

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Nitisinon, herbicid a léčivo a jeho vliv na parazitické
a neparazitické hlístice**

Diplomová práce

**Bc. Zuzana Němcová
Zájmové chovy zvířat**

doc. RNDr. Jan Dvořák, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Nitisinon, herbicid a léčivo a jeho vliv na parazitické a neparazitické hlístice" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24. 4. 2026

Poděkování

Ráda bych vyjádřila upřímné poděkování vedoucímu mé práce doc. RNDr. Janu Dvořákovi, Ph.D. za příležitost pracovat na tomto zajímavém tématu, za jeho cenné metodické vedení a inspirativní podněty. Mé poděkování patří také Mgr. Vojtěchu Vackovi, Ph.D. za jeho nepostradatelnou pomoc v laboratoři, trpělivost při praktické části výzkumu a odborné konzultace.

Nitisinon, herbicid a léčivo a jeho vliv na parazitické a neparazitické hlístice

Souhrn

Diplomová práce se zabývala studiem účinku nitisinonu (NTBC), inhibitoru enzymu 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy (HPPD), na vybrané zástupce hlístic s využitím fenotypových experimentů, molekulárně-biochemických metod a bioinformatické analýzy.

Fenotypové testy provedené na modelovém organismu *Caenorhabditis elegans* (n = 13) prokázaly silný synergický účinek NTBC v přítomnosti exogenního L-tyrosinu. Zatímco samostatné podání látek mělo na vitalitu hlístic minimální vliv, jejich kombinace vedla k signifikantnímu poklesu reprodukce o 44,2 % a vysoké akutní mortalitě dosahující 61,5 %. Tento jev potvrzuje, že k fatálnímu poškození organismu nevede samotná blokáda enzymu, ale až následná akumulace toxických meziproduktů. Předběžné testy u fytoparazita *Meloidogyne hapla* odhalily extrémní fytotoxicitu NTBC vůči hostitelským rostlinám již ve fázi klíčivosti, což znemožnilo vytvoření hostitelského systému pro fenotypové studie a poukázalo na limity praktického využití látky v ochraně rostlin.

Molekulárně-biochemická část práce byla zaměřena na rekombinantní expresi HPPD u druhů *M. hapla* a *C. elegans* v systému *E. coli*. Kolorimetrická esej nevykázala u parazitárních proteinů očekávanou pigmentaci. Ve spolupráci s Biologickým centrem AV ČR bylo pomocí metody Western Blot zjištěno, že sledované enzymy tvoří v bakteriálním hostiteli neaktivní inkluzní tělíska, což vysvětluje absenci jejich enzymatické aktivity. Zjištění poukazují na zásadní limity standardních expresních protokolů pro parazitární proteiny a definují nutnost budoucí optimalizace experimentálních podmínek při studiu rekombinantních proteinů u parazitických hlístic.

Bioinformatická analýza 11 sekvencí potvrdila vysokou konzervaci aktivního místa enzymu napříč studovanými řády hlístic i zooparazitem *Haemonchus contortus*. Identifikována byla absolutní shoda v klíčové katalytické triádě (His183, His266 a Glu349) a vysoká míra konzervace u reziduí určujících vazebnou afinitu inhibitoru (Tyr221 a Leu224), což podporuje hypotézu o univerzální zranitelnosti tyrosinové dráhy u nematod. Získané výsledky naznačují, že HPPD představuje perspektivní cíl pro vývoj anthelmintik, jehož účinnost je však úzce spjata s dostupností L-tyrosinu. Práce zároveň upozorňuje na environmentální rizika pro volně žijící hlístice.

Klíčová slova: *Caenorhabditis elegans*, *Meloidogyne hapla*, *Haemonchus contortus*, 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza (HPPD), nitisinon (NTBC), *E. coli*, inhibiční testy

Nitisinone, herbicide and drug and its effect on parasitic and non-parasitic nematodes

Summary

The diploma thesis focused on the study of the effect of nitisinone (NTBC), an inhibitor of the enzyme 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD), on selected nematode species using phenotypic experiments, molecular-biochemical methods, and bioinformatic analysis.

