

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Regulace a úloha insulin-like peptidů u klíštěte *Ixodes ricinus*

Bakalářská práce

Michaela Váchalová

Školitel: Jan Perner, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Petr Kopáček, CSc.

České Budějovice 2024

Bibliografické údaje:

M. Váchalová, 2024: Regulace a úloha insulin-like peptidů u klíštěte *Ixodes ricinus*. [Regulation and role of insulin-like peptides in the tick *Ixodes ricinus*. Bc. Thesis, in Czech] – 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

In the tick *Ixodes ricinus*, which belongs to the Ixodidae family, insulin-like peptides (ILPs) are crucial regulators involved in blood-feeding and digestion. This bachelor thesis investigated the expression profiles of four ILPs in different blood-feeding stages and various tick tissues. RNA interference (RNAi) was employed to silence the expression of each ILP, and the subsequent effects on female tick phenotype were analysed. Silencing ILP4 expression resulted in a significant decrease in female survival rate (by 80%) during blood-feeding on a host. This suggests that ILP4 plays an essential role in, for example, blood meal digestion or physiological processes vital for blood-feeding success.

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

V Českých Budějovicích, dne 12.4. 2024

.....

Michaela Váchalová

Poděkování

Děkuji svému školiteli Honzovi Pernerovi za jeho čas a odborné rady. Zároveň bych ráda poděkovala Petru Kopáčkovi za umožnění učit se v jeho laboratoři novým metodám. Také bych chtěla věnovat speciální poděkování Lence Grunclové a všem členům laboratoře za jejich pomoc a za vše co mě naučili. Velké díky patří hlavně mé rodině, přátelům a mému příteli za to, že při mně stáli a podporovali mě.

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	3
2.1. Krevsající členovci	3
2.1.1. Roztoči	3
2.1.2. Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>)	4
2.2. Metabolismus klíštěte <i>Ixodes ricinus</i>	4
2.2.1. ILPs	5
2.2.2. ISP	7
2.2.3. Role ILPs v klíštěcím metabolismu	7
2.3. RNA interference	9
2.3.1. Využití RNA interference	9
3. Cíle práce	11
4. Materiály a metody	12
4.1. Získání tkání z klíšťat	12
4.2. Izolace totální RNA a syntéza cDNA	12
4.3. Analýza genové exprese v tkáních pomocí RT-PCR	12
4.4. Syntéza dsRNA	13
4.4.1. Amplifikace, přečištění a restrikce PCR produktu	13
4.4.2. Ligace PCR produktu do plazmidového vektoru	14
4.4.3. Transformace plazmidového vektoru do <i>E.coli</i>	14
4.4.4. Restrikce a přečištění plazmidu	15
4.4.5. Syntéza a přečištění ssRNA	16
4.4.6. Syntéza dsRNA	17
4.5. Mikroinjikace klíšťat dsRNA	17
5. Výsledky	18
5.1. Analýza genové exprese v tkáních pomocí RT-PCR	18

5.2.	Transformace plazmidového vektoru do <i>E.coli</i>	21
5.3.	Ověření fenotypu RNAi <i>ilp1</i> , <i>ilp3</i> , <i>ilp4</i> a <i>ilp5</i>	23
5.4.	Analýza exprese <i>vg1</i> a <i>vg2</i> po RNAi <i>ilp1</i> , <i>ilp3</i> , <i>ilp4</i> a <i>ilp5</i>	25
5.5.	Vliv RNAi na fenotyp jedinců.....	28
6.	Diskuze	31
7.	Závěr.....	36
8.	Seznam použité literatury.....	37

1. Úvod

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je krev sající ektoparazit jenž vyniká svojí schopností nasát a strávit velké množství krve (Reuben Kaufman, 2007), díky čemuž získává dostatečné množství živin pro naklazení tisíců vajíček (Sonenshine & Roe, 2013). Zároveň se klíšťa dokáže efektivně bránit imunitním reakcím svých hostitelů (Armstrong, 2006), což ztěžuje vývoj látek pro kontrolu jejich populace a tím i přenosu nemocí.

Insulin-like peptidy (ILPs) jsou proteinové molekuly, které mají klíčovou roli v regulaci růstu a rozmnožování u bezobratlých organismů (Badisco et al., 2013), včetně klíšťa. (Sharma et al., 2019), (Kozelková et al., 2021). Váží se na transmembránové inzulínové receptory (InR) a slouží tak jako hormony, neurotransmitery a růstové faktory. ILPs se svojí funkcí velmi podobají lidskému inzulínu, jelikož také reagují na výživový stav organismu. K objevu molekul podobných inzulínu obratlovců u hmyzu došlo poprvé asi před 40 lety, kdy byly prezentovány imunopozitivní výsledky barvení v tkáňových řezech různých druhů hmyzu pomocí protilátek proti inzulínu obratlovců (Duve & Thorpe, 1981). Od té doby bylo provedeno mnoho studií na různých skupinách bezobratlých, jako jsou členovci (Arthropoda, (Adachi et al., 1989), (Lagueux et al., 1990), (Nasonkin et al., 2002), (Riehle et al., 2006)), měkkýši (Mollusca, (Smit et al., 1988), (Floyd et al., 1999)) či hlístice (Nematoda, (Duret et al., 1998)) a u všech byly identifikovány ILPs spadající pod velkou multigenovou rodinu mající schopnost vázat se na inzulínový receptor (Wang et al., 2014).

ILPs figurují v inzulínové signální dráze (ISP), která je napříč Metazoa velmi evolučně konzervovaná. V odpovědi na pozitivní nutriční stav se zvyšuje produkce inzulínu u obratlovců či ILPs u bezobratlých, a tím se spouští různé anaboličké procesy zahrnující růst a rozmnožování. Prvním ILP identifikovaným u hmyzu byl bombyxin, který byl izolován z bource morušového (*Bombyx mori*) a byla u něho zjištěna strukturální podobnost s inzulínem obratlovců (Nagasawa et al., 1984). Avšak narozdíl od obratlovců je u bezobratlých znám pouze jeden gen receptoru pro peptidy podobné inzulínu (Wu & Brown, 2006), ale novější výzkumy odhalily více různých InR v několika řádech hmyzu, které jsou důsledkem velkých duplikací v genu (Kremer et al., 2018). Výzkumy ISP ukazují, že je tato signální dráha u bezobratlých strukturálně zachovalá (Antonova et al., 2012), ale konkrétní ILPs se u různých druhů liší v aminokyselinové sekvenci. Byly objeveny 4 ILPs (ILP1, ILP2, ILP3 a ILP4) u klíšťa *Ixodes scapularis* (Sharma et al., 2019), jejichž homologické

geny byly nalezeny i u klíštěte *I. ricinus* (Kozelková et al., 2021). Nicméně stále je známo jen málo o sekreci ILPs u klíšťat a jejich přímé interakci s cílovými tkáněmi.

RNA interference (RNAi) je účinný nástroj, který umožňuje potlačit expresi specifických genů ve vybraném organismu (Kim & Rossi, 2008). Tato technika se stává klíčovým nástrojem pro studium funkce genů. Aplikace RNAi na regulaci *ilp's* genů může poskytnout nové informace ohledně funkce těchto peptidů u klíšťat.

Cílem této práce bylo zkoumat úspěšnost RNA interference, pomocí RT-PCR, a její vliv při regulaci ILPs na biologické procesy klíštěte *Ixodes ricinus*. Byly identifikovány 4 geny pro *ilp's* u klíštěte *I. ricinus*. Nejprve bylo zkoumáno, v jakých tkáních se jednotlivé *ilp's* exprimují a dále byly na ně navrženy a nasyntetizovány 4 specifické dsRNA. Nenasáta klíšťata pak byla napíchána jedním druhem dsRNA a nechána sát na morčatech a následně se posuzovaly biologické parametry jako je velikost a úspěšnost sání, velikost vaječných snůšek a schopnost embryonálního vývoje a líhnutí larev.

2. Literární přehled

2.1. Krevsající členovci

Krevsající (hematofágní) členovci jsou významná skupina členovců (Arthropoda) spadající do pododdělení prvoústí (Protostomia). Největší skupiny krevsajících členovců jsou hmyz a roztoči. Krevsající členovce lze rozdělit do dvou hlavních kategorií: permanentní (trvalé) a temporární (dočasné).

Permanentní hematofágní parazité, jako jsou vši a kloši, zůstávají na svých hostitelích po celou dobu svého životního cyklu. Jsou přizpůsobeni pro dlouhodobý pobyt na hostitelích a živí se krví pravidelně. Temporární hematofágní parazité, jako jsou roztoči, ploštice, dvoukřídlý hmyz a blechy, na rozdíl od permanentních parazitů nezůstávají na hostiteli trvale. Hostitele vyhledávají pouze za účelem sání krve a poté se vrací do svého prostředí. Tito dočasně krevsající paraziti jsou často označováni jako mikropredátoři, protože se chovají podobně jako predátoři při hledání a sání krve (Volf & Horák, 2007).

Krevsající členovci mají specializované kousací nebo bodavě sací ústní ústrojí, které jim umožňuje pronikat do cév hostitele a sát krev. Tento způsob výživy je pro hostitele rizikový, jelikož může docházet k přenosu nebezpečných nemocí (malárie, spavá nemoc, tyfus, lymeská borelióza, klíšťová encefalitida aj.). Z toho důvodu tito parazité činí důležitý faktor v oblasti veřejného zdraví a zemědělství.

2.1.1. Roztoči

Roztoči (Acari) tvoří velmi rozmanitou a významnou skupinu členovců. Vyskytují se v různých typech prostředí, od půdy po vodu, vzduch a různé hostitele, včetně rostlin, zvířat i lidí. Morfologicky se roztoči skládají z dvou hlavních částí – hlavové části (gnathonoma) a vlastního těla (idiosoma). Na hlavové části se nachází přeměněné končetiny na klepítka (chelicery). Vlastní tělo má čtyři páry končetin.

Někteří roztoči se živí saprofágně a mají tak významnou úlohu v rozkladu organické hmoty, což je klíčový proces pro recyklaci živin v ekosystémech. Jiné druhy roztočů fungují jako predátoři škodlivých organismů a mohou být využíváni v zemědělství jako forma biologické ochrany rostlin či včelstev před parazity. Takto se ku příkladu dá využít dravý roztoč *Stratiolaelaps scimitus* pro kontrolu populace parazitického roztoče kleštíka včelího (*Varroa destructor*) (Rondeau et al., 2018).

Mnoho roztočů se ale živí paraziticky a mohou být přenašeči nemocí či figurovat jako spouštěči různých alergií.

2.1.2. Klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

Klíště obecné je drobný parazitický členovec patřící do řádu klíšťat (Ixodida), čeledi klíšťatovití (Ixodidae). Tento druh klíštěte je běžně rozšířen po celé Evropě a je známý svým významem v oblasti lidského zdraví. Je aktivní od března až do konce října a vyhovuje mu vlhčí klima. Žije parazitickým způsobem života a živí se krví hostitelů, ze které získává živiny a energii. Samice klíštěte dokáží nasát až 1 ml krve, což je přibližně 100×násobek jejich původní hmotnosti. Díky takovému příjmu energie mohou naklást okolo tisíce vajíček.

Z vajíček se líhnou larvy, které mají jako jediné vývojové stadium 3 páry končetin. Měří asi 0,8 mm a sají krev většinou na hlodavcích, avšak mohou sát i na člověku. Po plném nasátí odpadnou a dostanou se do stádia metamorfózy, kdy dochází k přeměně orgánů. Vyším vývojovým stádiem je nymfa. Ta měří přibližně 1,2 až 1,5 mm a má již 4 páry končetin. Kromě člověka saje na větších zvířatech jako jsou ježci, králíci či kočky a psi. Po opětovném nasátí se dostává do konečné metamorfózy na dospělce, samce či samici.

Samice je oproti samci větší, za hlavovou částí má malý černohnědý štítek (scutum) a její zadeček je výrazně oranžový až červený. Díky menšímu štítku dokáže mnohonásobně zvětšit svůj objem při sání krve. U samců štítek pokrývá celý zadeček, a tak je samec oproti samici tmavý. Samec nesaje krev a hostitele vyhledává pro setkání se se sající samicí, kterou oplodní a následně hyne. Samice vyhledává ještě větší hostitele než nymfa, jako jsou lišky, jeleni či dobytek. Po nakladení vajíček hyne. Právě střídání hostitelů a poměrně dlouhý životní cyklus činí z klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) perfektního přenašeče různých patogenů jako je lymeská borelióza a klíšťová encefalitida (Bartůnek, 2006).

2.2. Metabolismus klíštěte *Ixodes ricinus*

Klíšťata sají velká množství krve pro získání dostatku živin na produkci vajíček. Konkrétně je pro klíště významný hlavně protein hemoglobin a sérový albumin. Při trávení jsou v reakci na vyšší přítomnost aminokyselin uvolňovány insulin-like peptidy (ILP) (Géminard et al., 2009) a aktivují se signální dráhy, které způsobují spuštění oogeneze. K trávení dochází ve střevě, jenž tvoří přibližně 80 % jejich těla. Trávicí systém klíšťat je dokonale přizpůsobený pro zpracovávání krve. V lumen střeva dochází k rozkladu červených krvinek

a v nich obsažené proteiny se dále transportují do střevních buněk, kde jsou tráveny v kyselém prostředí lysozomů (Sojka, 2016).

Mezi trávené proteiny patří i hemoglobin, jenž je štěpen na oligopeptidy a volné aminokyseliny. Ty se dostávají do cytoplasmy buněk a jsou dále využívány pro různé metabolické procesy, ku příkladu pro syntézu vitellogeninu (Sojka et al., 2013). Vitellogenin je kódován dvěma geny, *vg1* a *vg2* a je prekurzorem vitellinu, hlavního proteinu vázající hem ve vaječnicích klíštěte, kde zastupuje nezbytnou roli pro embryonální vývoj (Perner et al., 2016).

Volné aminokyseliny jsou rozpoznány tukovým tělesem, který vyšle signál do mozku a aktivuje se signální dráha ISP (insulin signaling pathway) (Géminard et al., 2009). Ta se dále propojuje se signální dráhou zahrnující kinázu TOR (target of rapamycin). Tyto dvě dráhy reagují na tvorbu produktů trávení. Slouží tak jako senzory stavu výživy a řídí různé metabolické procesy, mezi něž patří reprodukce (Badisco et al., 2013). Signální dráha ISP zahrnuje transmembránový inzulinový receptor (InR), na který se vážou insulin-like peptidy (ILPs) a tím ho aktivuje (De Meyts & Whittaker, 2002).

2.2.1. ILPs

Funkcí se podobají lidskému insulinu, jelikož také reagují na výživový stav organismu a řídí metabolismus tím, že fungují jako hormony, neurotransmitery a růstové faktory (Wu & Brown, 2006). Jsou součástí insulinové signální dráhy (ISP) vyskytující se u bezobratlých organismů, kde je evolučně velmi konzervovaná (Claeys et al., 2002).

Tyto peptidy spadají pod velkou multigenovou rodinu, avšak nemají stejnou sekvenci aminokyselin, ale spojuje je schopnost vázat se na insulinový receptor. To je umožněno konzervovanými cysteinovými zbytky, které jsou umístěny po celé délce molekuly a tvoří mezi sebou disulfidické můstky, čímž se peptid skládá do určité struktury potřebné pro aktivaci insulinového receptoru (Sharma et al., 2019).

