNA byly izolované plasmidy osekvenovány (Eurofins) s použitím primerů M13F a M13R (Příloha 1).

3.4.2 Syntéza dvouvláknové RNA

Izolované plasmidy byly jednotlivě štěpeny enzymy *ApaI* a *XbaI* v reakci uvedené v tabulce 4 po dobu 2 hodin a 37°C.

Tab. 4. Složení restrikční reakce.

Složka	Množství (μl)
30 μg plasmidu	10
Pufř TANGO	5
Enzym (<i>ApaI</i> , <i>XbaI</i>)	6
Voda	29

Linearizované plasmidy byly vyčištěny podle následujícího protokolu:

Plasmidy byly inkubovány s 25 μl proteinázy K a 3,75 μl 10 % SDS při 50°C po dobu 30 minut. Extrakce plasmidů proběhla přidáním 80 μl fenol-chloroformu, stočením v centrifuze po dobu 5 minut na maximální otáčky a přidáním 80 μl chloroformu do odebrané vodné fáze. Směs byla opět stočena v centrifuze po dobu 5 minut na maximální otáčky a poté proběhla precipitace plasmidů přidáním 56 μl isopropanolu do odebrané vodné fáze. Směs byla inkubována při -20°C po dobu 15 minut a poté stočena v centrifuze při 4°C po dobu 30 minut. Získaný pelet byl promyt 80 % ethanolem, vysušen při pokojové teplotě a rozpuštěn ve vodě ošetřené diethyl pyrokarbonátem (DEPC voda).

Syntéza jednovláknových RNA (ssRNA) byla provedena pomocí kitu MEGAscript T7 Transcription kit (Ambion) v reakci znázorněné v tabulce 5. Poté byla směs inkubována přes noc při 37°C.

Tab. 5. Složení reakce pro syntézu ssRNA.

Složka	Množství (μl)
NTP	8
Pufr	2
Linearizovaný plazmid	1
Enzym	2
Voda	7

ssRNA byly přečištěny následujícím postupem:

Do směsi byl přidán 1 μl DNázy a 115 μl ammonium acetátu. Vyčištění proběhlo přidáním 150 μl fenol-chloroformu a stočením v centrifuze po dobu 5 minut na maximální otáčky a přidáním 150 μl chloroformu do odebrané vodné fáze. Směs byla opět stočena v centrifuze po dobu 5 minut na maximální otáčky. Pro vysrážení ssRNA bylo použito 150 μl isopropanolu přidaným do vodné fáze. Směs byla inkubována při -20°C po dobu 15 minut a poté stočena v centrifuze při 4°C po dobu 30 minut. Získaný pelet byl vysušen při pokojové teplotě, rozpuštěn v DEPC vodě a vzorky byly naředěny na finální koncentraci 3 μg/μl.

Spojení odpovídajících ssRNA bylo provedeno v poměru 1:1 inkubací přes noc v horké lázni s postupně klesající teplotou. Poté byla změřena koncentrace získaných dsRNA a jejich kvalita a velikost byla ověřena elektroforézou v 1% agarózovém gelu. Hotové dsRNA byly uskladněny při teplotě -80°C. Kontrolní gen pro zelený fluorescenční protein (*gfp*) dsRNA byl vytvořen stejnou metodou Laboratoří klíšťaty přenášených onemocnění.

3.4.3 Injikace dsRNA do nymf a dospělých samic *I. ricinus*

Do hemolymfy nenasátých nymf (210 ks) a samic (75 ks) byly vpraveny dsRNA pro *ureA* a *ureD* v množství 0,5 μl dsRNA/samice a 0,3 μl dsRNA/nymfa. Injikace byla provedena pomocí mikromanipulátoru skleněnou mikrokapilárou (Narishige). Kontrolní skupiny byly injikovány stejným množstvím dsRNA pro gen *gfp*. Následně byla klíšťata ponechána ve zkumavkách ve vlhkém prostředí při pokojové teplotě.

3.5 Sání klíšťat na pokusných zvířatech

Nymfy klíštěte *I. ricinus* byly získány na Parazitologickém ústavu (Biologické centrum, AVČR). Dospělé samice a samci klíštěte *I. ricinus* byli nasbíráni v lese u Českých Budějovic metodou vlajkování.

Pro účely pokusu bylo třeba nechat jedince klíštěte nasát. Pro sání nymf *I. ricinus* byly použity myši kmene BALB/c (Velaz). Nymfy sály na laboratorních myších v počtu 20 nymf/myš. Pro sání dospělých samic byla použita morčata získaná z chovného zařízení Parazitologického ústavu (Biologické centrum, AVČR). Dospělé samice sály na laboratorních morčatech v počtu 25 samic/morče. Na vyholenou hřbetní část laboratorních myší a morčat byly umístěny tzv. klouboučky, do kterých byla následně přidána klíšťata. Před umístěním kloubouček byla morčata uspána injekcí přípravku Narketan (Vetoquino) aplikovanou do svalu v dávce 0,2 ml/morče. Klíšťata byla z laboratorních zvířat odebírána v den jejich puštění (plně nasátá), případně šestý den sání (polonasátá).

Následně byla klíšťata jednotlivě vážena, jednotlivé skupiny nymf byly rozděleny na samce a samice podle váhy (samci do 3,5 mg, samice nad 3,5 mg). Poté byla klíšťata ponechána ve vlhkém prostředí při pokojové teplotě.

3.6 Pitva tkání dospělých samic *I. ricinus*

Dospělým polonasátým samicím byly pod binolupou vypitvány Malpighiho trubice a střevo. Vypitvané tkáně byly promyty v PBS v DEPC vodě a uloženy do 300 μ l lyzačního pufru (pufr RA1 z kitu NucleoSpin RNA, Macherey-Nagel) a ihned použity k izolaci RNA.

3.7 Izolace RNA a příprava cDNA

Z vypitvaných tkání polonasátých dospělých samic a z celých těl plně nasátých nymf byla izolována celková RNA pomocí kitu NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) dle instrukcí výrobce. Kvalita RNA byla ověřena separací v 1 % agarózovém gelu a byla změřena její koncentrace na spektrofotometru NanoDrop™ 1000 (NanoDrop, USA). RNA byla uskladněna při teplotě -80°C . RNA (0,5 μ g) byla reverzní transkripcí převedena do cDNA s použitím oligo-dT primerů (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche) dle instrukcí výrobce. cDNA byla 10x naředěna sterilní vodou a uskladněna při teplotě -20°C .

3.8 Elektroforetická separace nukleových kyselin

Pro tuto metodu byl použit 1 % agarózový gel s TAE pufrem, obarvený Ethidium bromidem (Sigma). Do každé jamky bylo napipetováno 0,5 µg RNA, případně 10 µl cDNA, smíchané s vkládacím pufrem (Top-Bio). Velikost RNA a cDNA na gelu byla určena podle 100bp velikostního markeru (Thermo Scientific).