Phenotypic assays conducted on the model organism *Caenorhabditis elegans* (n = 13) demonstrated a strong synergistic effect of NTBC and exogenous L-tyrosine. While individual treatments had only a minimal impact on nematode viability, their combination resulted in a significant reduction in reproduction by 44.2 % and a high acute mortality rate reaching 61.5 %. These findings indicate that fatal effects are not caused by enzyme inhibition alone, but rather by the subsequent accumulation of toxic metabolic intermediates. Preliminary experiments with the phytoparasitic nematode *Meloidogyne hapla* revealed extreme phytotoxicity of NTBC toward host plants already at the germination stage, which prevented the establishment of a host system for phenotypic assays and highlighted limitations in its practical application in plant protection.

The molecular-biochemical part of the study focused on the recombinant expression of HPPD from *M. hapla* and *C. elegans* in an *E. coli* system. The colorimetric assay did not show the expected pigment formation for the parasitic proteins. In collaboration with the Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Western blot analysis revealed that the studied enzymes formed inactive inclusion bodies in the bacterial host, explaining the absence of detectable enzymatic activity. These findings highlight significant limitations of standard expression protocols for parasitic proteins and emphasize the need for further optimization of experimental conditions when studying recombinant proteins in parasitic nematodes.

Bioinformatic analysis of 11 protein sequences confirmed a high degree of conservation of the enzyme's active site across the studied nematode orders as well as in the zooparasite *Haemonchus contortus*. Complete conservation was identified in the key catalytic triad (His183, His266, and Glu349), along with a high level of conservation in residues determining inhibitor binding affinity (Tyr221 and Leu224), supporting the hypothesis of a broadly conserved vulnerability of the tyrosine degradation pathway in nematodes. The results suggest that HPPD represents a promising target for anthelmintic development; however, its effectiveness appears to be closely linked to the availability of L-tyrosine. At the same time, the study highlights potential environmental risks for free-living nematodes.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*, *Meloidogyne hapla*, *Haemonchus contortus*, 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD), nitisinone (NTBC), *E. coli*, inhibition assays

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce.....	9
3 Literární rešerše.....	10
3.1 Parazitické a neparazitické hlístice	10
3.1.1 Volně žijící druhy	10
3.1.2 Parazitické druhy	10
3.1.3 Význam studia účinku chemických látek na hlístice	12
3.2 Hlístice v interakci s xenobiotiky	12
3.2.1 Detoxikační systémy hlístic	12
3.2.2 Rezistence k anthelmintikům.....	13
3.3 Metabolické cíle a enzymy jako terapeutické targety.....	13
3.3.1 Principy výběru enzymatických cílů	14
3.3.2 Příklady enzymatických cílů.....	14
3.3.2.1 Energetický metabolismus a anaerobní dráhy	14
3.3.2.2 Neuromuskulární systém hlístic	14
3.3.2.3 Detoxikační mechanismus hlístic	15
3.3.2.4 Metabolismus aminokyselin.....	15
3.4 Metabolismus tyrosinu	15
3.4.1 Katabolická dráha tyrosinu	15
3.4.2 Enzym HPPD – funkce a inhibice	16
3.5 Nitisinon	17
3.5.1 Historie a objev nitisinonu.....	17
3.5.2 Chemická struktura a vlastnosti.....	17
3.5.3 Využití a potenciál nitisinonu	18
3.6 Studované organismy.....	19
3.6.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	19
3.6.2 <i>Meloidogyne hapla</i>	20
3.6.3 <i>Haemonchus contortus</i>	21
4 Metodika	22
4.1 Analýza alignmentu	22
4.2 <i>Caenorhabditis elegans</i>.....	23
4.2.1 Fenotypové testy u <i>Caenorhabditis elegans</i>	23
4.2.1.1 Kultivace <i>Caenorhabditis elegans</i>	23
4.2.1.2 Synchronizace kultury <i>Caenorhabditis elegans</i>	23
4.2.1.3 Testy přežívání a reprodukce	24