ILPs byly u bezobratlých objeveny v roce 1981, kdy byly prezentovány imunopozitivní výsledky barvení v tkáňových řezech různých druhů hmyzu pomocí protilátek proti insulinu obratlovců (Duve & Thorpe, 1981). Přítomnost ILPs u klíšťat byla poprvé zaznamenána pomocí pozitivních imunoreakcí s protilátkami proti lidskému insulinu (Zhu & Oliver, 1991) a bylo zjištěno, že hraje důležitou roli v metabolismu klíšťat (Badisco et al., 2013).

Schopnost protilátek, namířených proti insulinu obratlovců, vázat se na ILPs bezobratlých dokazuje, že insulin a ILPs mají podobnou molekulární strukturu (Mizoguchi & Okamoto, 2013). ILPs byly nalezeny u mnoha druhů organismů jako například u členovců (Arthropoda) (Van Noorden & Falkmer, 1980), měkkýšů (Mollusca) (Fritsch & Sprang, 1977), hlístic (Nematoda) (Wang et al., 2014), kroužkovců (Annelida) (LeRoith et al., 1981) či ostnokožců (Echinodermata) (Wilson & Falkmer, 1965), a dokonce i u jednobuněčných organismů a rostlin (Collier et al., 1987). Prvním ILP identifikovaným u hmyzu byl bombyxin, který byl izolován z bource morušového (*Bombyx mori*) a byla u něho zjištěna strukturální podobnost s insulinem obratlovců (Nagasawa et al., 1984).

Bombyxin se stejně jako insulin skládá ze dvou řetězců spojených disulfidickými vazbami a počet cysteinových zbytků a rozestupy mezi nimi jsou stejné jako u insulinu. Dále bylo prokázáno, že terciární struktura bombyxinu je podobná insulinu a má charakteristický insulinový záhyb hlavního řetězce (Nagata et al., 1995). Avšak ILPs narozdíl od insulinu postrádají schopnost tvořit dimery či hexamery. Navíc výzkumy ukazují, že ILPs jsou syntetizovány v mozku bezobratlých, na rozdíl od insulinu obratlovců, který je produkován ve slinivce (Smit et al., 1998). Také bylo zjištěno, že bombyxin je uvolňován při zvýšeném množství glukózy, podobně jako insulin u obratlovců (Mizoguchi & Okamoto, 2013).

Zdálo se ale, že toto neplatí u všech ILPs, jelikož při pokusu na izolovaném mozku octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) se po přidání glukózy ILP neuvolňoval (Géminard et al., 2009). Avšak u mozkových buněk produkujících ILPs se některé elektrické vlastnosti zdály být ovlivněny glukózou (Fridell et al., 2009). Což naznačovalo spojitost mezi dostupností glukózy a ILPs. Při dalším studiu octomilky bylo pozorováno uvolňování ILP do hemolymfy po přijmutí živin, ale izolovaný mozek po dodání živin ILP neuvolňoval. Nakonec se ukázalo, že uvolňování ILP z mozkových buněk je indukováno humorálním faktorem uvolňovaným z tukového tělíska při přítomnosti aminokyselin (Géminard et al., 2009). Dle dalších studií by se celkově dalo říci, že z tukového tělíska se mohou uvolňovat různé faktory stimulující uvolňování ILP v odpovědi na přítomnost různých živin a tukové tělísko tak hraje důležitou roli v rozpoznávání výživového stavu organismu a jeho signalizaci (Rajan & Perrimon, 2012).

2.2.2. ISP

ILPs figurují v inzulínové signální dráze (ISP), která je napříč Metazoa velmi evolučně konzervovaná. V odpovědi na pozitivní nutriční stav se zvyšuje produkce insulínu u obratlovců či ILPs u bezobratlých, a tím se spouští různé anabolické procesy zahrnující růst a rozmnožování (Nagasawa et al., 1984). Na ISP následně navazuje signální dráha TOR (target of rapamycin), jenž stimuluje růst tkání úpravou biosyntézy proteinů a bylo prokázáno, že u *D. melanogaster* reguluje produkci ILPs (Colombani et al., 2003). ISP se spouští po navázání ILP na transmembránový inzulínový receptor (InR) (De Meyts & Whittaker, 2002).

Inzulínový receptor je tyrosinkináza, u níž se po navázání ILP spouští fosforylace tyrosinových zbytků substrátu inzulínového receptoru. Tím se spouští kaskáda, která končí aktivací signální dráhy MEK/ERK (mitogenem aktivovaná kináza/ extracelulárním signálem regulovaná kináza), která řídí různé buněčné procesy, jako je buněčná proliferace, diferenciace a vývoj organismu (Shaul & Seger, 2007).

U obratlovců byly popsány 3 odlišné receptory vázající insulín, lišící se v primární struktuře a funkci (Morgan et al., 1987; Ullrich et al., 1985, 1986). Zatímco u bezobratlých byl popsán pouze 1 inzulínový receptor (Wu & Brown, 2006). Avšak v novějších studiích bylo u několika skupin hmyzu popsáno více inzulínových receptorů a fylogenetické rekonstrukce genů odhalily velké duplikace a ztráty v genové sekvenci inzulínového receptoru (Kremer et al., 2018).

2.2.3. Role ILPs v klíštěcím metabolismu

Složky ISP byly podrobně zkoumány u hmyzu (Ahlers et al., 2019), zato u pavoukoců výzkum ISP zaostává. Byl proveden výzkum na klíštěti černonohém (*Ixodes scapularis*) u něhož byly identifikovány 4 geny kódující ILPs (*ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5*) (Sharma et al., 2019), které se přirozeně vážou na inzulínový receptor. U klíštěte *I. ricinus* byly v transkriptomech střev a slinných žláz nalezeny homologické geny *ilp1*, *ilp3* a *ilp4*. Geny *ilp5* byly nalezeny v celotělovém transkriptomu. Tento objev vyvrátil hypotézu, že inzulínový receptor směřuje k lumenу střeva, aby vázal exogenní insulín hostitelského původu. Namísto toho se začalo předpokládat umístění receptoru na rozhraní epitelu střeva a hemocoelu, kde se na něj váže endogenní ILP (Kozelková et al., 2021).

Při pokusu, kdy do potemníka hnědého (*Tribolium castaneum*) bylo injikováno dsRNA *ilp3* nebo *ilp1*, bylo zaznamenáno snížení exprese genu Vitellogeninu2 (Vg2). Zároveň se při krmení zvyšovala hladina mRNA *ilp3* a *vg2*. Tato zjištění naznačují, že krmení indukuje expresi genu *ilp3*, jenž následně spouští expresi genů *vg* (Sheng et al., 2011). Avšak u klíštěte *I. ricinus* nebyl tento pokus prozatím replikován.

Výzkum ILPs u klíštěte *I. scapularis* pomocí qRT-PCR poskytl nové poznatky o jejich expresi a funkci. U samic byl zaznamenán pokles syntézy ILPs po sání na hostiteli. Důvod ale zatím není zcela jasný. Předpokládá se, že by tento pokles mohl být spojen s regulací ukládání energie. U samců byla exprese *ilp*'s nízká kromě *ilp1*. Pravděpodobně jelikož samci se v dospělosti nekrmí a jejich hlavním úkolem je přežít dostatečně dlouho, aby se setkali se samicí a spáрили se s ní a vzhledem k tomu, že ILPs figurují hlavně v ukládání přijatých živin, endokrinní kaskádě vedoucí k syntéze bílkovin žlutku a růstu, může být nepřítomnost ILPs u samců vysvětlena tím, že u samců v dospělosti tyto procesy neprobíhají (Sharma et al., 2019).

Dále byly u klíštěte *I. scapularis* podrobněji zkoumány exprese jednotlivých *ilp*'s. *ilp1* a *ilp5* byly nejvíce exprimovány v syngangliu, což naznačuje neurotransmitterovou nebo neurohemální roli. Zatímco *ilp3* a *ilp4* byly exprimovány hlavně ve slinných žlázách. Jelikož ILPs mohou působit jako růstové faktory předpokládá se, že exprese těchto *ilp*'s ve slinných žlázách způsobuje stimulaci jejich růstu, díky čemuž se zvyšuje produkce slin při krmení na hostiteli (Sharma et al., 2019).

Výše zmíněné snížení exprese *ilp*'s po sání mělo ale výjimku u *ilp4* a *ilp5*, u nichž se naopak zvýšila exprese ve střevě 7 dní po sání na hostiteli. To může poukazovat na roli ILP4 a ILP5 v trávení krve (Sharma et al., 2019). Podobný jev byl pozorován u komára tropického (*Aedes aegypti*), kde se v syngangliu vylučoval ILP3 stimulující střevo k produkci trypsinu, trávicího enzymu, po sání na hostiteli (Gulia-Nuss et al., 2011). V jiné studii na komáru tropickém byla demonstrována role ILP3 v dozrávání vajíček (Brown et al., 2008).

Dle výzkumů můžeme říci, že ILPs hrají důležitou roli v metabolismu a rozmnožování klíšťat, nicméně stále je známo jen málo o sekreci ILPs u klíštěte *Ixodes ricinus* a jejich přímé interakci s cílovými tkáněmi. Bližší porozumění produkce a funkce ILPs by při aplikaci nových molekulárních metod, jako je RNA interference, mohlo poskytnout nové molekulární cíle proti klíšťatům, čímž by se mohlo snížit riziko přenosu patogenních mikroorganismů na člověka.

2.3. RNA interference

Jedná se o posttranskripční mechanismus umlčování molekul mRNA (messenger RNA) u eukaryotických buněk, čímž se reguluje translace cílených genů. Proces RNA interference (RNAi) je spouštěn dvěma typy molekul, miRNA (microRNA) a siRNA (short interfering RNA). MicroRNA jsou nekódující molekuly dlouhé přibližně 21 až 28 nukleotidů vznikající transkripcí v buňce, kde slouží jako rychlý způsob regulace translace mRNA na proteiny. Zatímco siRNA je ve většině případů exogenního původu a vzniká rozštěpením dvouvláknové RNA – dsRNA (double strand RNA). To slouží jako obranný mechanismus proti dsRNA virům (Waterhouse et al., 2001). Mechanismus RNAi byl poprvé studován při výzkumu hád'átka obecného (*Caenorhabditis elegans*), u kterého došlo k utlumení exprese genu po injikaci komplementární dsRNA (Fire et al., 1998).

Proces RNAi je iniciován při detekci dsRNA pomocí enzymu Drosha, který stimuluje enzym Dicer. Tento protein štěpí dlouhé dvouvláknové RNA molekuly na kratší fragmenty o délce 19 až 23 nukleotidů, jenž se nazývají siRNA (Jaskiewicz & Filipowicz, 2008). Ty se vážou na protein Argonaut, jenž rozdělí dsRNA na jednořetězcové RNA (ssRNA) – pasažérské vlákno (passenger strand) a vodící vlákno (guide strand) (Mauro et al., 2023). Pasažérské vlákno je degradováno a zůstává vodící vlákno navázané na protein Argonaut, jenž se po navázání dalších proteinů nazývá komplex RISC (RNA-induced silencing complex). Vodící vlákno z siRNA začleněné do komplexu RISC se poté váže na komplementární mRNA pomocí párování bází. Po navázání protein Argonaut katalyzuje štěpení cílové mRNA, jenž je poté degradována. To vede k umlčení exprese genů a zastaví se translace cílového proteinu (Pratt & MacRae, 2009).

2.3.1. Využití RNA interference

Umlčování genů pomocí injikace dsRNA se stalo důležitým nástrojem při výzkumu genových funkcí eukaryotických buněk. V současnosti se vyvíjí způsoby, jak využít RNA interferenci při léčbě různých onemocnění, jelikož je tato metoda vysoce sekvenčně specifická a snižuje se riziko vazby na necílové geny (Xu et al., 2019). RNAi se také stala účinnou technikou pro zkoumání funkcí genů u klíšťat, kde je použití jiných metod pro manipulaci genů omezené. Při použití RNAi pro umlčení genu intracelulární serinové kinázy (AKT), jenž je součástí signální dráhy TOR, u klíštěte *Ixodes ricinus* bylo objeveno, že u samic s úspěšným utlumením genu se narušilo krmení na hostitelích. To se nejvíce projeвило

neschopností dokončit sání na hostiteli a dále se samicím nepodařilo snést vajíčka (Kozelková et al., 2021).

Případy prezentující přesvědčivou změnu fenotypu po aplikaci RNAi u klíšťat jsou stále spíše vzácné. Avšak použití RNAi pro umlčení ILPs by mohlo přinést nové poznatky o jejich roli v klíšťecím metabolismu a tvorbě ve specifických tkáních. Bližší porozumění funkce ILPs by mohlo poskytnout nové molekulární cíle proti klíšťatům a snižování rizika přenosu patogenních mikroorganismů na člověka (de la Fuente et al., 2016).

3. Cíle práce

1. Odhalení expresních tkáňových a časových profilů pro *ilp1,3,4* a *5* pomocí RT-PCR
2. syntéza dsRNA pro *ilp1,3,4* a *5*
3. ověření efektivity RNA interference pomocí RT-PCR
4. Vyhodnocení úspěšnosti sání, kladení a líhnutí larev po RNAi

4. Materiály a metody

4.1. Získání tkání z klíšťat

Klíšťata *I. ricinus* byla nasbírána metodou vlajkování v lesích u Českých Budějovic. Dospělé samice byly nechány sát na morčatech. Na záda morčat byly připevněny pryžové kroužky. Kroužky byly seshora uzavřeny síťovinou. Klíšťata byla postupně odebírána v předem stanovených časových intervalech (nenasátá, sání po dobu 1, 3 a 5 dnů, plně nasátá a 3, 6 a 11 dnů po odpadnutí) a pod binokulárním stereomikroskopem Stemi DV4 (Zeiss) byla provedena pitva tkání. Tkáně byly promyty v roztoku PBS v diethyl pyrokarbonát vodě (DEPC voda) a přeneseny do pufru s beta-merkptoethanolem z kitu NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel). Následně proběhla homogenizace tkání pomocí 29G inzulinové stříkačky. Veškeré pracovní nástroje byly při pitvě ošetřeny pomocí RNaseZAP (Sigma-Aldrich). Se všemi laboratorními zvířaty bylo nakládáno v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb., ve znění pozdějších předpisů a vyhlášky o ochraně pokusných zvířat č. 419/2012 Sb. a zákonem o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty č. 78/2004 Sb.

4.2. Izolace totální RNA a syntéza cDNA

Pomocí kitu NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) byla získána totální RNA z jednotlivých časových intervalů a tkání. RNA ze synganglií byla izolována pomocí činidla TRIzol™. Syntéza cDNA byla provedena z oligo-dT primerů pomocí kitu Transcriptor High Synthesis Kit (Roche) za použití 200 ng získané RNA na každý vzorek.

4.3. Analýza genové exprese v tkáních pomocí RT-PCR

Real-time polymerázová řetězová reakce (RT-PCR) byla provedena pro změření relativního množství mRNA a analýzu genové exprese *ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5* v různých časových intervalech a klíštěcích tkáních. Reakční směsi byly připraveny s použitím Master mix FastStart Universal Sybr Green Master (Roche). Reakce proběhly v přístroji LightCycler 480 (Roche) v 50 cyklech se specifickými primery (Tab. I). Pomocí programu LightCycler 480 Software release 1.5.0 SP4 (Roche) byly zaznamenány Ct hodnoty.