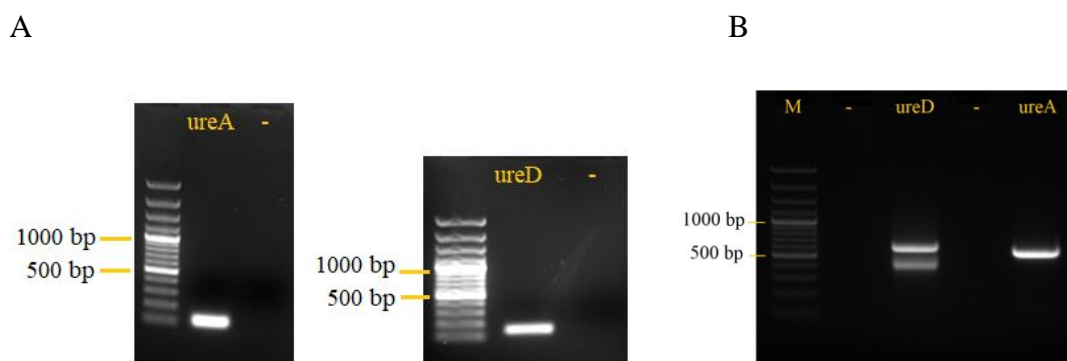
3.9 Analýza dat

Získaná data byla zpracována v programu GraphPad Prism 6 (verze pro Windows, GraphPad Software), který byl použit pro statistické analýzy a tvorbu grafů. Pro statistické analýzy byl využit neparamaterický test Kruskal-Wallis a pro porovnání mezi skupinami byl použit mnohovýběrový Dunnův test, přičemž jako statisticky významná byla považována hodnota $p < 0,05$.

4. Výsledky

4.1 Identifikace ureázy a získání její sekvence

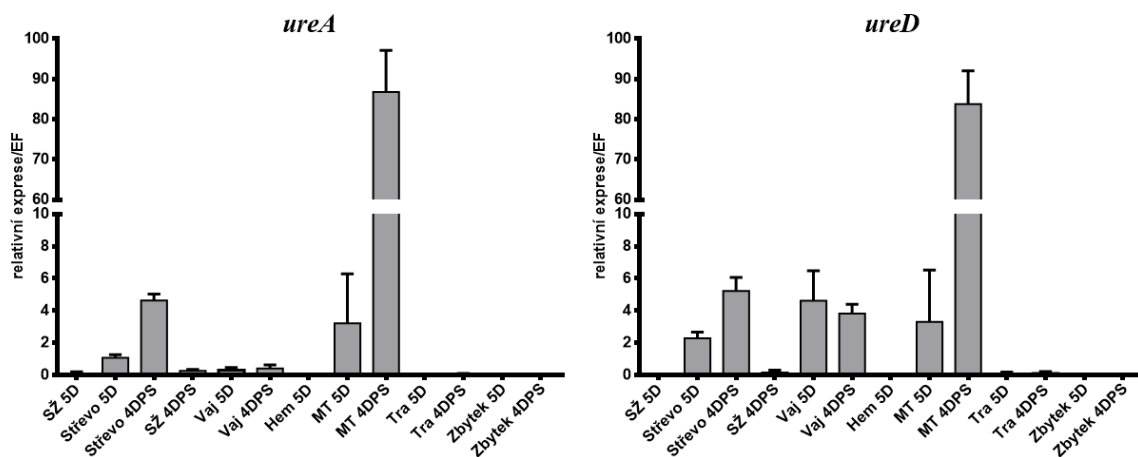
V biochemických drahách klíštěte *I. scapularis* byl nalezen enzym ureáza (Příloha 2). Bylo ověřeno, že geny pro ureázu jsou eukaryotického původu. Vzhledem k tomu, že obsahuje introny, nejedná se o bakteriální gen. Byly získány kompletní sekvence *ureA* a *ureD*, ze kterých byly dále navrženy primery pro qRT-PCR a RNAi (Příloha 3). Primery po jejich otestování fungovaly (Obr. 5).



Obr. 5. Primery určené na qRT-PCR (A) a primery na RNAi (B) pro *ureA* a *ureD* (M = velikostní marker, - = negativní kontrola).

4.2 Exprese *ureA* a *ureD* v jednotlivých klíštěcích tkáních

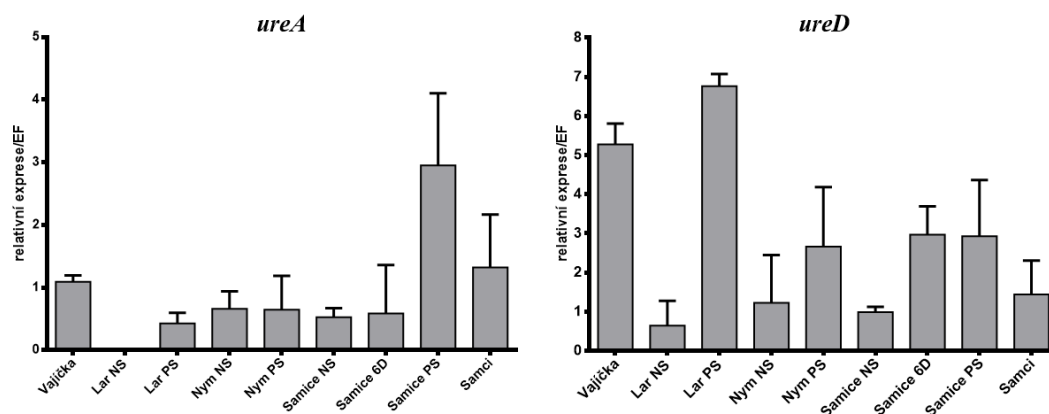
Mezi různými tkáněmi byla ve stupních exprese zaznamenána značná variabilita. Nejvíce se *ureA* i *ureD* exprimovala v Malpighiho trubicích a ve střevech plně nasátých nymf. Zvýšená exprese *ureA* i *ureD* byla navíc detekována ve střevě a Malpighiho trubicích polonasátých nymf. Navíc byla zaznamenána poměrně vysoká exprese *ureD* ve vaječnicích. V ostatních tkáních byla exprese *ureA* i *ureD* téměř nulová (Obr. 6).



Obr. 6. Relativní exprese *ureA* a *ureD* v jednotlivých klíčtčích tkáních samic *I. ricinus* (SŽ = slinné žlázy, Vaj = vaječníky, MT = Malpighiho trubice, Tra = tracheje; 5D = 5 dní sání (tzv. polonásátý stav), 4DPS = 4 dny po plném nasátí). Standardní chyba průměru ze tří biologických opakování je znázorněna pomocí chybových úseček. Vzorek s nejvyšší expresí byl nastaven jako 100 % (relativní exprese).

4.3 Exprese *ureA* a *ureD* v jednotlivých vývojových stádiích klíšat

UreA v různých vývojových stádiích klíšat ukazovala poměrně nízkou relativní expresi. U larev a samic se exprese *ureA* výrazně zvýšila po sání, u nymf tento trend nebyl pozorován. Největší exprese *ureA* byla u plně nasátých samic, u nenasátých larev byla tato exprese minimální. Exprese *ureD* byla zaznamenána ve všech vývojových stádiích, nejvíce u plně nasátých larev a poměrně vysoká exprese byla zaznamenána také ve vajíčkách. Sání zvýšilo expresi *ureD* ve všech vývojových stádiích (Obr. 7)

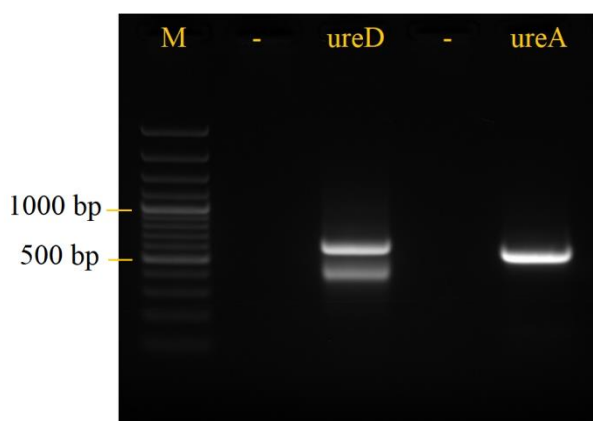


Obr. 7. Relativní exprese *ureA* a *ureD* v jednotlivých klíštěcích stádiích (Lar = larvy, Nym = nymfy; NS = nenasáté, 6D = polonasáté (6 dní sání), PS = plně nasáté). Standardní chyba průměru ze tří biologických opakování je znázorněna pomocí chybových úseček. Vzorek s nejvyšší expresí byl nastaven jako 100 % (relativní exprese).