4.2.2	Molekulárně-biochemická analýza u <i>Caenorhabditis elegans</i>	24
4.2.2.1	PCR.....	24
4.2.2.2	Analýza výsledků PCR.....	25
4.2.2.3	Klonování do expresního vektoru a transformace buněk.....	26
4.2.2.4	Kolorimetrická esej	28
4.3	<i>Meloidogyne hapla</i>	29
4.3.1	Fenotypové testy u <i>Meloidogyne hapla</i>	29
4.3.1.1	Pilotní testy fytotoxicity	29
4.3.2	Molekulárně-biochemická analýza u <i>Meloidogyne hapla</i>	30
4.3.2.1	Syntetický gen	30
4.3.2.2	Návrh primerů a PCR	31
4.3.2.3	Analýza výsledků PCR.....	31
4.3.2.4	Klonování a transformace buněk.....	32
4.3.2.5	Kolorimetrická esej	34
4.4	<i>Haemonchus contortus</i>	34
5	Výsledky	35
5.1	Výsledky analýzy alignmentu.....	35
5.2	Výsledky testů přežívání a reprodukce <i>Caenorhabditis elegans</i>	37
5.2.1	Reprodukce <i>Caenorhabditis elegans</i>	37
5.2.2	Přežívání samic <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
5.3	Výsledky kolorimetrické eseje u <i>Caenorhabditis elegans</i>	39
5.4	Testy klíčivosti a limitace fenotypových testů u <i>Meloidogyne hapla</i>	41
5.5	Výsledky kolorimetrické eseje u <i>Meloidogyne hapla</i>	42
6	Diskuze	43
6.1	Fenotypová odezva <i>Caenorhabditis elegans</i>	43
6.2	Fytotoxicita nitisinonu jako limit fenotypových testů u <i>Meloidogyne hapla</i>	44
6.3	Bioinformatická analýza a predikce selektivní toxicity	44
6.4	Interpretace kolorimetrické eseje a metodické limity	45
7	Závěr.....	47
8	Literatura.....	49
9	Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Hlístice (Nematoda) představují jednu z nejdíverzifikovanějších skupin živočichů na Zemi, zahrnující jak volně žijící druhy plnící nezastupitelné funkce v půdních ekosystémech a biogeochemických cyklech, tak parazitické formy způsobující závažné škody v zemědělství i medicíně. Fytoparazitické hlístice jsou celosvětově zodpovědné za ztráty zemědělské produkce odhadované na 80 až 100 miliard amerických dolarů ročně (Jones et al. 2013), Zooparazitické druhy pak představují zásadní zdravotní problém u lidí i hospodářských zvířat, což dokládají i aktuální data Světové zdravotnické organizace (WHO 2023; WHO 2024).

Stávající strategie ochrany před parazitickými hlísticemi jsou založeny především na aplikaci anthelmintik, jejichž terapeutická účinnost je však v posledních desetiletích závažně kompromitována narůstající rezistencí parazitů. Tato alarmující situace podtrhuje naléhavou potřebu identifikace nových terapeutických cílů, mezi nimiž zaujímají prominentní místo esenciální metabolické procesy, včetně metabolismu aminokyselin (Sterkel et al. 2021). Zvláště perspektivním kandidátem v rámci degradační dráhy tyrosinu je enzym 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza (HPPD), katalyzující přeměnu 4-hydroxyfenylpyruvátu na homogenizát a zastávající klíčovou úlohu v udržování buněčné metabolické homeostázy (Raspail et al. 2011). Významným inhibitorem tohoto enzymu je nitisinon. Tato syntetická sloučenina původně vyvinutá pro herbicidní aplikace posléze našla zásadní uplatnění v humánní medicíně při léčbě hereditární tyrosinémie typu I (Lock et al. 1998). Přestože je nitisinon v klinické praxi i výzkumu hojně využíván, jeho vliv na fyziologii a metabolismus hlístic zůstává dosud nedostatečně charakterizován.