Získaná data byla vyhodnocena pomocí delta ct metody (Excel, GraphPad Prism6). Relativní hladina transkribovaných genů byla normalizována relativní hladinou referenčního genu, *elongačního faktoru (ef)*.

Tab. I: Sekvence specifických primerů použitých pro RT-PCR.

Gen	Forward primer	Reverse primer
Ilp1	5´CGG CTG TAT CCT CTG GTG TC-3´	5´CTC CAT GAT ACT GCA CGC CT-3´
Ilp3	5´GGC GTG GAG AAG AGG AAC AA-3´	5´GTC TGT AGC CCG TGT GCC-3´
Ilp4	5´GAT CTA GCC TGG ACG CCT TC-3´	5´TCG TTG TGT TCC CGG TTG AT-3´
Ilp5	5´TAT TGA CGA GTG CTG CGA CA-5´	5´GTT AGA AGC TTG ACG GCC GA -3´
ef	5´ACG AGG CTC TGA CGG AAG-3´	5´CAC GAC GCA ACT CCT TCA C-3´

4.4. Syntéza dsRNA

4.4.1. Amplifikace, přečištění a restrikce PCR produktu

Pro amplifikaci získané cDNA byla provedena PCR reakce, při které byla použita FastStart Taq DNA polymeráza, specifické primery (Tab. II) a získaný cDNA templát. PCR reakce proběhla v přístroji T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Reakce proběhly ve 30 cyklech.

Tab. II: Sekvence primerů použitých pro amplifikaci.

Gen	Forward primer	Reverse primer
Ilp1	5´atc ccg ggG GCA CTC AAC ACA GTC GT-3´	5´att cta gaT AGA ACT CTC CCT CGC AG-3´
Ilp3	5´ atc ccg ggC TAC TGC GGC AAC AAC CT-3´	5´ att cta gaC TTC TGG GTC GGA TCG TA-3´
Ilp4	5´ atc ccg ggG ATT CTG GTC TGG ATG CTC T-3´	5´ att cta gaC TGT AGA TCA CGA AAG GCT G-3´
Ilp5	5´ atc ccg ggA AGA GAT CTT CAG GAA TCG C-3´	5´ att cta gaG CCT GTT CAG CTT GTA GAT-3´
M13	5´GTA AAA CGA CGG CCA G-3´	5´CAG GAA ACA GCT ATG AC-3´

Získané produkty PCR byly separovány pomocí metody elektroforetické separace za použití 1% agarózového TAE gelu (1% agarózy v 1x Tris-acetát-EDTA pufri) a nanášecího pufri (ethidium bromid 0,3 µg/ml). Separace probíhala 30 minut při napětí 100 V. Gel se separovanými produkty byl přenesen do UV transiluminátoru. Zde byly produkty zviditelněny pomocí UV záření.

Separované PCR produkty byly vyříznuty z gelu a přečištěny pomocí kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Machrey-Nagel). Proběhla eluce ve 20 μ l PCR H₂O. Následně byla provedena restrikce přečištěného PCR produktu a plazmidového vektoru pll10 pomocí restrikčních enzymů (ApaI, XbaI) (Tab. III).

Tab. III: Restrikční reakce o celkovém objemu 30 μ l pro plazmid a PCR produkt.

	Restrikce PCR produktu	Restrikce plazmidu pll10
Buffer TANGO 10x	3 μ l	3 μ l
Restrikční enzymy (ApaI, XbaI)	1 μ l, 1 μ l	1 μ l, 1 μ l
PCR produkt	20 μ l	3 μ l
Sterilní H ₂ O	6 μ l	23 μ l

Restrikční reakce byly inkubovány 2 hodiny ve 37 °C. Směsi byly přečištěny pomocí kitu Nucleospin Gel and PCR Clean-up (Machrey-Nagel).

4.4.2. Ligace PCR produktu do plazmidového vektoru

Byla provedena ligace štípnutého PCR produktu do štípnutého plazmidového vektoru pll10 (Tab. IV).

Tab. IV: Ligační reakce o celkovém objemu 5 μ l.

Buffer 2x (pGEM T-easy kit)	2,5 μ l
Štípnutý plazmid pll10	1 μ l
Štípnutý PCR produkt	1 μ l
T4 ligáza (pGEM T-easy kit)	0,5 μ l

Ligační směs byla inkubována 1 hodinu při laboratorní teplotě. Následně ponechána přes noc v 4 °C.

4.4.3. Transformace plazmidového vektoru do *E.coli*

K 5 μ l plazmidu pll10 spojeným s PCR produktem bylo přidáno 50 μ l One Shot TOP10 Chemically Competent buněk *Escherichia coli* (Lifetechnologies). Směs byla inkubována na ledu po dobu 30 minut. Transformace plazmidu do kompetentních buněk proběhla pomocí metody Heat Shock (teplotní šok), kdy byla směs umístěna do 42 °C na dobu 1 minuty. K

buňkám bylo přidáno 300 μ l RT S.O.C. média. Buňky byly ponechány růst v inkubační třepačce 1 hodinu ve 37 °C. Buňky byly následně rozetřeny na agarové plotně s LB médiem obsahujícím 1 % agar a ampicilin 50 μ g/ml a ponechány růst ve 37 °C přes noc. Proběhla antibiotická selekce ampicilinem pro buňky obsahující plazmid pII10.

Pomocí PCR vybraných kolonií byla ověřena úspěšnost transformace plazmidu pII10. Od každé skupiny bylo vybráno 10 kolonií. Kolonie byly resuspendovány v 20 μ l PCR H₂O. Na každý PCR vzorek byl použit 1 μ l jako templát a specifické primery (Tab II). Byla provedena 10 μ l PCR reakce o 30 cyklech. PCR produkty byly následně použity na elektroforetickou separaci pro ověření úspěšnosti transformace (Obr. 6 a 7).

Byly vybrány pozitivní kolonie a ponechány růst ve 100 ml LB média s ampicilinem 50 μ g/ml přes noc v inkubační třepačce ve 37 °C. Po kultivaci buněk byla provedena izolace plazmidů pomocí kitu Nucleo Bond Xtra Midi (Macherey-Nagel). Naklonované plazmidy byly poslány na sekvenaci pro ověření plazmidové identity.

4.4.4. Restrikce a přečištění plazmidu

Pomocí spektrofotometru byla zjištěna koncentrace plazmidu u každého vzorku. Vzorky byly naředěny tak, aby výsledná koncentrace činila 30 μ g/ml. Následně byla provedena restrikční reakce (Tab. V).

Tab. V: Restrikční reakce přečištěného plazmidu o celkovém objemu 50 μ l.

30 μ g plazmidu	X μ l
Buffer TANGO	5 μ l
Enzym	6 μ l
Sterilní H ₂ O	do 50 μ l

Výsledný linearizovaný plazmid byl ponechán 2 hodin ve 37 °C.

Pro přečištění bylo k linearizovaným plazmidům přidáno 25 μ l proteinázy K a 3,75 μ l 10 % SDS. Směsi byly inkubovány po dobu 30 minut v 50 °C. Poté bylo přidáno 80 μ l fenol-chloroformu a vzorky byly řádně promíchány pomocí vortexu a centrifugace po dobu 5

minut na maximální otáčky. Odebrala se vodná fáze, k ní bylo přidáno 80 μ l chloroformu a vzorky byly znovu promíchány pomocí vortexu a centrifugace po dobu 5 minut na maximální otáčky. Znovu se odebrala vodná fáze, ke které bylo přidáno 56 μ l isopropanolu. Vzorky byly inkubovány 15 minut v -20 $^{\circ}$ C, poté stočeny pomocí centrifugy ($13\ 000 \times g$ při 4 $^{\circ}$ C). Pomocí centrifugace byl získán pelet, který byl promyt pomocí 80 μ l 80 % ethanolu a centrifugován 8 minut při maximálních otáčkách. Pelet byl po vysušení rozpuštěn v 20 μ l DEPC H_2O .

4.4.5. Syntéza a přečištění ssRNA

Přečištěný linearizovaný plazmid sloužil jako templát pro syntézu jednovláknové RNA (ssRNA) (Tab. VI) pomocí sady MEGascript T7 High Yield Transcription kit (Ambion). Byla provedena dvojitá reakce pro všechny vzorky.

Tab. VI: Reakční směs pro syntézu ssRNA o celkovém objemu 40 μ l.

dNTPs	16 μ l
Buffer (37 $^{\circ}$ C)	4 μ l
Lineární plazmid	X μ l (2 μ g, max = 16 μ l)
Enzymový mix	4 μ l
Sterilní H_2O	do 40 μ l

Reakční směs byla inkubována přes noc ve 37 $^{\circ}$ C.

Následně proběhlo přečištění získané ssRNA. Postup byl následující:

K ssRNA byl přidán 2 μ l DNázy a směs byla inkubována 15 minut ve 37 $^{\circ}$ C. Poté bylo přidáno 230 μ l H_2O a 30 μ l acetátu amonného a směs byla promíchána. Následně se přidalo 300 μ l fenol-chloroformu a směs se řádně promíchala ve vortexu. Následovala centrifugace (5 minut na maximální otáčky). Po centrifugaci byla odebrána vodná fáze. K ní bylo přidáno 300 μ l chloroformu. Opět se vše řádně promíchalo ve vortexu a následovala centrifugace (5 minut na maximální otáčky). Znovu byla odebrána vodná fáze, ke které se přidalo 220 μ l isopropanolu. Po vortexu a centrifugaci (5 minut na maximální otáčky) byla směs inkubována 15 minut v -20 $^{\circ}$ C a poté umístěna do centrifugy na 30 minut ($13\ 000 \times g$ při 4 $^{\circ}$ C).

°C). Pomocí centrifugace byl získán pelet, který byl po vysušení rozpuštěn ve 30 μ l DEPC vodě. Byla změřena koncentrace pomocí spektrofotometru a vzorky byly naředěny tak, aby výsledná koncentrace činila 3 mg/ml.

4.4.6. Syntéza dsRNA

Byla smíchána komplementární vlákna ssRNA v poměru 1:1 a inkubována přes noc v odměrném válci s vroucí vodou, kde došlo k hybridizaci komplementárních vláken ssRNA. Další den se provedla elektroforéza v 1 % agarovém TAE gelu s nanášecím pufrům Ambion RNA loading dye.

4.5. Mikroinjikace klíšťat dsRNA

Byla injikována dsRNA (0,5 μ l; 3 mg/ml) do haemocelu 20 samic klíšťat *I. ricinus*. Jako negativní kontrola byly použity samice injikované stejným množstvím gfp dsDNA (green fluorescent protein). Samice byly nechány sát na morčatech (20 samic na 1 morče) po 24 hodinách po injikaci společně se samci pro dosažení plného nasátí samic (toho je dosaženo pouze u oplozených samic).

Po 6 dnech sání bylo odebráno 5 samic od každé skupiny pro ověření utlumení exprese RNA. Ověření bylo provedeno následujícím způsobem: Byla provedena extrakce RNA ze střev, ovárií a synganglionu. Dále byla samicím odebrána hemolymfa. Zbytek samic byl ponechán sát do plného nasátí a odpadnutí. Plně nasáté samice byly zváženy a uskladněny do vialek k přeživacímu experimentu. Sedmý den po odpadnutí byly odebrány 3 samice od každé skupiny pro extrakci RNA ze střev a tukového tělesa.

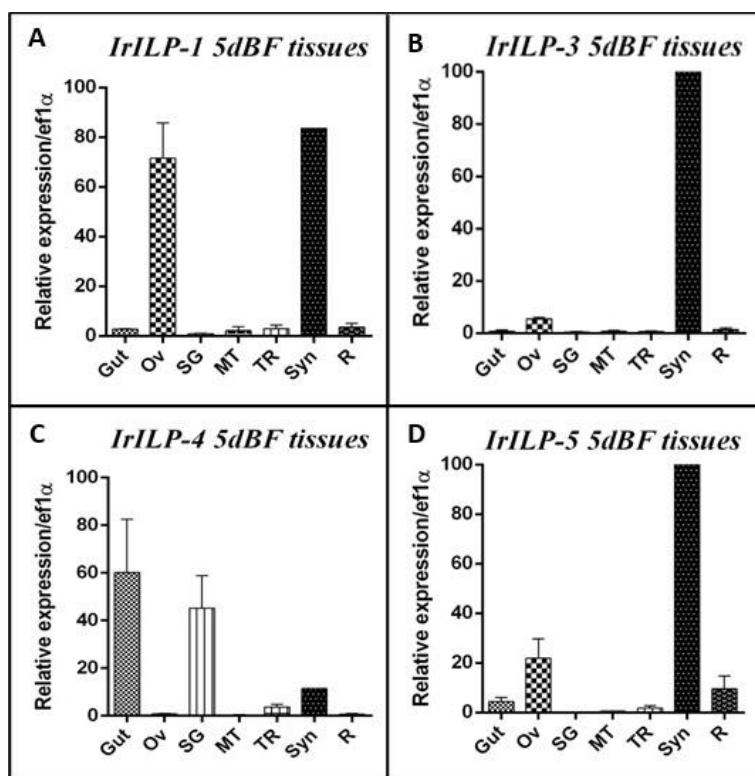
Byla zaznamenávána úspěšnost sání, hmotnost nasátých samic, úspěšnost kladení, hmotnost snůšek a úspěšnost líhnutí u každé skupiny.

5. Výsledky

5.1. Analýza genové exprese v tkáních pomocí RT-PCR

Real-time polymerázová řetězová reakce (RT-PCR, Obr. 1–4) byla provedena pro změření relativního množství transkriptů a analýzu genové exprese *ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5* v různých časových intervalech a klíčtějších tkáních.

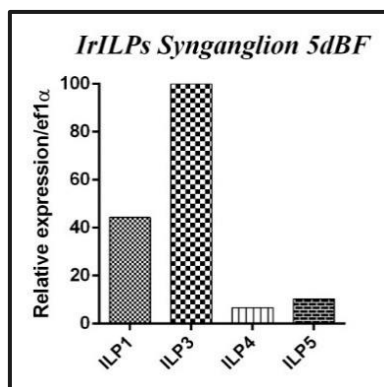
Nejdříve proběhla analýza exprese všech zkoumaných insulin-like peptidů ve střevě, ováriích, Malphigiho tubicích, trachejích a synganglionu (Obr. 1).



Obr. 1: RT-PCR analýza exprese insulin-like peptidů (*ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5*) v klíčtějších tkáních 5. den sání. **A: Expresse *ilp1* v klíčtějších tkáních 5 dnů sajících samic. **B:** Expresse *ilp3* v klíčtějších tkáních 5 dnů sajících samic. **C:** Expresse *ilp4* v klíčtějších tkáních 5 dnů sajících samic. **D:** Expresse *ilp5* v klíčtějších tkáních 5 dnů sajících samic. (Gut = střevo, Ov = ovária, SG = slinné žlázy, MT = Malphigiho trubice, TR = tracheje, Syn = synganglion, R = zbytek). Relativní hladina transkribovaných genů byla normalizována relativní hladinou referenčního genu, elongačního faktoru 1 α (ef1 α). V grafech je znázorněn průměr a směrodatná odchylka, n = 3.**

Největší exprese *ilp1* byla zaznamenána v synganglionu, poté v ováriích (Obr.1A). U *ilp3* a *ilp5* byla změřena vysoká hladina exprese pouze v synganglionu (obr. 1B, D). Vysoká hladina v synganglionu naznačuje, že hlavní místo tvorby *ilp* je hlavová část samice klíčtěstě *I. ricinus*. Expresse *ilp4* byla nejvyšší ve střevě, poté ve slinných žlázách (Obr. 1C). To naznačuje úlohu ILP4 v regulaci trávení potravy.