4.4 Umlčení *ureA* a *ureD*

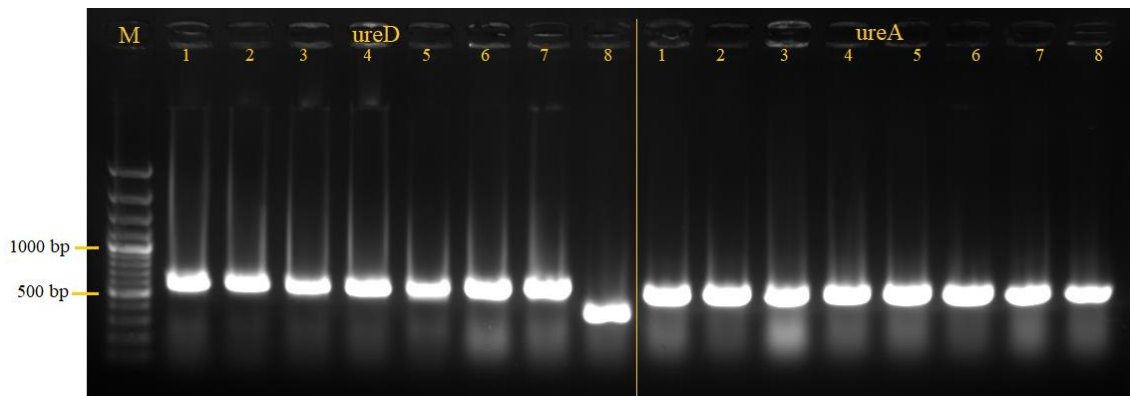
4.4.1 Klonování

Požadovaná část genu *ureA* (délka 500 bp) a *ureD* (délka 540 bp) byla namnožena pomocí PCR (40 cyklů, 55°C) a separována v agarózovém gelu (Obr. 8).



Obr. 8. Namnožené úseky *ureA* a *ureD* a jejich separace v agarózovém gelu. (M = velikostní marker, - = negativní kontrola).

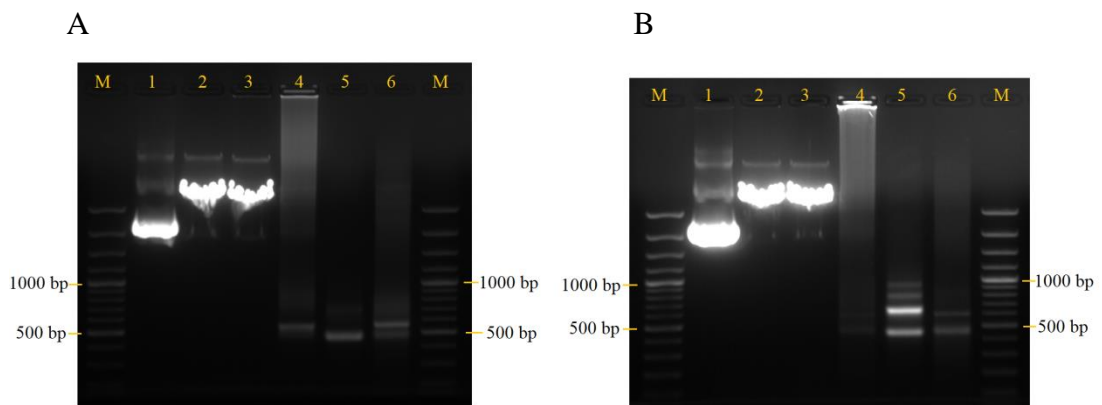
Úspěšnost transformace byla testována u osmi kolonií, jejich plazmidová DNA byla štěpena enzymy *ApaI* a *XbaI* a vyhodnocena elektroforeticky (Obr. 9).



Obr. 9. Elektroforetická separace plazmidové DNA testovaných kolonií (M = velikostní marker, 1 – 8 = testované kolonie).

4.4.2 Syntéza dsRNA

Jednotlivé ssRNA byly syntetizovány a bylo provedeno spojení jejich komplementárních vláken za vzniku dsRNA (Obr. 10).

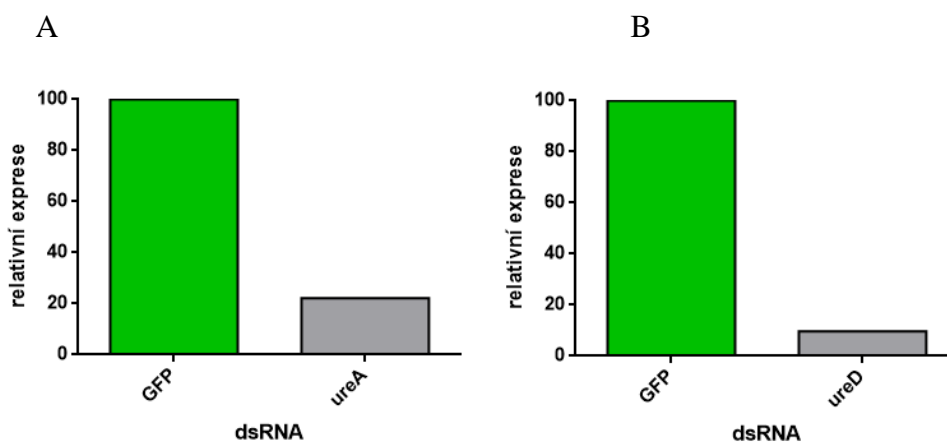


Obr. 10. Příprava dsRNA pro umlčení *ureA* (A) a *ureD* (B): M = velikostní marker, 1 – kruhový plasmid, 2 – plasmid štěpený enzymem *ApaI*, 3 – plasmid štěpený enzymem *XbaI*, 4 – ssRNA z plasmidu štěpeného enzymem *ApaI*, 5 – ssRNA z plasmidu štěpeného enzymem *XbaI*, 6 – dsRNA.