Předložená diplomová práce se věnuje studiu vlivu nitisinonu na hlístice prostřednictvím kombinace fenotypových, molekulárně-biochemických a bioinformatických přístupů. V první části je pozornost věnována hodnocení fenotypových změn u modelového organismu *Caenorhabditis elegans*, konkrétně vlivu nitisinonu na přežívání a reprodukci v závislosti na exogenní dostupnosti tyrosinu. Pro posouzení možnosti realizace obdobných fenotypových testů u fytoparazitického druhu *Meloidogyne hapla* byly provedeny předběžné testy klíčivosti hostitelských rostlin, které sloužily k vyhodnocení fytotoxicity nitisinonu a ověření funkčnosti hostitelského systému in vitro.

Molekulárně-biochemická část práce se zaměřuje na rekombinantní expresi enzymu HPPD u druhů *Caenorhabditis elegans* a *Meloidogyne hapla* s cílem ověřit jejich enzymatickou aktivitu a posoudit vliv inhibitoru na biochemické úrovni. Tyto experimentální přístupy jsou doplněny detailní bioinformatickou analýzou a komparací aminokyselinových sekvencí HPPD studovaných organismů a zooparazita *Haemonchus contortus*, zaměřenou na konzervaci aktivního místa a predikci vazebné afinity inhibitoru. Komplexní studium těchto mechanismů umožňuje posoudit potenciál HPPD jako nového cíle pro vývoj anthelmintik a zároveň zhodnotit limity praktického využití nitisinonu v ochraně rostlin i jeho možná rizika pro volně žijící hlístice (Smythe et al. 2019).

2 Cíl práce

Cílem práce bylo:

- stanovit účinek nitisinonu na životaschopnost a přežívání parazitických hlístic (*Haemonchus contortus*, *Meloidogyne hapla*) a volně žijícího modelového organismu *Caenorhabditis elegans* v in vitro kultivacích,
- ověřit vliv koncentrace aminokyseliny tyrosinu v kultivačních médiích na účinnost nitisinonu,
- stanovit míru inhibice aktivity rekombinantního enzymu 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy (HPPD) u jednotlivých studovaných druhů hlístic,
- porovnat rozdíly v odpovědi parazitických a volně žijících hlístic na expozici nitisinonu a inhibici HPPD,
- posoudit potenciál nitisinonu jako antihelmintika pro kontrolu infekcí parazitickými hlísticemi a vyhodnotit jeho možné riziko pro volně žijící hlístice v půdě.

3 Literární rešerše

3.1 Parazitické a neparazitické hlístice

Hlístice (Nematoda) představují kmen mnohobuněčných organismů zaujímající významné postavení v živočišné říši z hlediska abundance, druhové diverzity i ekologické role. Jejich původ sahá do raného kambria před více než 500 miliony lety, kdy obývaly mořské sedimenty (Holterman et al. 2019). Od té doby se rozšířily téměř do všech prostředí na Zemi. Přestože bylo vědecky popsáno přibližně 30 000 druhů, jejich skutečný počet je odhadován na stovky tisíc až několik milionů (Hodda 2022). Tento nepoměr je z velké části důsledkem toho, že se vědecká pozornost historicky soustředila na parazitické zástupce, zatímco diverzita volně žijících druhů zůstávala podceňována. Z dosud popsaných druhů připadá 15 % na fytoparazity a 45 % na zooparazity, volně žijící druhy tvoří zbývající část (Schratzberger et al. 2019).