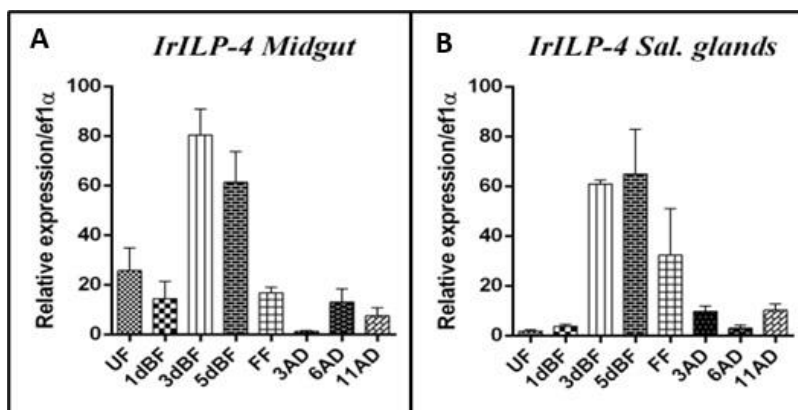
Proběhla také analýza exprese všech zkoumaných insulin-like peptidů pouze v synganglionu (Obr. 2).



Obr. 2: RT-PCR analýza exprese insulin-like peptidů (*ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5*) v synganglionu klíštěte 5. den sání. Relativní hladina transkribovaných genů byla normalizována relativní hladinou referenčního genu, elongačního faktoru 1 α (efl α). V grafech je znázorněn průměr.

Na obrázku 2 je vyobrazeno, že nejvyšší exprese byla zaznamenána u *ilp3*, nejnižší u *ilp4*.

Dále se analyzovala změna hladin exprese v průběhu sání a po plném nasátí ve střevě a slinných žlázách pro *ilp4* (Obr. 3).

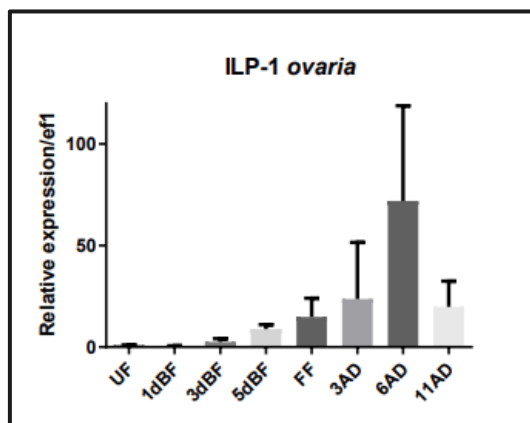


Obr. 3: RT-PCR analýza exprese insulin-like peptidu 4 (*ilp4*) v klíštěcích tkáních během sání a po odpadnutí. **A:** Exprese *ilp4* ve střevě u nenasátých samic, během sání a po odpadnutí samice klíštěte. **B:** Exprese *ilp4* ve slinných žlázách u nenasátých samic, během sání a po odpadnutí klíštěte. (UF = nenasátá klíšťata, 1dBF = 1 den sání, 3dBF = 3 dny sání, 5dBF = 5 dnů sání, FF = plně nasátá klíšťata, 3AD = 3 dny po odpadnutí, 6AD = 6 dnů po odpadnutí, 11AD = 11 dnů po odpadnutí). Relativní hladina transkribovaných genů byla normalizována relativní hladinou referenčního genu, elongačního faktoru 1 α (efl α). V grafech je znázorněn průměr a směrodatná odchylka, n = 3.

Obrázek 3 popisuje, že ve střevě a slinných žlázách byla nejvyšší exprese *ilp4* zaznamenána 3. a 5. den sání. Zatímco ve střevě byla nejvyšší exprese 3. den, ve slinných žlázách byla nejvyšší 5. den sání. Při plném nasátí exprese *ilp4* poklesla. Poté se opět mírně zvýšila 6. den (ve střevě, Obr. 3A) a 11. den (ve slinných žlázách,

Obr. 3B). Zvýšení syntézy peptidu ILP4 ve střevech a slinných žlázách znovu poukazuje na roli v sání a trávení krve.

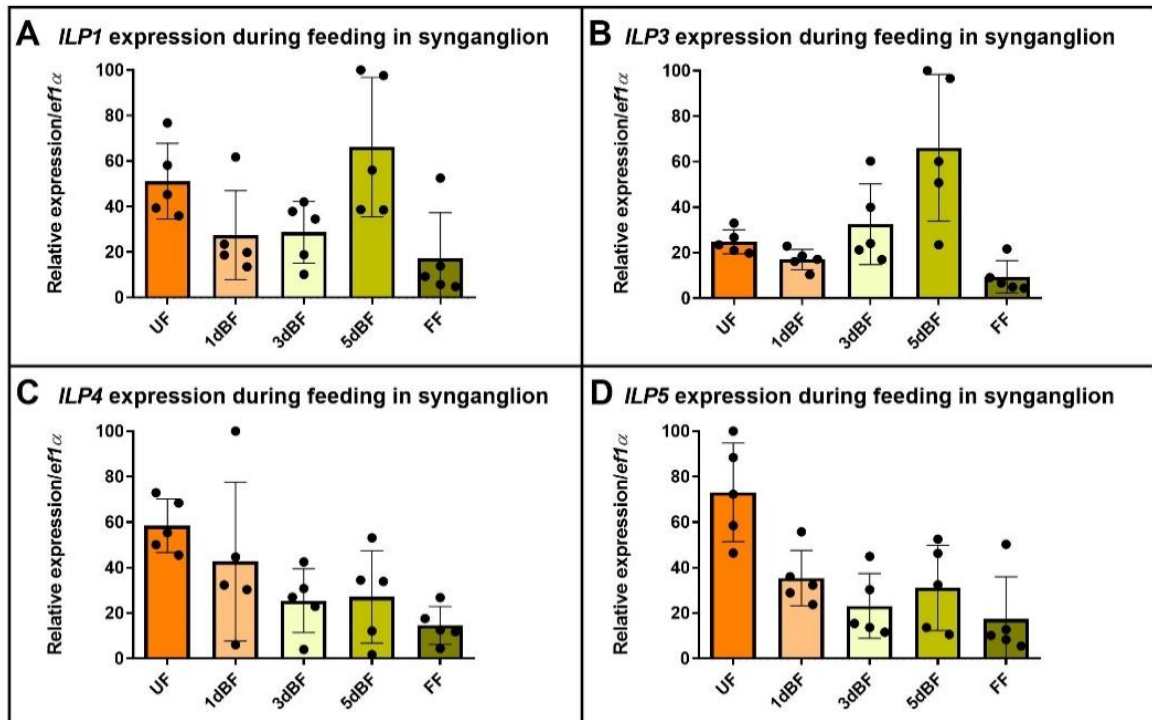
Proběhla analýza změn hladin exprese v průběhu sání i pro *ilp1* v ováriích (Obr. 4).



Obr. 4: RT-PCR analýza exprese insulin-like peptidu 1 (*ilp1*) v ováriích klíštěte během sání a po odpadnutí. (UF = nenasátá klíšťata, 1dBF = 1 den sání, 3dBF = 3 dny sání, 5dBF = 5 dnů sání, FF = plně nasátá klíšťata, 3AD = 3 dny po odpadnutí, 6AD = 6 dnů po odpadnutí, 11AD = 11 dnů po odpadnutí. Relativní hladina transkribovaných genů byla normalizována relativní hladinou referenčního genu, elongačního faktoru 1 α (*ef1 α*). V grafech je znázorněn průměr a směrodatná odchylka, n = 3.

Na obrázku 4 lze vidět, že se v ováriích výška exprese *ilp1* přímo úměrně zvyšovala se sáním a odpadnutím, až 11. dne došlo k poklesu.

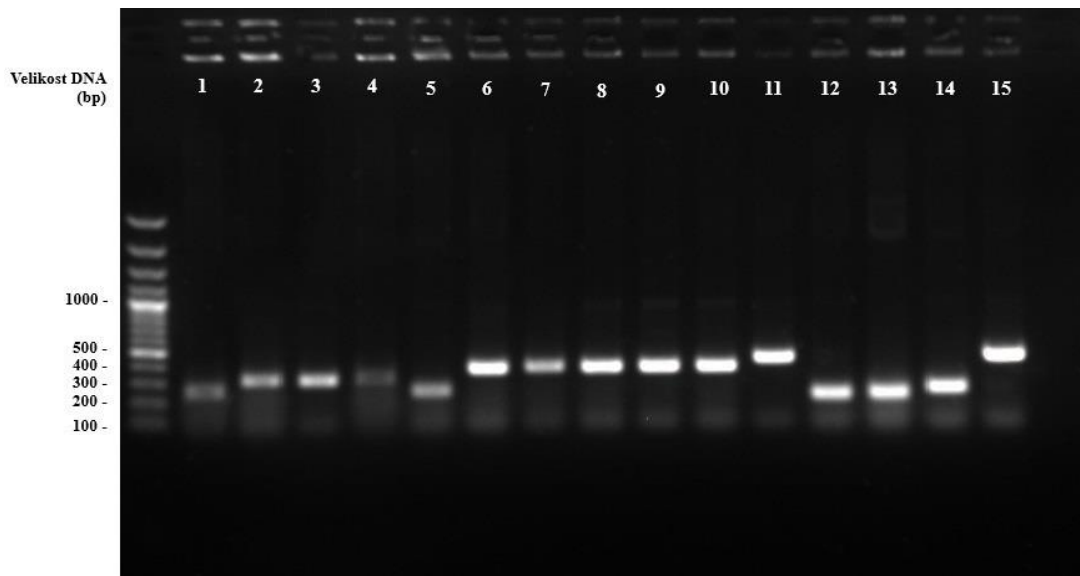
Dále byla provedena RT-PCR pro genovou expresi *ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5* v průběhu sání v synganglionu (Obr. 5). Byl zjištěn jasný pokles hladiny insulin-like peptidů v synganglionu klíštěte *I. ricinus* po začátku sání. Lze si všimnout zvýšení produkce peptidů *ilp1* a *ilp3* 5. den sání. Důvodem by mohla být role v signální dráze zajišťující dozrávání vajíček. Peptidům *ilp4* a *ilp5* postupně klesá produkce v průběhu celého sání, ale jejich hladina u nenakrmených samic je vyšší než u *ilp1* a *ilp3*. U všech insulin-like peptidů byla změřena nejnižší exprese v plně nasátých samicích klíšťat.



Obr. 5: RT-PCR analýza exprese insulin-like peptidů (*ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5*) v synganglionu klíštěte během sání. **A:** Exprese *ilp1* v synganglionu u nenasátých samic, během sání a po odpadnutí samice klíštěte. **B:** Exprese *ilp3* v synganglionu u nenasátých samic, během sání a po odpadnutí samice klíštěte. **C:** Exprese *ilp4* v synganglionu u nenasátých samic, během sání a po odpadnutí samice klíštěte. **D:** Exprese *ilp5* v synganglionu u nenasátých samic, během sání a po odpadnutí samice klíštěte. (UF = nenasátá klíšťata, 1dBF = 1 den sání, 3dBF = 3 dny sání, 5dBF = 5 dnů sání, FF = plně nasátá klíšťata). Relativní hladina transkribovaných genů byla normalizována relativní hladinou referenčního genu, elongačního faktoru 1 α (ef1 α). V grafech je znázorněn průměr a směrodatná odchylka, n = 3.

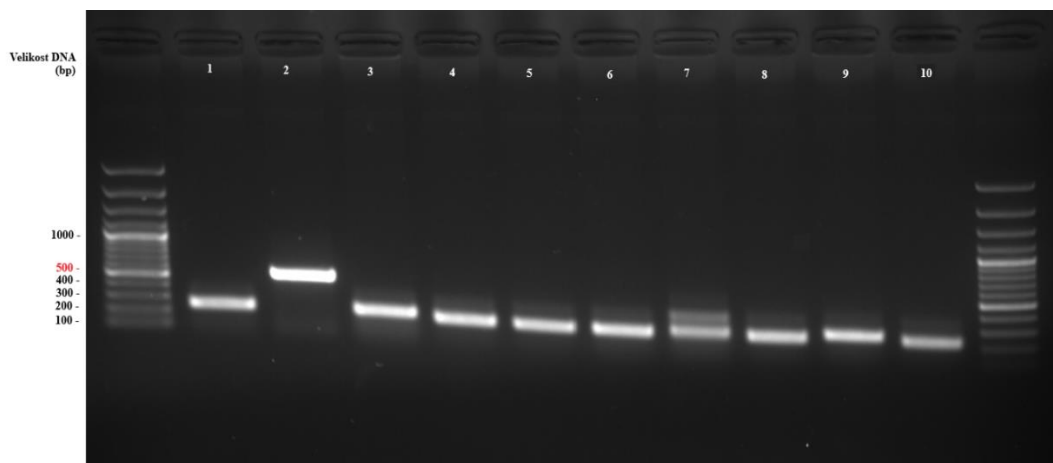
5.2. Transformace plazmidového vektoru do *E.coli*

Pomocí ligace byly do plazmidového vektoru zaneseny PCR produkty. Zaligovaný plazmid byl vpraven do buněk One Shot TOP10 Chemically Competent *Escherichia coli* (Lifetechnologies), kde byl namnožen. Pomocí PCR a následné elektroforetické separace vybraných kolonií byla ověřena úspěšnost transformace úseků insulin-like peptidů do plazmidu pll10 (Obr. 6 a 7). Očekávaná délka ampikonu byla 300 bp pro *ilp1*, 400 bp pro *ilp3* a 500 bp pro *ilp4* a *ilp5*.



Obr. 6: Kontrola pozitivních kolonií s *ilp1*, 3 a 5 vektorem pomocí elektroforetické separace. 1–5: zaklonovaný úsek *ilp1* do plazmidu pll10. **6–10:** zaklonovaný úsek *ilp3* do plazmidu pll10. **11–15:** zaklonovaný úsek *ilp5* do plazmidu pll10. Ladder – 100 bp marker. Elektroforetická separace proběhla v 1 % agarózovém TAE gelu. Amplikony byly vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

Snímek elektroforetické separace na obrázku 6 ukazuje úspěšné zaklonování úseků insulin-like peptidů do plazmidu pll10 u č. 2-4 pro *ilp1*, kde byla očekávaná délka amplikonu 300 bp. Pro *ilp3* proběhlo úspěšné zaklonování u všech vzorků (6-10), kde byla očekávaná délka amplikonu 400 bp. U *ilp5* byla očekávaná délka amplikonu 500 bp a zaklonování bylo úspěšné u vzorků č. 11 a 15.



Obr. 7: Kontrola pozitivních kolonií s *ilp4* vektorem pomocí elektroforetické separace. 1–10: zaklonovaný úsek *ilp4* do plazmidu pll10. Ladder – 100 bp marker. Elektroforetická separace proběhla v 1 % agarózovém TAE gelu. Amplikony byly vizualizovány pomocí ethidium bromidu.

Obrázek 7 ukazuje úspěšné zaklonování úseku *ilp4* do plazmidu pll10 u vzorku č. 2, kde byla očekávaná délka amplikonu 500 bp.