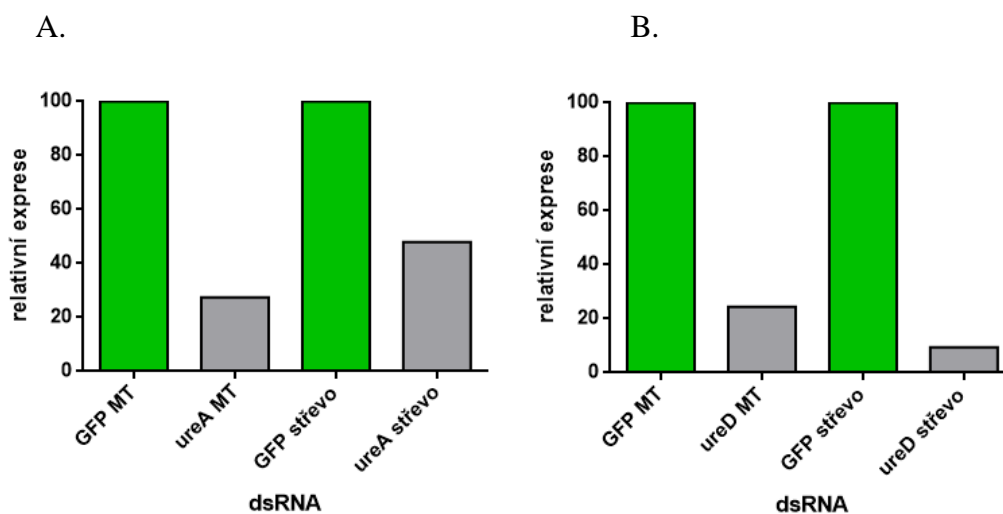
4.5 Ověření umlčení *ureA* a *ureD* po RNAi

Expres *ureA* a *ureD* u plně nasátých nymf byly oproti kontrolní skupině *gfp* výrazně sníženy (procentuální vyjádření poklesu oproti kontrole: 78% *ureA*, 90% *ureD*), (Obr. 11). Hladiny exprese *ureA* a *ureD* v Malpighiho trubicích a střevech polonasátých samic byly také výrazně sníženy v porovnání s expresí *gfp* (*ureA* 73%

v Malpighiho trubicích a 52% ve střevě; *ureD* 76% v Malpighiho trubicích a 91% ve střevě), (Obr. 12). Umlčení genu tedy bylo úspěšné a provedená RNAi fungovala.



Obr. 11. Porovnání hladiny exprese *gfp* s hladinou exprese *ureA* (A) a *ureD* (B) u plně nasátých nymf *I. ricinus*.



Obr. 12. Porovnání hladiny exprese *gfp* s hladinou exprese *ureA* (A) a *ureD* (B) v Malpighiho trubicích (MT) a střevě dospělých samic *I. ricinus*.

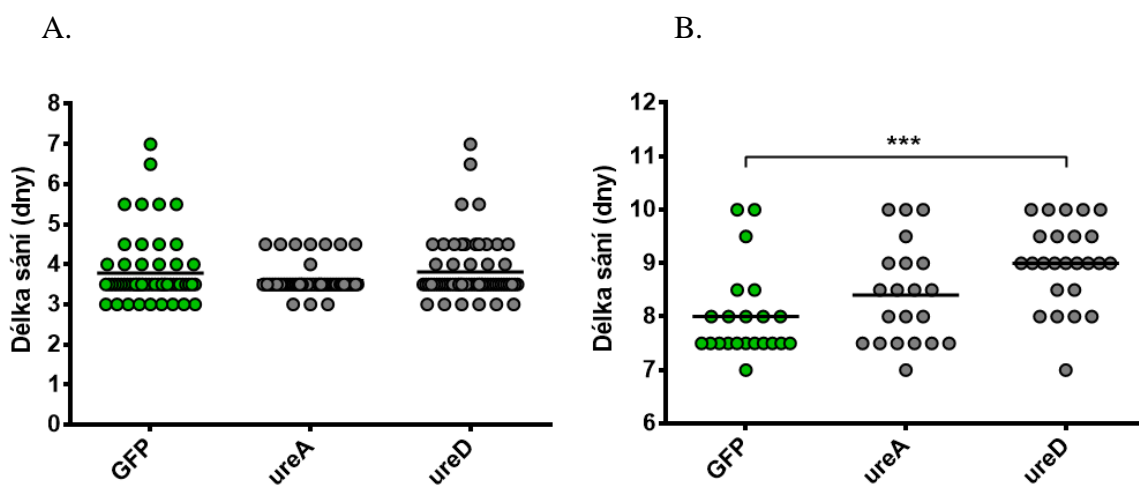
4.6 Vliv umlčení *ureA* a *ureD* na sání a další vývoj klíšťat

4.6.1 Vliv na délku sání

U nymf a dospělých samic *I. ricinus* byl sledován vliv umlčení *ureA* a *ureD* na délku sání. Nymfy v kontrolní skupině (*gfp*) sály mezi 3 a 7 dny, u experimentálních skupin nymf se délka sání pohybovala mezi 3 a 4 dny (*ureA*), případně 3 až 7 dny

(*ureD*). Průměrná délka sání se mezi kontrolními a experimentálními skupinami nymf nelišila ($p > 0,05$), (Obr. 13A).

U dospělých samic byl pozorován statisticky významný rozdíl v délce sání. U všech tří pozorovaných skupin se délka sání pohybovala mezi 7 a 10 dny, ale dospělé samice s umlčenou *ureD* sály v průměru delší dobu (o jeden den) než kontrolní klíšťata (*gfp*), ($p < 0,05$). Délka sání dospělých samic s umlčenou *ureA* se od kontrolních klíšťat nelišila ($p > 0,05$). RNA interference tedy měla vliv na délku sání samic s umlčenou *ureD*. (Obr. 13B).

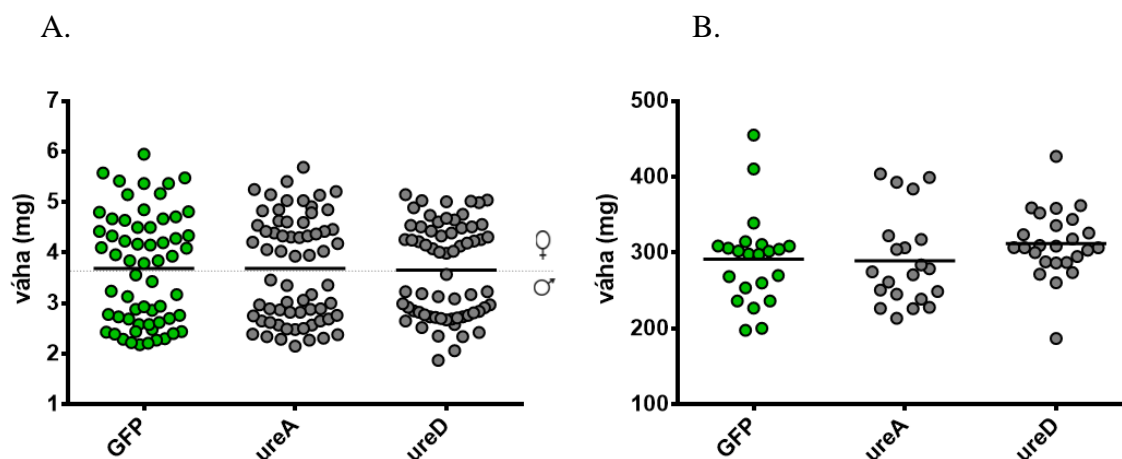


Obr. 13. Délka sání nymf (A) a dospělých samic (B) *I. ricinus* u kontrolní skupiny (*gfp*) a experimentálních skupin (*ureA*, *ureD*). Hvězdičky naznačují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi skupinami. Každý bod reprezentuje jedno klíště. Příčné čary označují průměrnou váhu klíšťat v jedné skupině. Data byla analyzována pomocí testu Kruskal-Wallis.