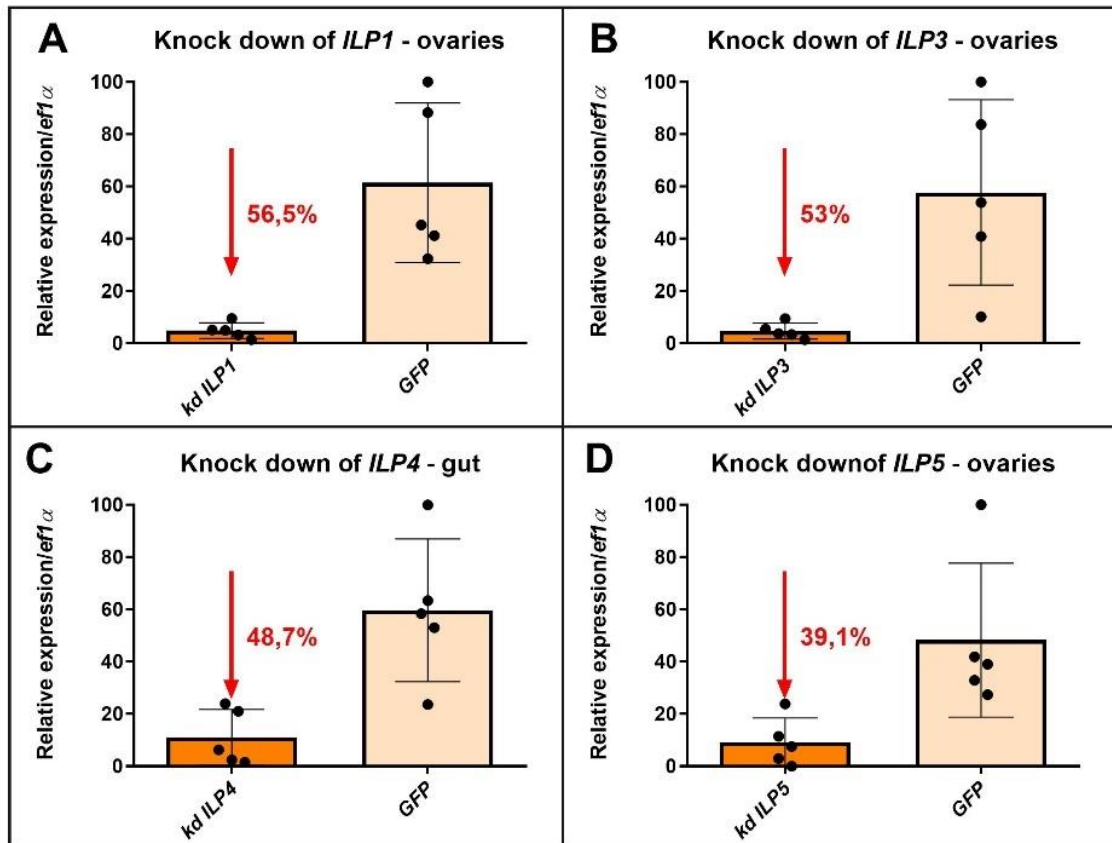
5.3. Ověření fenotypu RNAi *ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5*

Pro pozorování vlivu RNAi insulin-like peptidů (*ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5*) u klíšťat bylo injikováno 20 samic klíšťat *I. ricinus* do haemocelu 0,5 μ l (3 mg/ml) dsRNA. Jako negativní kontrola byly použity samice injikované stejným množstvím dsRNA *gfp* (green fluorescent protein). Byl zaznamenán počet samic ponechaných na přeživací pokus po odpadnutí (Tab. VII). Dále byla provedena izolace totální RNA ze střeva, ovárií a synganglionu u 5 náhodně vybraných samic *I. ricinus* 6. den sání. Izolace totální RNA ze střeva a tukového tělesa byla provedena 7. den po odpadnutí u 3 náhodně vybraných samic *I. ricinus*.

Tab. VII: Průběh experimentu po injikaci 0,5 μ l (3 mg/ml) dsRNA *ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5*. Byla provedena izolace RNA vybraných tkání u 5 náhodně vybraných samic 6. den sání a u 3 náhodně vybraných samic 7. den po ukončení sání.

Skupina	Počet injikovaných samic	Izolace RNA pro ověření RNAi	Počet samic na přeživací pokus
<i>ilp1</i>	20	5/3	8
<i>ilp3</i>	20	5/3	7
<i>ilp4</i>	20	5/3	3
<i>ilp5</i>	20	5/3	11
<i>gfp</i>	20	5/3	8

Získaná RNA z tkání byla použita pro RT-PCR analýzu exprese vybraných genů ve vybraných tkáních



Obr. 8: RT-PCR analýza exprese insulin-like peptidů (*ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5*) ve vybraných klíštěcích tkáních samic *I. ricinus*. **A:** Expresa *ilp1* v klíštěcích ováriích 6. den sání. **B:** Expresa *ilp3* v klíštěcích ováriích 6. den sání. **C:** Expresa *ilp4* v klíštěcím střevu 6. den sání. **D:** Expresa *ilp5* v klíštěcích ováriích 6. den sání. Všechny skupiny klíšťat byly injikovány do haemocelu odpovídající dsRNA 0,5 μ l (3 mg/ μ l). Pro negativní kontrolu byla 1 skupina samic klíšťat injikována dsRNA *gfp* (green fluorescent protein). (kd ILP = knock down, utlumení insulin-like peptidu, GFP = green fluorescent protein). Relativní hladina transkribovaných genů byla normalizována relativní hladinou referenčního genu, elongačního faktoru *1 α* (*efl α*). V grafech je znázorněn průměr a směrodatná odchylka, n = 3.

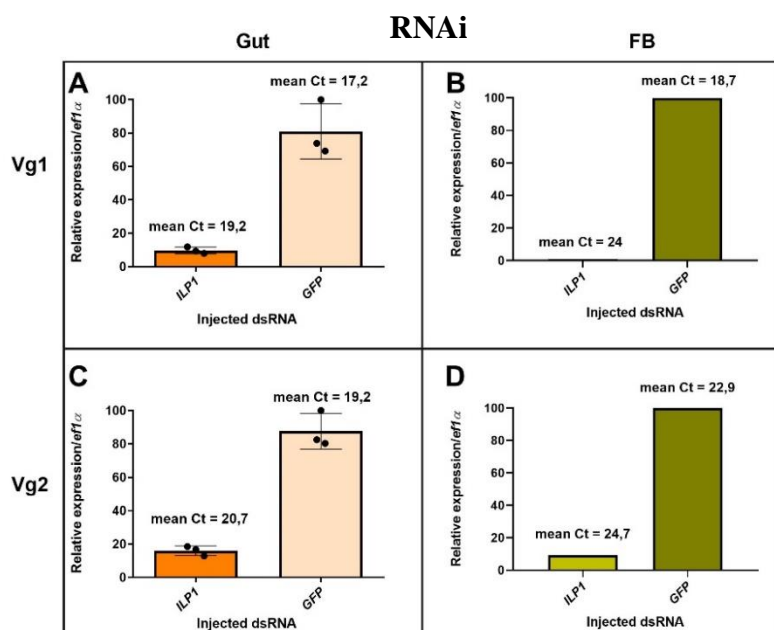
Obrázek 8 vyobrazuje výsledky RT-PCR analýzy hladiny mRNA *ilp1*, *ilp3* a *ilp5* v ováriích a synganglionu a *ilp4* ve střevě a synganglionu (Tab. VIII) 6. den sání. Výsledky ukazují úspěšné snížení hladiny exprese *ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5* ve všech sledovaných tkáních oproti kontrolní skupině injikované dsRNA *gfp* (Obr. 8, Tab. VIII), kromě *ilp4* v synganglionu, kde utlumení exprese nebylo úspěšné.

Tab. VIII: RT-PCR analýza exprese insulin-like peptidů (*ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5*) v klíštěcím synganglionu. RNA ze synganglionu byla izolována 6. den sání samic klíšťat *I. ricinus*. Všechny skupiny klíšťat byly injikovány do haemocelu odpovídající dsRNA 0,5 μ l (3 mg/ μ l). Pro negativní kontrolu byla 1 skupina samic klíšťat injikována dsRNA *gfp* (green fluorescent protein). (Ct = cycle of threshold, prahový cyklus vzorku, Ct Mean = průměr hodnot prahového cyklu, Ct EF = prahový cyklus elongačního faktoru, R = reporter, fluorescenční signál substrátu (Sybergreen), kd succes = úspěšnost knock downu, utlumení.

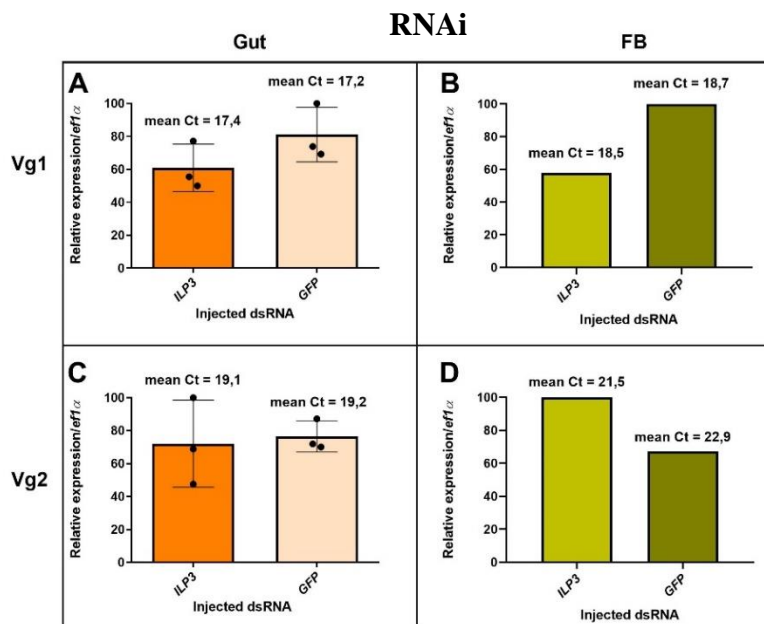
Gene	Ct	Ct Mean	Ct EF	Ct EF Mean	R	kd success																																																							
ILP1	29,098	28,955	20,260	20,196	0,0023084	97,1%																																																							
	28,813		20,132				GFP	24,150	24,129	20,396	20,476	0,0795154	24,108	20,557	ILP3	28,863	28,744	19,989	19,984	0,0023061	93,6%	28,626	19,978	GFP	25,193	25,269	20,396	20,476	0,0360676	25,346	20,557	ILP4	30,975	30,946	20,125	20,254	0,0006043	0%	30,918	20,383	GFP	31,803	31,968	20,396	20,476	0,0003473	32,133	20,557	ILP5	29,713	29,566	19,719	19,631	0,0010218	95,7%	29,419	19,543	GFP	25,858	25,873	20,396
GFP	24,150	24,129	20,396	20,476	0,0795154																																																								
	24,108		20,557				ILP3	28,863	28,744	19,989	19,984	0,0023061	93,6%	28,626	19,978	GFP	25,193	25,269	20,396	20,476		0,0360676	25,346	20,557	ILP4	30,975	30,946	20,125	20,254	0,0006043	0%	30,918	20,383	GFP	31,803	31,968	20,396		20,476	0,0003473	32,133	20,557	ILP5	29,713	29,566	19,719	19,631	0,0010218	95,7%	29,419	19,543	GFP	25,858	25,873		20,396	20,476	0,0237453	25,887	20,557	
ILP3	28,863	28,744	19,989	19,984	0,0023061	93,6%																																																							
	28,626		19,978				GFP	25,193	25,269	20,396	20,476	0,0360676		25,346	20,557	ILP4	30,975	30,946	20,125	20,254	0,0006043	0%	30,918	20,383	GFP	31,803	31,968	20,396	20,476	0,0003473		32,133	20,557	ILP5	29,713	29,566	19,719	19,631	0,0010218	95,7%	29,419	19,543	GFP	25,858	25,873	20,396	20,476	0,0237453		25,887	20,557										
GFP	25,193	25,269	20,396	20,476	0,0360676																																																								
	25,346		20,557				ILP4	30,975	30,946	20,125	20,254	0,0006043	0%	30,918	20,383	GFP	31,803	31,968	20,396	20,476	0,0003473		32,133	20,557	ILP5	29,713	29,566	19,719	19,631	0,0010218	95,7%	29,419	19,543	GFP	25,858	25,873	20,396	20,476	0,0237453		25,887	20,557																			
ILP4	30,975	30,946	20,125	20,254	0,0006043	0%																																																							
	30,918		20,383				GFP	31,803	31,968	20,396	20,476	0,0003473		32,133	20,557	ILP5	29,713	29,566	19,719	19,631	0,0010218	95,7%	29,419	19,543	GFP	25,858	25,873	20,396	20,476	0,0237453		25,887	20,557																												
GFP	31,803	31,968	20,396	20,476	0,0003473																																																								
	32,133		20,557				ILP5	29,713	29,566	19,719	19,631	0,0010218	95,7%	29,419	19,543	GFP	25,858	25,873	20,396	20,476	0,0237453		25,887	20,557																																					
ILP5	29,713	29,566	19,719	19,631	0,0010218	95,7%																																																							
	29,419		19,543				GFP	25,858	25,873	20,396	20,476	0,0237453		25,887	20,557																																														
GFP	25,858	25,873	20,396	20,476	0,0237453																																																								
	25,887		20,557																																																										

5.4. Analýza exprese *vg1* a *vg2* po RNAi *ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5*

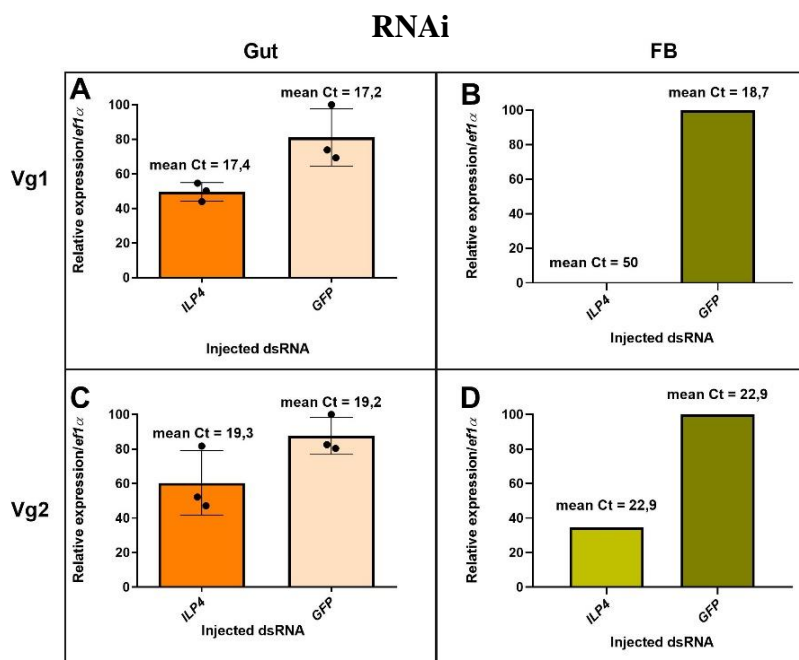
Byla izolována RNA ze střeva a tukového tělesa u samic klíštěte *I. ricinus* 7. den po odpadnutí. Pomocí RT-PCR se analyzovala hladina exprese mRNA vitellogeninu 1 (*vg1*) a vitellogeninu 2 (*vg2*) ve vybraných tkáních (Obr. 9, 10, 11 a 12). Pokus byl proveden pro ověření možného ovlivnění exprese *vg1* a *vg2* po RNAi *ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5*.