4.6.2 Vliv na váhy klíšťat po dosátí

U nymf a dospělých samic *I. ricinus* byl sledován vliv umlčení *ureA* a *ureD* na váhu po plném nasátí. Průměrná váha všech tří pozorovaných skupin nymf dosahovala 3,7 mg (*gfp* – 3,69 mg, *ureA* – 3,69 mg, *ureD* – 3,65 mg). Umlčení *ureA* a *ureD* nemělo statisticky významný vliv na váhu plně nasátých nymf (Obr. 14A).

Průměrná váha všech tří pozorovaných skupin samic dosahovala 297 mg (*gfp* – 291 mg, *ureA* – 289 mg, *ureD* – 312 mg). Váhy testovaných skupin samic (*ureA* a *ureD*) se statisticky nelišily od průměrné váhy kontrolních samic (*gfp*), (Obr. 14B). RNAi tedy neměla vliv na váhy plně nasátých samic.



Obr. 14. Váhy nymf (A) a samic (B) *I. ricinus* u kontrolní skupiny (*gfp*) a experimentálních skupin (*ureA*, *ureD*). Každý bod reprezentuje jedno klíště. Příčné čáry označují průměrnou váhu klíšťat v jedné skupině. Data byla analyzována pomocí testu Kruskal-Wallis.

4.6.3 Vliv na další vývoj klíšťat

Dva týdny po plném nasátí se začaly nymfy svlékat do dospělého stádia (tzv. ekdyse). Ve skupině kontrolních klíšťat (*gfp*) se úspěšně svlékly téměř všechny nymfy, nejmenší úspěšnost ekdyse se ukázala u testované skupiny klíšťat *ureA* (Tab. 6A).

U dospělých samic byl posuzován vliv ureázy na kladení snůšky vajíček. Samice s umlčenou *ureD* se vykladly ve stejném množství jako samice z kontrolní skupiny (*gfp*). Samice s umlčenou *ureA* se všechny úspěšně vykladly (Tab. 6B).

Tab. 6. Úspěšnost ekdyse nymf (A) a kladení samic (B) u kontrolní skupiny (*gfp*) a u experimentálních skupin (*ureA*, *ureD*).

A				B			
gen	<i>gfp</i>	<i>ureA</i>	<i>ureD</i>	gen	<i>gfp</i>	<i>ureA</i>	<i>ureD</i>
počet/celkem	50/57	35/61	45/61	počet/celkem	15/18	17/17	17/20
úspěšnost (%)	88%	57%	74%	úspěšnost (%)	83%	100%	85%

5. Diskuze

Tato práce ukazuje, že ureáza je nejvíce exprimována v Malpighiho trubicích a ve střevě klíšťat, přičemž její exprese stoupá se sáním. To naznačuje, že by měla být podstatná při procesu trávení a vylučování odpadních látek u klíšťat. Nicméně, v následujících experimentech se nepotvrdilo, že by absence ureázy měla vliv na testovaná stádia klíšťat. Průkazné bylo pouze prodloužení doby sání u dospělých samic při umlčení podjednotky *ureD*.

Ačkoliv vypnutí podjednotek ureázy nemělo velký vliv v našich experimentech, je možné, že vliv by se ukázal v pozdější fázi, kde ale efekt RNA interference již nemusí působit. Do budoucna by bylo vhodné zkusit některé inhibitory ureázy během membránového sání klíšťat (Perner et al., 2018). Jako inhibitory ureázy by bylo možné použít například analogy močoviny – thiomocovina, ethylmocovina a methylmocovina či thioly, například β -mercaptoethanol (Krajewska, 2009).

V rámci projektu zaměřeného na vyhledávání genů pro vytvoření účinné „proti-klíšťecí“ vakcíny jsou jednotlivé geny cíleně vypínány metodou RNA interference a sleduje se jejich vliv na přežívání a vývoj klíšťat. Při této metodě je nezbytné, aby cílený gen nebyl přítomen zároveň u hostitele (v tomto případě u lidí), což ureáza splňuje. Pro její umlčení byly vybrány dvě podjednotky – *ureA*, tvořící komplex *ureABC* strukturní podjednotky a *ureD*, jeden z přídatných genů.

U klíšťat nebyla činnost ureázy zatím popsána, ale bylo publikováno několik prací zabývajících se přítomností ureázy v klíšťeti příbuzných organismech. Přítomnost ureázy byla zjištěna i u dalších členovců, např. pavouků *Stegodyphus mimosarum* a *Parasteatoda tepidariorum*, u roztoče *Galendromus occidentalis* či ostrorepa amerického *Limulus polyphemus* (<https://www.vectorbase.org/>). Nelze však tvrdit, že je výskyt ureázy běžný u členovců jako takových. U dalších členovců, humra a velekraba japonského nebyla přítomnost ureázy prokázána (Loeb and Bodansky, 1926). Proto byl nález ureázy u klíšťat překvapivým zjištěním a předpokládali jsme, že ureáza bude mít důležitou funkci při vylučování odpadních látek, a mohla by tedy být potenciálním kandidátem na výše zmiňovanou vakcínu.

Z exprese ureázy v jednotlivých testovaných tkáních klíšťete lze soudit, že ureáza v klíšťeti nemá pouze funkci vylučovací (ve smyslu vylučování odpadních látek), ale pravděpodobně hraje nějakou úlohu též při vývoji vajíčka, kde byla zaznamenaná

vysoká exprese. Tyto výsledky jsou v souladu s prací Loeba a Bodanskyho, kteří ureázu identifikovali ve vajíčkách ostrorepa amerického (Loeb and Bodansky, 1926). Ve své práci zmiňují, že by se ureáza mohla dostat do vajíček z hemolymfy. Z našich dat vyplývá, že ureáza je prakticky nepřítomná v hemolymfě a tudíž by měla mít ureáza ve vajíčku jiný význam. U ostrorepů byla ureáza nalezena v hemolymfě a svalové tkáni. U zmiňovaných studií byl proveden test na bakteriální kontaminaci (Loeb and Bodansky, 1926), takže by se mělo opravdu jednat o ureázu pocházející z testovaných živočichů. Przylecki navíc prokázal ureázu v játrech raka (*Astacus*), (Przylecki, 1922).

U měkkýšů je ureáza zřejmě poměrně běžná. Byla nalezena u hlemýždě *Otala lactea* a u hlemýždě zahradního (*Helix pomatia*), (Przylecki, 1922). Abolinš-Krogis (1986) předpokládá, že ureáza se u hlemýžďů podílí na tvorbě vápenaté schránky (Abolinš-Krogis, 1976). Z toho vyplývá, že ureáza může mít i jiné funkce, než jen funkce spojené s vylučováním.

Klíšťata vzhledem ke svému způsobu života tráví mnoho krve, během tohoto procesu vzniká velké množství aminokyselin, které jsou dále využity jako stavební látky pro přežití a reprodukci. Nevyužité aminokyseliny jsou odbourány a odpadní látky jsou vyloučeny ve formě guaninu. Ačkoliv klíšťata jako hlavní odpadní produkt močovinu netvoří, ureáza je u nich přítomna a mají tedy možnost močovinu štěpit. Tato možnost by mohla být využita při trávení, kdy klíšťata přijímají močovinu společně s hostitelskou krví.

Tato práce se jako první zabývá přítomností ureázy u klíšťat. Ačkoliv se ureáza relativně nejvíce vyskytovala ve střevě a Malpighiho trubicích, tedy v orgánech spojených s trávicími a vylučovacími procesy, výrazný vliv umlčení ureázy na sledovaná stadia klíšťat nebyl prokázán. Pro detailnější poznání funkce ureázy u klíšťat se nabízí zvolit vhodné inhibitory ureázy a sledovat možný vliv na různá stadia klíšťat.

6. Závěr

V klíštěti *I. scapularis* byl nalezen enzym ureáza a byla zjištěna sekvence jeho podjednotek. V rámci našeho modelového druhu *I. ricinus* byly vybrány podjednotky *ureA* a *ureD* a byla stanovena jejich exprese v tkáních a vývojových stádiích klíštěte *I. ricinus*. Exprese byla nejvyšší v Malpighiho trubicích a střevě plně nasátých klíšťat všech tří testovaných stádií (larvy, nymfy i dospělé samice). Metodou RNAi byly umlčeny podjednotky *ureA* a *ureD*. Toto umlčení nemělo výrazný vliv na sání a další vývoj klíšťat. Umlčení podjednotky *ureD* prodloužilo sání u testované skupiny o jeden den. Jedním z přesahů tohoto výzkumu byla identifikace potenciálního cíle „proti-klíštěcí“ vakcíny. Ureáza zde nevypadá jako vhodný kandidát, neboť se neprokázal výrazný vliv jejího umlčení na sání a vývoj klíšťat.

7. Přehled použité literatury

- Abolinš-Krogis, A. (1976). Ultrastructural study of the shell-repair membrane in the snail, *Helix pomatia* L. *Cell Tissue Res.* 172, 455–476.
- Akov, S. (1982). Blood Digestion in Ticks, in *Physiology of Ticks*, Pergamon Press, Oxford; New York, 197–211.
- Aljamali, M. N., Sauer, J. R., Essenberg, R. C. (2002). RNA interference: Applicability in tick research. *Experimental and Applied Acarology*, 89–96.
- Anderson, J. F. (1966). The excreta of spiders. *Comp. Biochem. Physiol.* 17, 973–982.
- Arthur, D. R. (1965). Feeding in Ectoparasitic Acari with Special Reference to Ticks. *Adv. Parasitol.* 3, 249–298.
- Balashov, Y. S. (1972). Bloodsucking ticks (Ixodoidea) – vectors of diseases of man and animals. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 8, 161–376.
- Barnes, D. J., Crossland, C. J. (1976). Urease activity in the staghorn coral, *Acropora acuminata*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem.* 55, 371–376.
- Campbell, J. W., Speeg, K. V. (1968). Arginine biosynthesis and metabolism in terrestrial snails. *Comp. Biochem. Physiol.* 25, 3–32.
- Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q., Hannon, G. J. (2002). The Argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* 16, 2733–2742.
- Dixon, N. E., Gazzola, C., Blakeley, R. L., Zerner, B. (1975). Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5). A Metalloenzyme. A Simple Biological Role for Nickel? *J. Am. Chem. Soc.* 97, 4131–4133.
- Fire, A., Xu, S. Q., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806–811.
- Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G. E., Olivera-Severo, D., Carlini, C. R.

- (2004). Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: Biological effects unrelated to ureolytic activity. *Eur. J. Biochem.* 271, 1357–1363.
- Guglielmone, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Peña, A., Horak, I. G. (2010). The argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: A list of valid species names. *Zootaxa*, 1–28.
- Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Buresova, V., Franta, Z., Sauman, I. (2009). Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1033–1038.
- Hamdy, B. H. (1977). Biochemical and physiological studies of certain ticks (ixodoidea). Excretion during ixodid feeding. *J. Med. Entomol.* 14, 15–18.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293–296.
- Hoogstraal, H. (1985). Argasid and Nuttalliellid Ticks as Parasites and Vectors. *Adv. Parasitol.* 24, 135–238.
- Hoogstraal, H., Aeschlimann, A. (1982). Tick-Host Specificity. *Bull. la Société Entomol. Suisse* 55, 5–32.
- Church, D. C. (1975). *Digestive physiology and nutrition of ruminants. Volume 1*, Department of Animal Science, Oregon State University.
- Jongejan, F., Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology* 129, 3–14.
- Krajewska, B. (2009). Ureases I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 59, 9–21.
- Levashina, E. A., Moita, L. F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M., Kafatos, F. C. (2001). Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* 104, 709–718.
- Loeb, L., Bodansky, O. (1926). The occurrence of urease in the blood cells, blood

- plasma, and tissues of limulus. *J. Biol. Chem.* 67:79-90.
- Mack, E., Villars, D. S. (1923). The action of urease in the decomposition of urea. *J. Am. Chem. Soc.* 45, 505–510.
- Meister, G., Tuschli, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343–349.
- Menegassi, A., Wassermann, G. E., Olivera-Severo, D., Becker-Ritt, A. B., Martinelli, A. H. S., Feder, V. (2008). Urease from cotton (*Gossypium hirsutum*) seeds: Isolation, physicochemical characterization, and antifungal properties of the protein. *J. Agric. Food Chem.* 56, 4399–4405.
- Mobley, H. L., Island, M. D., Hausinger, R. P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59, 451–480.
- Myers, J. W., Ferrell, J. E. (2005). Dicer in RNAi: Its roles in vivo and utility in vitro. *RNA Interference Technology: From Basic Science to Drug Development*, 29–54.
- Nava, S. (2009). An overview of systematics and evolution of ticks. *Front. Biosci.* 14, 2857–77.
- Park, I. S., Hausinger, R. P. (1995). Evidence for the presence of urease apoprotein complexes containing UreD, UreF, and UreG in cells that are competent for in vivo enzyme activation. *J. Bacteriol.* 177, 1947–1951.
- Perner, J., Kotál, J., Hatalová, T., Urbanová, V., Bartošová-Sojtková, P., Brophy, P. (2018). Inducible glutathione S-transferase (IrGST1) from the tick *Ixodes ricinus* is a haem-binding protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.*
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, 45e–45.
- Polacco, J. C., Holland, M. A. (1993). Roles of Urease in Plant Cells. *Int. Rev. Cytol.* 145, 65–103.
- Przylecki, H. J. (1922). L'échange de l'eau et des sels chez les amphibiens. *Arch. Int. Physiol.* 19, 148–159.