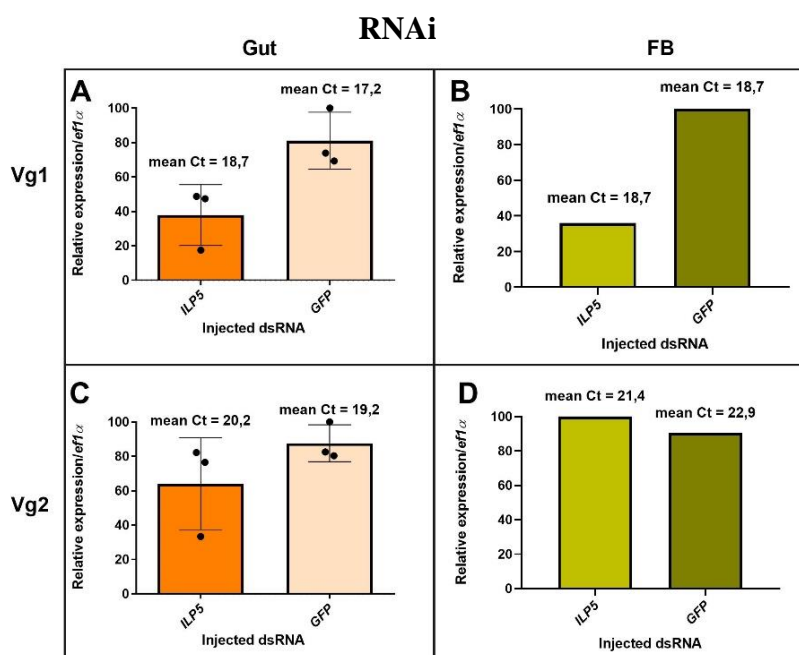
Obr. 9: RT-PCR analýza exprese vitellogeninu 1 (vg1) a vitellogeninu 2 (vg2) ve střevě a tukovém těle 7. den po odpadnutí u samice klíštěte *I. ricinus* po injikaci dsRNA *ilp1* 0,5 μ l (3 mg/ μ l). **A:** Exprese vg1 ve střevě. **B:** Exprese vg1 v tukovém těle. **C:** Exprese vg2 ve střevě. **D:** Exprese vg2 v tukovém těle. (Gut = střevo, FB = tukové tělo, ILP1 = insulin-like peptid 1, GFP = green fluorescent protein, mean Ct = průměr hodnot prahového cyklu). Relativní hladina transkribovaných genů byla normalizována relativní hladinou referenčního genu, elongačního faktoru 1 α (ef1 α). V grafech je znázorněn průměr, průměr Ct hodnot a směrodatná odchylka, n = 3.



Obr. 10: RT-PCR analýza exprese vitellogeninu 1 (vg1) a vitellogeninu 2 (vg2) ve střevě a tukovém těle 7. den po odpadnutí u samice klíštěte *I. ricinus* po injikaci dsRNA *ilp3* 0,5 μ l (3 mg/ μ l). **A:** Exprese vg1 ve střevě. **B:** Exprese vg1 v tukovém těle. **C:** Exprese vg2 ve střevě. **D:** Exprese vg2 v tukovém těle. (Gut = střevo, FB = tukové tělo, ILP3 = insulin-like peptid 3, GFP = green fluorescent protein, mean Ct = průměr hodnot prahového cyklu). Relativní hladina transkribovaných genů byla normalizována relativní hladinou referenčního genu, elongačního faktoru 1 α (ef1 α). V grafech je znázorněn průměr, průměr Ct hodnot a směrodatná odchylka, n = 3.



Obr. 11: RT-PCR analýza exprese vitellogeninu 1 (*vg1*) a vitellogeninu 2 (*vg2*) ve střevě a tukovém tělesu 7. den po odpadnutí u samice klíštěte *I. ricinus* po injikaci dsRNA *ilp4* 0,5 μ l (3 mg/ μ l). **A:** Exprese *vg1* ve střevě. **B:** Exprese *vg1* v tukovém tělesu. **C:** Exprese *vg2* ve střevě. **D:** Exprese *vg2* v tukovém tělesu. (Gut = střevo, FB = tukové těleso, ILP4 = insulin-like peptid 4, GFP = green fluorescent protein, mean Ct = průměr hodnot prahového cyklu). Relativní hladina transkribovaných genů byla normalizována relativní hladinou referenčního genu, elongačního faktoru *1 α* (*ef1 α*). V grafech je znázorněn průměr, průměr Ct hodnot a směrodatná odchylka, n = 3.



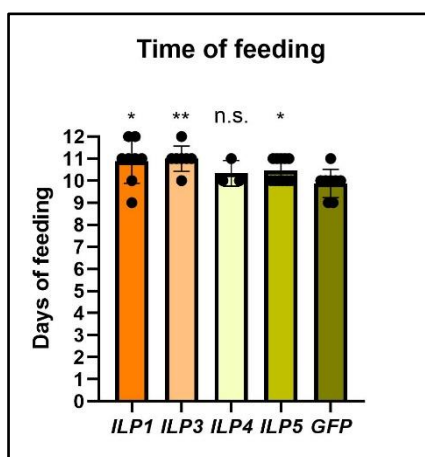
Obr. 12: RT-PCR analýza exprese vitellogeninu 1 (*vg1*) a vitellogeninu 2 (*vg2*) ve střevě a tukovém tělesu 7. den po odpadnutí u samice klíštěte *I. ricinus* po injikaci dsRNA *ilp5* 0,5 μ l (3 mg/ μ l). **A:** Exprese *vg1* ve střevě. **B:** Exprese *vg1* v tukovém tělesu. **C:** Exprese *vg2* ve střevě. **D:** Exprese *vg2* v tukovém tělesu. (Gut = střevo, FB = tukové těleso, ILP5 = insulin-like peptid 5, GFP = green fluorescent protein, mean Ct = průměr hodnot prahového cyklu). Relativní hladina transkribovaných genů byla normalizována relativní hladinou referenčního genu, elongačního faktoru *1 α* (*ef1 α*). V grafech je znázorněn průměr, průměr Ct hodnot a směrodatná odchylka, n = 3.

Z obrázků 9, 10, 11 a 12 lze pozorovat rozdíly exprese *vg1* a *vg2* ve střevě a tukovém tělesu po injikaci dsRNA *ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5*. Z obrázku 6 je patrné, že kd (knock down, ulumení) *ilp1* mělo největší vliv na hladinu exprese *vg1* a *vg2*. Kdežto u skupiny injikované dsRNA *ilp3* byl pozorován nejnižší pokles hladiny exprese *vg1* a *vg2*. Skupina injikovaná dsRNA *ilp4* měla vyšší pokles hladiny exprese *vg1* a *vg2* pouze v tukovém tělesu. Zároveň po injikaci dsRNA *ilp5* byl vyšší pokles hladiny exprese u *vg1*.

5.5. Vliv RNAi na fenotyp jedinců

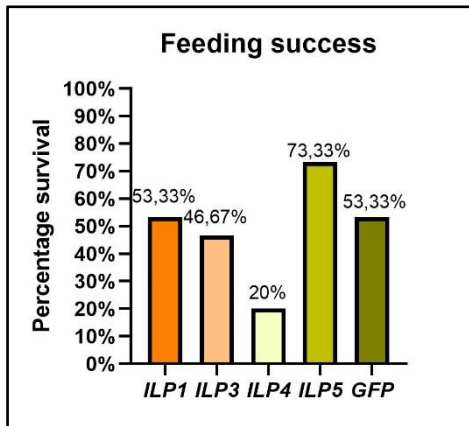
Po injikaci dsRNA do samic klíšťat *I. ricinus* byly samice nechány sát na morčatech. Byl pozorován vliv RNAi na dobu sání, úspěšnost sání, váhu plně nasátých samic, čas kladení, váhu snůšek, embryogenezi a úspěšnost líhnutí larev.

Byl pozorován signifikantní vliv RNAi na fenotyp sání, kdežto vliv na fenotyp reprodukce samic nebyl pozorován.



Obr. 13: Čas do plného nasátí samic klíšťat *I. ricinus* po injikaci dsRNA (měřeno ve dnech). *ilp* = insulin-like peptid, *gfp* = green fluorescent protein, n.s. = non significant, nesignifikantní, * = hodnota p je nižší než 0,05, ** = hodnota p je nižší než 0,01. V grafu je znázorněn průměr a směrodatná odchylka, n = 3.

Z obrázku 13 je patrné, že u samic injikovaných dsRNA *ilp1* (průměrně 11 – 12 dní), *ilp3* (průměrně 11 dní) a *ilp5* (průměrně 10 – 11 dní) došlo k prodloužení doby sání na rozdíl od kontrolní skupiny samic injikovaných *gfp* (průměrně 9 – 10 dní). U skupiny injikované dsRNA *ilp4* nebyl pozorován signifikantní rozdíl v porovnání s dsRNA *gfp*. To může být vysvětleno nízkým počtem samic na konci sání, jelikož tato skupina měla zaznamenanou nejnižší úspěšnost sání (nejvyšší úmrtnost během sání) (viz Obr. 14).

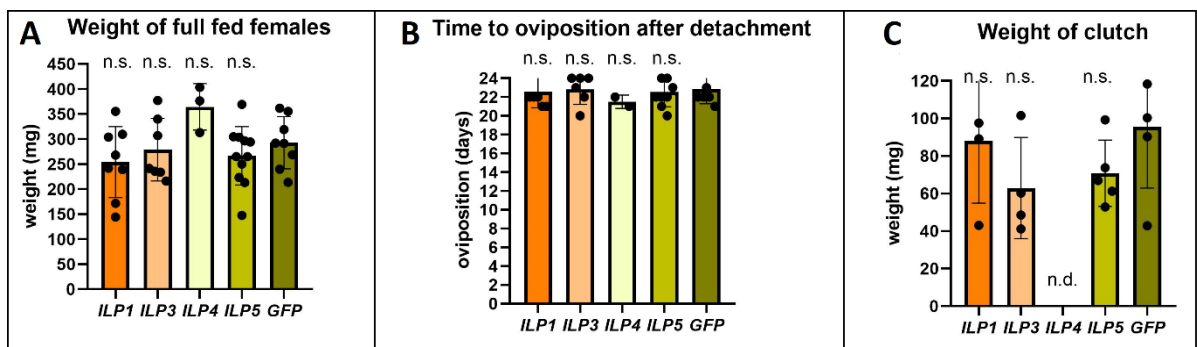


Obr. 14: Úspěšnost sání samic klíšťat *I. ricinus*. *ilp* = insulin-like peptid, *gfp* = green fluorescent protein. V grafu je znázorněna procentuální úspěšnost plného nasátí samic.

Na obrázku 14 je vyobrazena úspěšnost sání samic po injekci dsRNA *ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5* v porovnání se samicemi po injekci dsRNA *gfp*.

Na začátku pokusu bylo injikováno 20 samic od každé skupiny. Následně bylo z každé skupiny odebráno 5 samic na pitvu vybraných tkání. Bylo ponecháno 15 samic na úplné nasátí. Nejnižší úspěšnost sání byla pozorována u samic injikovaných dsRNA *ilp4*, kdy byla úspěšnost o 41,67 % nižší než u kontrolní skupiny injikované dsRNA *gfp* (úspěšně se plně nasály pouze 3 samice z 12, u skupiny *gfp* se plně nasálo 8 samic z 12). Kdežto u skupiny injikované dsRNA *ilp5* byla naopak úspěšnost sání o 25 % vyšší než u kontrolní skupiny injikované dsRNA *gfp* (úspěšně se plně nasálo 11 samic z 12).

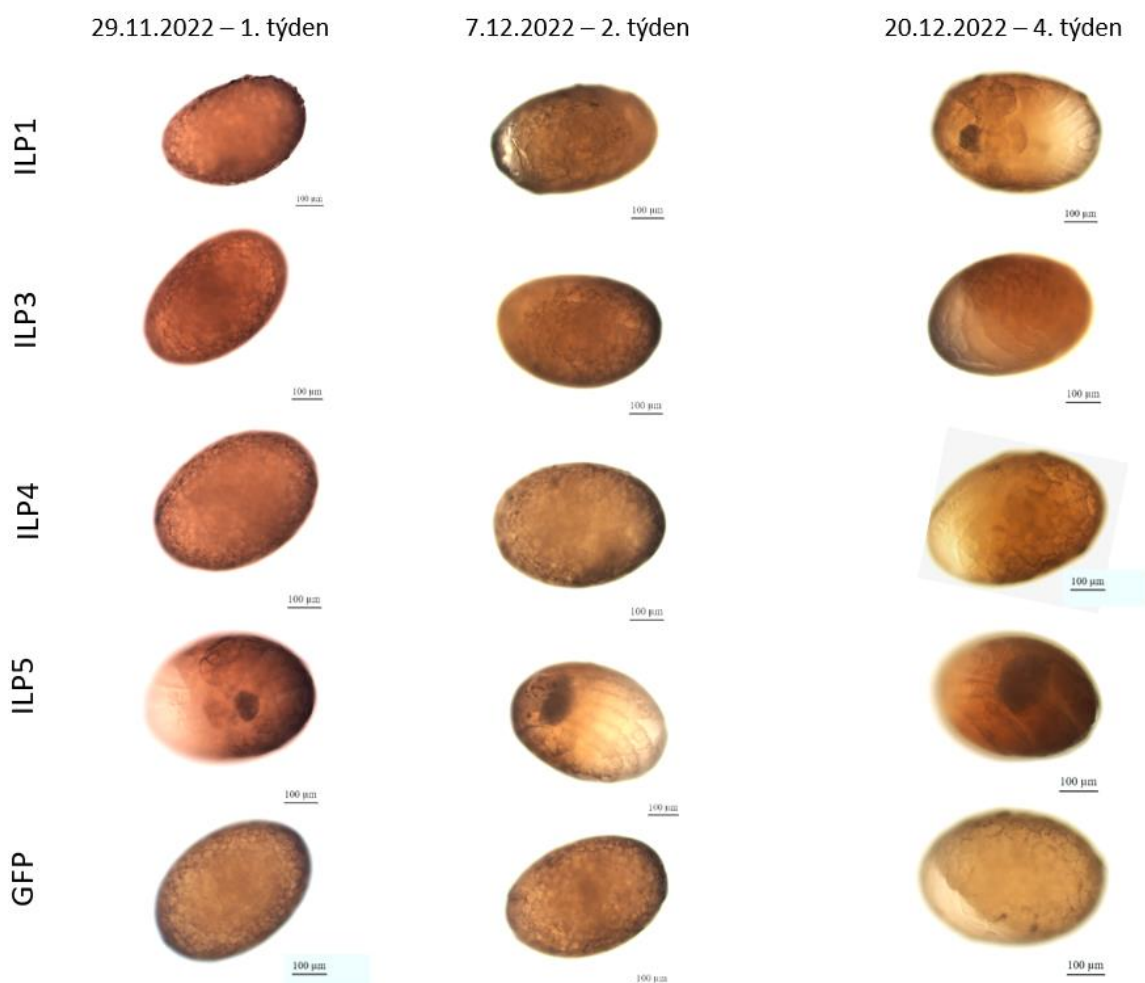
Po plném nasátí byly samice klíšťat zváženy a umístěny do vialek na přeživací pokus. Dále byla zaznamenána doba kladení a váha snůšek.



Obr. 15: Sledované fenotypy v přeživacím pokusu po injekci dsRNA. **A:** Váha plně nasátých samic, **B:** Doba kladení po plném nasátí samic, **C:** Váha snůšek. *Ilp* = insulin-like peptid, *gfp* = green fluorescent protein, n.s. = non significant, nesignifikantní, n.d. = no data, žádná data. V grafech je znázorněn průměr a směrodatná odchylka, n = 3.

Z obrázku 15 je patrné, že nebyl pozorován vliv RNAi na fenotyp váhy plně nasátých samic a reprodukce samic.

U snůšek byla následně pozorována embryogeneze pomocí mikroskopu u pozorovaných skupin (*ilp1*, *ilp3*, *ilp4* a *ilp5*) a kontrolní skupiny *gfp* (Obr. 14). Rychlost a správnost embryogeneze byla srovnána s kontrolní skupinou.



Obr. 16: Úspěšnost embryogeneze po injekci dsRNA. Pozorováno 1 týden, 2 týdny a 4 týdny po naklazení. U každého embrya je vyobrazeno měřítko 100 µm.

Na obrázku 16 si lze všimnout rychlého vývoje skupiny *ilp5*. Zajímavé je, že kontrolní skupina *gfp* se vyvíjela nejpomaleji. Tato data korespondují s výsledky pozorování úspěšnosti sání samic, kde nejlépe sála skupina *ilp5*, zatímco skupina *gfp* měla vyšší úmrtnost. Pomalejší vývoj měly také skupiny *ilp3* a *il4*, jenž sály hůře.

6. Diskuze

Klíšťata stejně jako ostatní bezobratlí mají poměrně složité signální dráhy figurující v jejich metabolismu a rozmnožování. Podobně jako insulin u obratlovců reaguje svou vyšší sekrecí po přijetí potravy a následném zvýšení glukózy v krvi, tak i insulin-like peptidy (ILPs) u bezobratlých mají zvýšenou hladinu po přijetí potravy. To bylo ukázáno ve výzkumu na octomilce obecné (*Drosophila melanogaster*), u které byly ILPs nejvíce zkoumány. Bylo zjištěno, že ILPs v *D. melanogaster* (DILPs) se uvolňují z mediálních neurosekrečních buněk (MNCs) po potravě bohaté na aminokyseliny. Přítomnost bílkovin je rozpoznána tukovým tělesem, který vyše signál do mozku (Géminard et al., 2009). ILPs jsou součástí insulinové signální dráhy (ISP), jenž na pozitivní nutriční stav reaguje různými anabolickými procesy (Nagasawa et al., 1984). Tyto peptidy mají tedy pleiotropní účinek a jsou zahrnuty v procesech jako jsou metabolismus, imunita, růst, rozmnožování, ale i chování, odolnost vůči stresu, diapauza a ovlivňují délku života (Antonova et al., 2012).

U klíšťat byly identifikovány 4 geny kódující ILPs (*ilp1, ilp3, ilp4 a ilp5*) (Sharma et al., 2019), které se vážou na insulinový receptor a tím spouští ISP. Přerušení této signální dráhy pomocí molekulárních metod by mohlo znamenat snížení schopnosti reprodukce klíšťat, která jsou významným přenašečem závažných onemocnění na člověka a v našem prostředí jsou přemnožená. Například v pokusu na *D. melanogaster* od Rulifson et al. (2002) se po genetické ablaci MNCs produkujících DILPs ze synganglionu výrazně zpomalil larvální růst a zmenšila se velikost dospělých jedinců (Rulifson et al., 2002).

Studie od Sharma et al. (2019) zkoumala exprese jednotlivých genů pro ILPs v různých tkáních u klíštěte *Ixodes scapularis*. Bylo zjištěno, že ILP1 a ILP5 jsou nejvíce exprimovány v synganglionu (Sharma et al., 2019). To by mohlo znamenat neurotransmiterovou roli těchto peptidů. Tuto hypotézu podporuje i studie od Kozelková et al. (2021), kde byly geny pro ILP5 nalezeny v celotělovém transkriptomu klíštěte *Ixodes ricinus* (Kozelková et al., 2021). Také výzkum od Miguel-Aliaga et al. (2008) na *D. melanogaster* předpokládal neurotransmiterovou roli jednoho ze zkoumaných insulin-like peptidů (DILP7), jelikož během embryonálního vývoje byl tento peptid distribuován neurony v břišních gangliích poté co nastavily svá axonální spojení do mozku, střeva a reprodukčního traktu (Miguel-Aliaga et al., 2008).

V mém experimentu provedeném na klíštěti *Ixodes ricinus* se potvrdil nejvyšší výskyt ILP1 a ILP5 v synganglionu, zároveň ILP3 měl nejvyšší výskyt v synganglionu ze všech (Obr. 1). Zajímavé je, že ve výzkumu od Gulia-Nuss et al. (2011) provedeném na komáru tropickém (*Aedes aegypti*) byla také zvýšená produkce ILP3 v synganglionu, jenž stimuloval střevo k produkci trávicího enzymu po sání na hostiteli (Gulia-Nuss et al., 2011). Při pokusu, kdy jsem analyzovala expresi genů pro insulin-like peptidy pouze v synganglionu, byla hladina ILP3 nejvyšší, hladina ILP1 poloviční a hladina ILP5 jen těsně vyšší než ILP4 (Obr. 2). Z toho vyplývá, že celkové množství ILP5 v klíštěti je nižší než u ILP1 a ILP3, současně ale bylo jeho množství v celotělovém transkriptomu nejvyšší (obr. 1), což by mohlo potvrzovat myšlenku neurotransmitterové úlohy. Množství genu *ilp1* bylo také velmi vysoké v ováriích (obr. 1). To naznačuje úlohu ILP1 v dozrávání vajíček.

Výzkumný tým Sharma et al. (2019) dále zaznamenal nejvyšší produkci ILP3 a ILP4 ve slinných žlázách klíštěte *Ixodes scapularis*. Předpokládá se úloha těchto peptidů ve zvýšení produkce slin při krmení na hostiteli, jelikož ILPs mohou působit jako růstové faktory a tím stimulovat růst slinných žláz (Sharma et al., 2019).

Můj výzkum potvrdil nejvyšší produkci ILP4 ve slinných žlázách a střevech (Obr. 1). Přítomnost ILP4 ve střevech by mohla naznačovat roli v trávení krve.

Dalším objektem studie od Sharma et al. (2019) na klíštěti *Ixodes scapularis* bylo sledování exprese ILPs v průběhu sání, kdy došlo k poklesu produkce ILPs po začátku sání na hostiteli. Důvodem by mohlo být spojení s regulací ukládání energie. Avšak u ILP4 a ILP5 se zvýšila produkce ve střevě 7. den sání. To poukazuje na úlohu při trávení krve (Sharma et al., 2019).

V pokusu replikující tento výzkum jsem došla k jiným výsledkům. Nejdříve se analyzovala pouze produkce ILP4 ve střevech a slinných žlázách. Zde opravdu došlo ke zvýšení produkce 3. a 5. den sání a mírnému zvýšení 11. den po odpadnutí, což potvrzuje jeho úlohu při trávení krve. Analýza produkce ILP5 ve střevech nebyla provedena. Ovšem při analýze produkce ILPs v synganglionu byla zvýšená produkce 5. den sání hlavně u ILP1 a ILP3. To ale vysvětluje skutečnost, že tyto dva geny jsou exprimovány hlavně v synganglionu, zatímco ILP4 primárně ve střevech a slinných žlázách. Hodí se znovu poukázat na další podobnost s komárem *Aedes aegypti*, u kterého po sání také došlo ke zvýšení produkce ILP3 v synganglionu (Gulia-Nuss et al., 2011). Již výše zmíněná stimulace střeva k produkci

trávicího enzymu pomocí ILP3 poukazuje na jeho roli v trávení krve. Ve studii od Brown et al. (2008) na komáru *Aedes aegypti* byla demonstrována i role ILP3 v dozrávání vajíček (Brown et al., 2008).

Snížením exprese insulin-like peptidů u bezobratlých se zabýval Sheng et al. (2011). Výzkumníci injikovali dsRNA *ilp1* a *ilp3* do potměníka hnědého (*Tribolium castaneum*). Výsledkem bylo snížení exprese genů pro ILP1 a ILP3. Zároveň se snížila i exprese genu pro Vitellogenin2 (Vg2), jenž zastupuje nezbytnou roli pro embryonální vývoj u klíšťat (Sheng et al., 2011).

Po injikaci dsRNA *ilp1*, *3*, *4* a *5* do klíštěte *Ixodes ricinus* jsem mohla pozorovat snížení exprese genů pro Vitellogenin 1 a 2 u některých skupin (obr. 9, 10, 11 a 12). U ILP1 došlo ke snížení exprese Vg1 i Vg2 ve střevě a tukovém tělese. Avšak po injikaci dsRNA ILP3 k významnému poklesu nedošlo. Vysvětlením by mohla být chyba při pokusu či odlišnost v signálních drahách klíšťat a brouků. Zároveň je zajímavé, že u skupiny ILP4 došlo k poklesu Vg1 a Vg2 pouze v tukovém tělese a u skupiny ILP5 k poklesu jen Vg1 ve střevě i tukovém tělese. Bylo by zajímavé provést nový pokus, ve kterém by se zkoumal pokles exprese ve všech tkáních, aby vzniknul komplexní obrázek o složité signální síti těchto peptidů.

V kontextu signální dráhy Vitellogeninů je vhodné zmínit transkripční faktory Fox (Forkhead box), které jsou zahrnuty v ISP a jejich funkce byla blíže popsána ve výzkumu Hansena et al. (2007). Vg obsahuje vazebné místo pro Fox faktory, jenž po navázání spouští expresi genu Vg. Po injikaci dsRNA Fox faktorů do komára *Aedes aegypti* došlo k významnému poklesu exprese Vg u čtyř ze šesti skupin, což znamená že Fox faktory jsou pravděpodobně nutné pro aktivaci exprese genu Vg (Hansen et al., 2007). Proto bych navrhovala bližší zkoumání exprese Fox faktorů, jejichž utlumení by také mohlo vézt ke snížení produkční schopnosti klíšťat.

Metoda RNA interference (RNAi) byla použita i u klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*) výzkumným týmem Kozelková et al. (2021). Cílem bylo umlčení genu pro intracelulární serinovou kinázu (AKT), jenž je součástí signální dráhy TOR. Samicím, u kterých došlo k úspěšnému snížení mRNA genu *akt*, se narušilo krmení na hostitelích. To se nejvíce

projevilo neschopností dokončit sání na hostiteli a dále se alespoň částečně nakrmeným samicím nepodařilo snést vajíčka (Kozelková et al., 2021).

Při injikaci dsRNA insulin-like peptidů do klíštěte *Ixodes ricinus* jsem pozorovala výrazné snížení schopnosti sání u skupiny ILP4, kde přežily pouze 3 samice z 20 (Tab. VII a Obr. 14). Zároveň u skupin ILP1 a ILP5 byla úspěšnost sání poloviční oproti kontrolní skupině. Úspěšné narušení sání u skupiny ILP4 podporuje tvrzení, že hraje úlohu při trávení krve a zvyšuje produkci slin při krmení. Dále jsem měřila čas do plného nasátí klíšťat, jenž byl u skupin ILP1, ILP3 a ILP5 prodloužen oproti kontrolní skupině. U skupiny ILP4 nebyl pozorován signifikantní rozdíl, to ale lze vysvětlit nízkým počtem na konci sání, což mohlo zkreslit výsledky. Po odpadnutí a naklazení vajíček se vážily snůšky jednotlivých samic. U skupiny ILP4 nebyla posuzována váha snůšky kvůli nedostatečně velkému vzorku. U ostatních skupin nebyla změna váhy snůšek po RNAi průkazná. V příštím pokusu bych zvýšila vzorek zkoumaných samic pro přesnější výsledky.

Kromě těchto fenotypů jsem sledovala také úspěšnost embryogeneze naklazených vajíček (obr. 16). Zde došlo k zajímavým výsledkům. Nejvíce zarážející je velmi rychlý vývoj skupiny ILP5. Tento výsledek zároveň koresponduje s vysokou úspěšností sání ILP5, dokonce vyšší než kontrolní skupiny. Je možné, že ILP5 nehraje důležitou roli při rozmnožování, ale spíše se účastní různých metabolických procesů a funguje jako neurotransmitter. To podporuje i skutečnost, že během sání bez injikace dsRNA se jeho produkce pouze snižovala, takže se šetřila energie snížením jeho produkce, jelikož při rozmnožování se jeho funkce neuplatňuje. Je zajímavá myšlenka, že snížení jeho produkce pomocí RNAi naopak pomohlo samicím k úspěšnějšímu rozmnožení, jelikož tělo nemuselo plýtvat zdroji na jeho produkci. Ale je důležité zmínit nejnižší úspěšnost snížení exprese po injikaci dsRNA právě u ILP5, což mohlo ovlivnit výsledky pokusu. Ve studii od Grönke et al. (2010) na *D. melanogaster* po utlumení již zmiňovaného DILP7 také nedošlo ke zhoršení reprodukční schopnosti samic (Grönke et al., 2010). Nicméně v jiné studii od Yang et al. (2008) po utlumení DILP7 došlo k narušení kladení vajíček (Yang et al., 2008). Je předpoklad, že důvodem rozdílnosti výsledků je neúplné utlumení DILP7 u mutantů (Antonova et al., 2012).

U nadějně skupiny ILP4 byla embryogeneze zpomalena stejně jako u skupiny ILP3, u něhož se předpokládá role v dozrání vajíček (Brown et al., 2008). Zvláštní je pomalý vývoj vajíček u kontrolní skupiny, jež měla při sání jen poloviční úspěšnost přežití. Tento výsledek nedokáží pořádně vysvětlit. Avšak celý pokus byl prováděn v zimě, a to mohlo mít negativní dopad na výsledky.

7. Závěr

Byla zjištěna kompletní sekvence čtyř insulin-like peptidů (ILP1, ILP3, ILP4 a ILP5) pomocí známého genomu klíštěte *I. ricinus* a blízce příbuzného klíštěte *I. scapularis*. Pomocí metody RT-PCR byla provedena analýza exprese těchto ILPs ve vybraných klíštěcích tkáních a časových intervalech během i po sání (Obr. 1, 2, 3, 4 a 5). U ILP1 byla zaznamenána nejvyšší produkce v synganglionu a ováriích (Obr. 1), přičemž v obou tkáních se jeho produkce 5. den sání zvyšovala (Obr. 4 a 5). Zároveň po injekci dsRNA ILP1 do klíštěte se snížila produkce Vitellogeninu1 (Vg1) a Vitellogeninu2 (Vg2) (Obr. 9), jenž je prekurzorem vaječného žloutku, což naznačuje jeho úlohu v dozrávání vajíček. Produkce ILP3 byla nejvyšší v synganglionu (Obr. 1), kde se jeho hladina 5. den sání také zvyšovala (Obr. 5). Nejvyšší exprese genu *ilp4* byla změřena ve střevech a slinných žlázách (Obr. 1), ve kterých se 5. den sání exprese zvyšovala. Předpokládala se jeho úloha v produkci slin a trávení krve. Úloha ILP5 se zdá být jakožto neurotransmitter, jelikož byla zjištěna vysoká hladina v synganglionu a celotělovém transkriptomu a po sání na hostiteli se jeho produkce jen snižovala. S využitím metody RNA interference byla potlačena exprese těchto genů v ováriích a ve střevě (Obr. 6). V synganglionu nebyla úspěšně potlačena exprese genu *ilp4* (Tab. VIII). Přesto po injekci dsRNA ILP4 se výrazně snížila přeživací schopnost samic během sání (Tab. VII a Obr. 14), čímž se jeví jako nezbytný pro dokončení sání samic na hostiteli a zároveň se také zpomalila embryogeneze ve snůškách přeživších samic (Obr. 16).