- Quiroz-Valenzuela, S., Sukuru, S. C. K., Hausinger, R. P., Kuhn, L. A., Heller, W. T. (2008). The structure of urease activation complexes examined by flexibility analysis, mutagenesis, and small-angle X-ray scattering. *Arch. Biochem. Biophys.* 480, 51–57.
- Roberts, L., Janovy, J. (2000). *Foundation of parasitology*, 8th ed. McGraw-Hill, New York.
- Sahrawat, K. L. (1980). Control of urea hydrolysis and nitrification in soil by chemicals-Prospects and problems. *Plant Soil* 57, 335–352.
- Sonenshine, D. (2014). *Biology of ticks*. Oxford University Press, New York.
- Steere, a C., Sikand, V. K., Meurice, F., Parenti, D. L., Fikrig, E., Schoen, R. T., et al. (1998). Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *N. Engl. J. Med.* 339, 209–215.
- Sumner, J. B. (1926). The isolation and crystallization of the enzyme urease: preliminary paper. *J. Biol. Chem.* 69, 435–441.
- Tijsterman, M., Ketting, R. F., Plasterk, R. H. A. (2002). The Genetics of RNA Silencing. *Annu. Rev. Genet.* 36, 489–519.
- Voet, D., Voetová, J. G. (1995). *Biochemie*. 1st ed. John Wiley & Sons, Inc., Praha.
- Volf, P., Horák, P. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. Triton, Praha/Kroměříž, 306.
- Wang, W. H., Köhler, B., Cao, F. Q., Liu, L. H. (2008). Molecular and physiological aspects of urea transport in higher plants. *Plant Sci.* 175, 467–477.
- Waterhouse, P. M., Wang, M. B., Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834–842.
- Witte, C. P. (2011). Urea metabolism in plants. *Plant Sci.* 180, 431–438.
- Wright, P. (1995). Review Nitrogen Excretion: Three End Products, Many Physiological Roles. *J. Exp. Biol.* 281, 273–281.

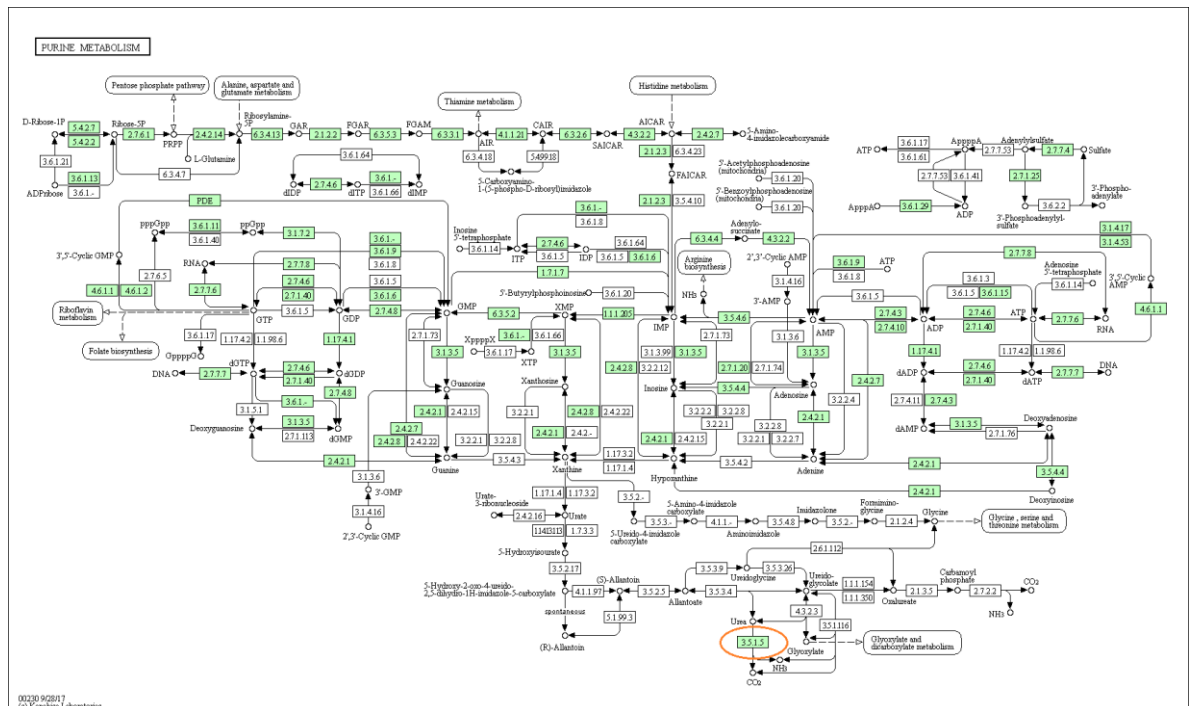
8. Příloha

Příloha 1. Primery použité pro qRT-PCR a RNAi.

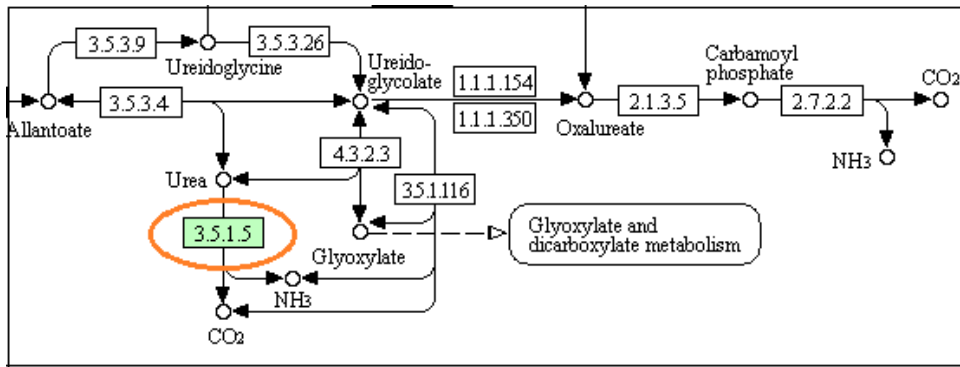
Název	Popis	Sekvence (5'→3')	Velikost produktu (bp)
IR742	<i>ureA</i> – qRT-PCR-F	CCTTGGACATGCTCATCATC	104
IR743	<i>ureA</i> – qRT-PCR-R	GTCTCGGCAGCAATAGTCT	
IR704	<i>ureA</i> – RNAi-F	ATGGGCCCCCATCAGCATCTACTCATCC	500
IR705	<i>ureA</i> – RNAi-R	ATTCTAGACTTCCTTGAGCCGGACACG	
IR698	<i>ureD</i> – qRT-PCR-F	GAGCGTGCCTGAGGACTAC	138
IR699	<i>ureD</i> – qRT-PCR-R	TTGGAGTAGGCCTGGAAAGA	
IR700	<i>ureD</i> – RNAi-F	ATGGGCCCGTTCCTGCCACGCGATGTCG	540
IR701	<i>ureD</i> – RNAi-R	ATTCTAGACCTGGCGCACAGCGAGCTG	
IR492	M13F – seq.	TGTA AACGACGGCCAGT	600
IR493	M13R – seq.	CAGGAAACAGCTATGACC	

Příloha 2. Metabolismus klišťete *I. scapularis* z databáze KEGG obsahující enzym ureázu (A), detail lokalizace ureázy (B).

A



B



Příloha 3. Nukleotidová sekvence *ureA* (A) a nukleotidová sekvence *ureD* (B). Primery pro qRT-PCR jsou označeny žlutě a primery pro RNAi jsou označeny zeleně, stop kodon je označen modře. Vzhledem k neúplnosti celé sekvence, start kodon zde není vyznačen.

A

```

ACGACATCCAGGCGCTGATCCACACGGACACGCTGAACGAGTCCGGTTGCCTGGAGCAGA
CGGTGGAGGCCTTCGCCGGCCGCTGCATCCACGCGTACCACGCCGAGGGCGCCGGCGGGG
GTCATGCGCCCCGACATCATCGCCGTCTGCGGAGAGCCCAACGTCATTCCCTCGTCCACCA
ACCCACTCGGCCCTACACGAAGAACACCGTGGACGAGGCCTTGGACATGCTCATCATCT
GTCATCATCTGGACAGGAATATCAAGGAGGATCTGTCTTTCGCGGAGTCGCGAATTCGAG
CCGAGACTATTGCTGCCGAGGACGTTCTTCATGATATTGGCG CCATCAGCATCTACTCAT
CCGATGCCCTGGCCATGGGCAGGATCGGCCGAAGTGGTGAGCAGGACGTGGCAGACGGCGG
ACAAGATGCGACTCGTTAGGGGAAAGCTCGATGAGGACTCCCCAACAAATGACAACCTTCC
GGGTGAAGCGGTACATCGCGAAGTACACCATCAACCCTGCCCTGGCCCATGGCATCGCCT
CTTACGTCGGTTCTGTAGAGCCAGGAAAAATGGCCGACCTCGTGCTCTGGAAGCCGGGGT
TGTTTGGTGCAAAGCCTGAGCTTGTGATCAAGGGAGGGCAGATCATCAGTGCGCAGATAG
GTCTGGCAAATGGCTCCATCCAAATGCAGAACCCATGATGCTACGGAAAAATGTTTGGTG
CCTGTGGAATCTCAACTAGGAAAAACTCAGCTGTATTTCGTGTCGCAGGTCTCACTGGACA
AAGGAATAGTTCAGAAATATGGAGTGAAGAAGATACTTCTTCC CGTGTCCGGCTCAAGGA
AGATAACAAAGAGCGACTTTGTGCTGAATAGTCTGACGCCAAA ACTCTCAGTTCACCCCG
AGAAGTATCTCGTGAATGGATCAAAGAGGAAGGTGGCAAGGAGAAGAGGGTGCACCTTA
CAGTTCCTCCG ICTGACCACATTGCTCTTGCACAGACCTATTTTCTTTTC TAAGATAGCC
AAATCGACGCCATCTTGAAAATCTGTTTTTCGAGGGCGCTACTCGAAAGCCGAATTTGTT
TATATTIGTGGTGCCGAAAGATTGATAACAAAATGTTTTACAGGGCAGCATATATTATT
TGCAGGATGTAATGTATATAATTGCGTATAATTACTGTATATTCATTATAAAAATCGTTAT
GTTTTACTTTGTTTTCTTATATGAGTTTACGAACGGAAGTGTATGGCTATTTTCTGAGAG
TTGAAAGAAAATCTCAAAAACAAGCGAAGATATTGTATAATCATTTTAAGAAACTTTGGCT
ATTGAAAATTGCAAAAATAATGCATTTGAACATTTATGATTTTTGATTAAGGTTACCGT
ACTTCCATGTGATAAAAATTCCTCATTACATTCTGGCTGGAAGAGGAGTGAAATGATTA
ACGCTCGGAAATTTTGATTTGTTCTGTTTCGAGCTTCGACACGAAGGAAGGTTGTGGCGG
CACTTTGTTGAGTTATCAACACAGCATAGTGACAACACCTCATTGGATGACAAAGCCGCA
ATGCTAAATGTTTGGTGCCACATAACGAAGTCCAACGCAGTGCATAGATTAGACCCTGG
TGCTGCGTTAACGTTCCGGCTGAGACTCGCGTTCGCTTATTTTGGGTCACGCTTAGGATTC
ATTATCCAGAGAAAATTTATCTCTGCAGTTCTAGATAGCACGCCAACGAAAACGCTGAC
TTGACACAAGTTTGGAAATCGTAATTACTTTACTTAGGTCTAATAAGGCGTAACTTAGTA
CCAGAGTACTTTTCTTTGGTGTTTTTTATAGCTTTTGTCCGGTTGGCCACTTGTTTTGTTT
ATTTGTTTATTTTATTTTGGACACAATTGTCAAGGGGGTTGGGACAA

```

B

GTTCTTATTTGTTTCGGCGCTATCTCCAGACTGCGTGAAGCGTTCAGTGAGCCCGAGATCC
AGACGGAGGCGACGGCCGAGCGCCAGGATGAAGGGATCCGTTCCGTGCACACCGGGGG
TAGTGACAAGGGAGGCTTGC GGCTGGCAACGGTCGGGGGATCCTGGTCTTCGAGGCTA
CGGACGACGACTCCTCGGGCCCTTTCTCCTGGAGCGAGGGCAGCGATGCTTCTGCACTT
ACCCCTGAAAAGT **GTTCCAGCACGCGATGTCG** GCCCGCCGTGTGCCGCTGGATCTACC
CGGCTGTCTTCGGCGGGGGCCTGGTGAGCGGGCAGTCATCGACATCGACATCACGCTG
GGAGCCAAGACCTGCGTCCTGCTCACCTCGCAGTCCTTCCCAAAGGTCTACGTGGCCGAG
CCGGGTCGGGTGGCAGAGCAGCGCTGCCGCTTCTCGCTGTCCGACGGCGCTCTGCTGTGC
GTGCTGCCAGACCTGCTGACCTGCTTCCGTGACGCCTCGTACCGCCAGGAGCAGGCCGTG
CGCATGGCGGGCTCGGCCAGCCTCGTGCTGCTCGACTGGTTTCTGGCCGACGCGTGGCC
AACGGCGAGCGCTGGGACTTCACCAGACTGACGTCCGTGGTCGAGGTGTACTTGGAAGA
GCAGATGGTCCCTTCGCGAAGCCCTGGACATGGCCGATGTGCCGGGCCTGCGGCTCAGGG
CGTCCATGGGCGAGTACAACGTCGTGGGCACCTGCATCGTGGTCGGCCCCACCTGACC
GACCTGT **CCAGCTCGCTGTGCGCCAGG** TT **GAGCGTGCCTGAGGACTAC** GGGGTACCGCC
GGCGCGGAAGTGGTCTTCGCTTGCAGCCCGTTCAGCTCGAGCTGCCAGAGGGTCCAGG
GTTGCGTGTGCGCTTCGGGACGTGCACC **TCTTCCAGGCCTACTCCA** AGCTGGAGGAAT
TGCTGCAGCCACTTTTTGCCGTCTTGGGCGGGAATCCATTCCACCTGAAATAC **TGA** CCA
GGAGGGGCACGAACTGCGTGCGGTTTCTATCCCCATGCGCGCCTCTACGCACCTTACTCG
CGGTTTTTTTAGACTATAGAATGAGCGACTTCGTAATTTAGTGCGGTTTCTGCGTTTGT
TCCTGGATGTAGATGATCACAAATTTTCGTCATGTACAGCCATGTCTTTCACCTCGTGAA
ACCCGATGCAACATCTTCATGCATGGTATAACCAGCTCCGTCGTCATTGCATCAAGCGCT
GGCGGCTGGAAGCAAAGGAATTAATTAACAGTGTGATGATAAAGAAAAATATCAGCA
GGGTTTTTCGTAAGCGGAATTAACAGACGTATGTCCTATAATCTAAGAACCTGTGTGC
TGATGAAATTGCACCTATTCAAAAGTTACGGGTATTTAGAATCACTTTGAGGAAGATAAA
ATAGTGCCATATTTTTAACTGACTTAATACAGATACTAGCTGTAAATTAATTACACCGAT
TGTATAAAGAAGTGTTTTTTTGTTTGTTTTAAATAGTGTAGCTATAGGCGGTTTT