8. Seznam použité literatury

- Adachi, T., Takiya, S., Suzuki, Y., Iwami, M., Kawakami, A., Takahashi, S. Y., Ishizaki, H., Nagasawa, H., & Suzuki, A. (1989). cDNA structure and expression of bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(13), 7681–7685. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)83288-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)83288-4)
- Ahlers, L. R. H., Trammell, C. E., Carrell, G. F., Chow, C. Y., Luckhart, S., & Goodman Correspondence, A. G. (2019). Insulin Potentiates JAK/STAT Signaling to Broadly Inhibit Flavivirus Replication in Insect Vectors. *CellReports*, *29*, 1946-1960.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.029>
- Antonova, Y., Arik, A. J., Moore, W., Riehle, M. A., & Brown, M. R. (2012). Insulin-Like Peptides. In *Insect Endocrinology* (pp. 63–92). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384749-2.10002-0>
- Armstrong, P. B. (2006). Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host–pathogen interaction. *Immunobiology*, *211*(4), 263–281. <https://doi.org/10.1016/J.IMBIO.2006.01.002>
- Badisco, L., Van Wielendaele, P., & Vanden Broeck, J. (2013). Eat to reproduce: a key role for the insulin signaling pathway in adult insects. *Frontiers in Physiology*, *4*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00202>
- Bartůněk, P. (2006). *Lymeská borelióza* (4th ed.). Grada Publishing.
- Brown, M. R., Clark, K. D., Gulia, M., Zhao, Z., Garczynski, S. F., Crim, J. W., Suderman, R. J., & Strand, M. R. (2008). An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(15), 5716–5721. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800478105>
- Claeys, I., Simonet, G., Poels, J., Van Loy, T., Vercammen, L., De Loof, A., & Vanden Broeck, J. (2002). Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway. *Peptides*, *23*(4), 807–816. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00666-0](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00666-0)
- Collier, E., Watkinson, A., Cleland, C. F., & Roth, J. (1987). Partial purification and characterization of an insulin-like material from spinach and *Lemna gibba* G3. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(13), 6238–6247. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45561-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45561-5)

- Colombani, J., Raisin, S., Pantalacci, S., Radimerski, T., Montagne, J., & Léopold, P. (2003). A Nutrient Sensor Mechanism Controls *Drosophila* Growth. *Cell*, *114*(6), 739–749. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00713-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00713-X)
- de la Fuente, J., Kopáček, P., Lew-Tabor, A., & Maritz-Olivier, C. (2016). Strategies for new and improved vaccines against ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunology*, *38*(12), 754–769. <https://doi.org/10.1111/pim.12339>
- De Meyts, P., & Whittaker, J. (2002). Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design. *Nature Reviews Drug Discovery*, *1*(10), 769–783. <https://doi.org/10.1038/nrd917>
- Duret, L., Guex, N., Peitsch, M. C., & Bairoch, A. (1998). New Insulin-Like Proteins with Atypical Disulfide Bond Pattern Characterized in *Caenorhabditis elegans* by Comparative Sequence Analysis and Homology Modeling. *Genome Research*, *8*(4), 348–353. <https://doi.org/10.1101/gr.8.4.348>
- Duve, H., & Thorpe, A. (1981). Gastrin/cholecystokinin (CCK)-like immunoreactive neurones in the brain of the blowfly, *Calliphora erythrocephala* (Diptera). *General and Comparative Endocrinology*, *43*(3), 381–391. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(81\)90298-7](https://doi.org/10.1016/0016-6480(81)90298-7)
- Fire, A., Xu, S., 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*(6669), 806–811. <https://doi.org/10.1038/35888>
- Floyd, P. D., Li, L., Rubakhin, S. S., Sweedler, J. V., Horn, C. C., Kupfermann, I., Alexeeva, V. Y., Ellis, T. A., Dembrow, N. C., Weiss, K. R., & Vilim, F. S. (1999). Insulin Prohormone Processing, Distribution, and Relation to Metabolism in *Aplysia californica*. *The Journal of Neuroscience*, *19*(18), 7732–7741. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-18-07732.1999>
- Fridell, Y.-W. C., Hoh, M., Kréneisz, O., Hosier, S., Chang, C., Scantling, D., Mulkey, D. K., & Helfand, S. L. (2009). Increased uncoupling protein (UCP) activity in *Drosophila* insulin-producing neurons attenuates insulin signaling and extends lifespan. *Aging*, *1*(8), 699–713. <https://doi.org/10.18632/aging.100067>
- Fritsch, H. A. R., & Sprang, R. (1977). On the ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells in the gut of the ascidian, *Ciona intestinalis* L. and the Bivalve, *Mytilus*

- edulis L. *Cell and Tissue Research*, 177(3), 407–413.
<https://doi.org/10.1007/BF00220314/METRICS>
- Géminard, C., Rulifson, E. J., & Léopold, P. (2009). Remote Control of Insulin Secretion by Fat Cells in *Drosophila*. *Cell Metabolism*, 10(3), 199–207.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.08.002>
- Grönke, S., Clarke, D.-F., Broughton, S., Andrews, T. D., & Partridge, L. (2010). Molecular Evolution and Functional Characterization of *Drosophila* Insulin-Like Peptides. *PLoS Genetics*, 6(2), e1000857. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000857>
- Gulia-Nuss, M., Robertson, A. E., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2011). Insulin-Like Peptides and the Target of Rapamycin Pathway Coordinately Regulate Blood Digestion and Egg Maturation in the Mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS ONE*, 6(5), e20401.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020401>
- Hansen, I. A., Sieglaff, D. H., Munro, J. B., Shiao, S.-H., Cruz, J., Lee, I. W., Heraty, J. M., & Raikhel, A. S. (2007). Forkhead transcription factors regulate mosquito reproduction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(9), 985–997.
<https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.05.008>
- Jaskiewicz, L., & Filipowicz, W. (2008). *Role of Dicer in Posttranscriptional RNA Silencing* (pp. 77–97). https://doi.org/10.1007/978-3-540-75157-1_4
- Kim, D. H., & Rossi, J. J. (2008). RNAi mechanisms and applications. *BioTechniques*, 44(5), 613–616. <https://doi.org/10.2144/000112792>
- Kozelková, T., Doležel, D., Grunclová, L., Kučera, M., Perner, J., & Kopáček, P. (2021). Functional characterization of the insulin signaling pathway in the hard tick *Ixodes ricinus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 12(4), 101694.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101694>
- Kremer, L. P. M., Korb, J., & Bornberg-Bauer, E. (2018). Reconstructed evolution of insulin receptors in insects reveals duplications in early insects and cockroaches. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 330(5), 305–311. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22809>
- LAGUEUX, M., LWOFF, L., MEISTER, M., GOLTZENÉ, F., & HOFFMANN, J. A. (1990). cDNAs from neurosecretory cells of brains of *Locusta migratoria* (Insecta,

- Orthoptera) encoding a novel member of the superfamily of insulins. *European Journal of Biochemistry*, 187(1), 249–254. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15302.x>
- LeRoith, D., Lesniak, M. A., & Roth, J. (1981). Insulin in Insects and Annelids. *Diabetes*, 30(1), 70–76. <https://doi.org/10.2337/diab.30.1.70>
- Mauro, M., Berretta, M., Palermo, G., Cavalieri, V., & La Rocca, G. (2023). The Multiplicity of Argonaute Complexes in Mammalian Cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 384(1), 1–9. <https://doi.org/10.1124/jpet.122.001158>
- Miguel-Aliaga, I., Thor, S., & Gould, A. P. (2008). Postmitotic Specification of Drosophila Insulinergic Neurons from Pioneer Neurons. *PLoS Biology*, 6(3), e58. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060058>
- Mizoguchi, A., & Okamoto, N. (2013). Insulin-like and IGF-like peptides in the silkworm *Bombyx mori*: discovery, structure, secretion, and function. *Frontiers in Physiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00217>
- Morgan, D. O., Edman, J. C., Standring, D. N., Fried, V. A., Smith, M. C., Roth, R. A., & Rutter, W. J. (1987). Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* 1987 329:6137, 329(6137), 301–307. <https://doi.org/10.1038/329301a0>
- Nagasawa, H., Kataoka, H., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, A., Ishizaki, H., Mizoguchi, A., Fujiwara, Y., & Suzuki, A. (1984). Amino-Terminal Amino Acid Sequence of the Silkworm Prothoracicotropic Hormone: Homology with Insulin. *Science*, 226(4680), 1344–1345. <https://doi.org/10.1126/science.226.4680.1344>
- Nagata, K., Hatanaka, H., Kohda, D., Kataoka, H., Nagasawa, H., Isogai, A., Ishizaki, H., Suzuki, A., & Inagaki, F. (1995). Three-dimensional Solution Structure of Bombyxin-II an Insulin-like Peptide of the Silkworm *Bombyx mori*: Structural Comparison with Insulin and Relaxin. *Journal of Molecular Biology*, 253(5), 749–758. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0588>
- Nasonkin, I. O., Alikasifoglu, A., Barrette, T., Cheng, M. M., Thomas, P. M., & Nikitin, A. G. (2002). Cloning, characterization, and embryonic expression analysis of the *Drosophila melanogaster* gene encoding insulin/relaxin-like peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(2), 312–318. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00653-8](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00653-8)

- Perner, J., Sobotka, R., Sima, R., Konvickova, J., Sojka, D., Oliveira, P. L. de, Hajdusek, O., & Kopacek, P. (2016). Acquisition of exogenous haem is essential for tick reproduction. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.12318>
- Pratt, A. J., & MacRae, I. J. (2009). The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 17897–17901. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900012200>
- Rajan, A., & Perrimon, N. (2012). Drosophila Cytokine Unpaired 2 Regulates Physiological Homeostasis by Remotely Controlling Insulin Secretion. *Cell*, 151(1), 123–137. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.019>
- Reuben Kaufman, W. (2007). Gluttony and sex in female ixodid ticks: how do they compare to other blood-sucking arthropods? *Journal of Insect Physiology*, 53(3), 264–273. <https://doi.org/10.1016/J.JINSPHYS.2006.10.004>
- Riehle, M. A., Fan, Y., Cao, C., & Brown, M. R. (2006). Molecular characterization of insulin-like peptides in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*: Expression, cellular localization, and phylogeny. *Peptides*, 27(11), 2547–2560. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.07.016>
- Rondeau, S., Giovenazzo, P., & Fournier, V. (2018). Risk assessment and predation potential of *Stratiolaelaps scimitus* (Acari: Laelapidae) to control *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bees. *PLOS ONE*, 13(12), e0208812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208812>
- Rulifson, E. J., Kim, S. K., & Nusse, R. (2002). Ablation of Insulin-Producing Neurons in Flies: Growth and Diabetic Phenotypes. *Science*, 296(5570), 1118–1120. <https://doi.org/10.1126/science.1070058>
- Sharma, A., Pooraiiouby, R., Guzman, B., Vu, P., Gulia-Nuss, M., & Nuss, A. B. (2019). Dynamics of Insulin Signaling in the Black-Legged Tick, *Ixodes scapularis*. *Frontiers in Endocrinology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00292>
- Shaul, Y. D., & Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1773(8), 1213–1226. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.005>

- Sheng, Z., Xu, J., Bai, H., Zhu, F., & Palli, S. R. (2011). Juvenile Hormone Regulates Vitellogenin Gene Expression through Insulin-like Peptide Signaling Pathway in the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 41924–41936. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.269845>
- Smit, A. B., Van Kesteren, R. E., Li, K. W., Van Minnen, J., Spijker, S., Van Heerikhuizen, H., & Geraerts, W. P. M. (1998). Towards Understanding the Role of Insulin in the Brain: Lessons from Insulin-related Signaling Systems in the Invertebrate Brain. *Progress in Neurobiology*, 54(1), 35–54. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00063-4](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00063-4)
- Smit, A. B., Vreugdenhil, E., Ebberink, R. H. M., Geraerts, W. P. M., Klootwijk, J., & Joosse, J. (1988). Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide. *Nature*, 331(6156), 535–538. <https://doi.org/10.1038/331535a0>
- Sojka, D. (2016). „Krvemlýnek“ ve střevě klíštěte. *Živa*, 64(102).
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.04.002>
- Sonenshine, D., & Roe, R. (2013). *Biology of ticks volume 2*. <https://books.google.com/books?hl=cs&lr=&id=gck4AAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=TcqGawcY69&sig=aJwfGPW8tDdYxWOjU2esefyFQE8>
- Ullrich, A., Bell, J. R., Chen, E. Y., Herrera, R., Petruzzelli, L. M., Dull, T. J., Gray, A., Coussens, L., Liao, Y. C., Tsubokawa, M., Mason, A., Seeburg, P. H., Grunfeld, C., Rosen, O. M., & Ramachandran, J. (1985). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature* 1985 313:6005, 313(6005), 756–761. <https://doi.org/10.1038/313756a0>
- Ullrich, A., Gray, A., Tam, A. W., Yang-Feng, T., Tsubokawa, M., Collins, C., Henzel, W., Le Bon, T., Kathuria, S., & Chen, E. (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO Journal*, 5(10), 2503–2512. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04528.x>
- Van Noorden, S., & Falkmer, S. (1980). Gut-islet endocrinology-some evolutionary aspects. *Investigative & Cell Pathology*, 3(1), 21–35.

- Volf, P., & Horák, P. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. Triton.
- Wang, S., Luo, X., Zhang, S., Yin, C., Dou, Y., & Cai, X. (2014). Identification of putative insulin-like peptides and components of insulin signaling pathways in parasitic platyhelminths by the use of genome-wide screening. *The FEBS Journal*, *281*(3), 877–893. <https://doi.org/10.1111/febs.12655>
- Waterhouse, P. M., Wang, M.-B., & Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, *411*(6839), 834–842. <https://doi.org/10.1038/35081168>
- Wilson, S., & Falkmer, S. (1965). STARFISH INSULIN. *Canadian Journal of Biochemistry*, *43*(10), 1615–1624. <https://doi.org/10.1139/o65-178>
- Wu, Q., & Brown, M. R. (2006). SIGNALING AND FUNCTION OF INSULIN-LIKE PEPTIDES IN INSECTS. *Annual Review of Entomology*, *51*(1), 1–24. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151011>
- Xu, W., Jiang, X., & Huang, L. (2019). RNA Interference Technology. In *Comprehensive Biotechnology* (pp. 560–575). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00282-2>
- Yang, C., Belawat, P., Hafen, E., Jan, L. Y., & Jan, Y.-N. (2008). *Drosophila* Egg-Laying Site Selection as a System to Study Simple Decision-Making Processes. *Science*, *319*(5870), 1679–1683. <https://doi.org/10.1126/science.1151842>
- Zhu, X. X., & Oliver, J. H. (1991). Immunocytochemical localization of an insulin-like substance in the synganglion of the tick *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae). *Experimental & Applied Acarology*, *13*(2), 153–159. <https://doi.org/10.1007/BF01193666>