3.1.1 Volně žijící druhy

Na základě počtu jedinců jsou hlístice dominantní složkou půdní fauny. Podle studie van den Hoogen et al. (2019) dosahuje globální abundance hlístic v povrchových vrstvách půdy přibližně $4,4 \times 10^{20}$ jedinců. Bylo prokázáno, že v přirozených biotopech je hustota hlístic výrazně vyšší než v těch, které byly přeměněny lidskou činností, například zemědělskými zásahy. Nejvyšší hustoty jsou zaznamenávány v půdách travních ekosystémů, kde může množství jedinců dosahovat 0,6–30 milionů na metr čtvereční (Bagínska et al. 2025). V řadě stanovišť tak hlístice početně převyšují všechny ostatní živočichy a zejména v půdních ekosystémech mohou tvořit 80–90 % veškeré živočišné biomasy (Bongers & Ferris 1999). Toto hojné zastoupení hlístic se promítá do jejich ekologického významu. Volně žijící druhy regulují populace mikroorganismů a drobných bezobratlých, čímž ovlivňují procesy rozpadu organické hmoty a mineralizace živin. Zároveň slouží jako potrava pro organismy vyšších trofických úrovní. Složení nematodových společenstev je považováno za citlivý bioindikátor kvality půdy a reaguje na změny způsobené zemědělským hospodařením nebo znečištěním prostředí (Smythe et al. 2019).

3.1.2 Parazitické druhy

Vedle své role v půdních ekosystémech vstupují hlístice do vysoce specializovaných vztahů s rostlinnými i živočišnými hostiteli. Fylogenetické analýzy ukazují, že se parazitismus v rámci kmene Nematoda vyvinul nezávisle nejméně 15krát v různých evolučních liniích (Blaxter et al. 1998). Parazitické druhy si vytvořily řadu adaptací umožňujících průnik do hostitelských tkání, modulaci imunitní reakce hostitele a efektivní šíření v prostředí díky vysoké reprodukční schopnosti. Jejich životní cykly často zahrnují několik vývojových stádií s odlišnou morfologií a různým způsobem výživy a v některých případech i střídání hostitelů. Některé druhy jsou schopny vstoupit do vývojové dormance, která jim umožňuje přežít nepříznivé podmínky prostředí i dlouhodobou nepřítomnost hostitele (Blaxter 2011, Coakley et al. 2016).

Fytoparazitické hlístice způsobují celosvětové zemědělské ztráty 80–100 miliard amerických dolarů ročně (Jones et al. 2013). Napadají kořenové systémy i nadzemní části rostlin, a to přímou infekcí kořenů a listů nebo migrací do vegetativních orgánů rostlin. Podle typu interakce s hostitelem dochází k různým formám poškození. Kořenová (hálkotvorná) háďátka (rod *Meloidogyne*) indukují vznik velkých výživových buněk (giant cells), což vede k tvorbě charakteristických zduřenin na kořenech (hálek). Cystotvorná háďátka (rody *Heterodera*, *Globodera*) vytvářejí obdobné živné struktury (syncytia) a následně se zapouzdřují do ochranné schránky vzniklé z těla samičky, která umožňuje dlouhodobé přežívání vajíček v půdě. Migrující fytoparazité (rody *Pratylenchus*, *Ditylenchus*) mechanicky narušují rostlinné pletivo, způsobují nekrotická ložiska a postupný rozpad. Všechny typy infekce vedou k omezení příjmu vody a živin, zakrslému růstu, chloróze a sníženému výnosu až o 50–80 % u citlivých plodin (Perry & Moens 2013).

Zooparazitické hlístice infikují široké spektrum živočichů od bezobratlých po obratlovce včetně člověka. Vstup do hostitele probíhá různými cestami – aktivní penetrací kůže za pomoci proteolytických enzymů, perorálním příjmem infekčních stádií kontaminovanou potravou či vodou, nebo přenosem vektory (krev sajícím hmyzem). Po infekci často dochází k rozsáhlým tkáňovým migracím. U hospodářských zvířat způsobují gastrointestinální hlístice (např. *Haemonchus contortus*, *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora*) chronické ztráty krve, ztrátu tělesné hmotnosti a výrazně sníženou produkci. Pouze v chovech přežvýkavců mohou roční ekonomické ztráty přesahovat 10 miliard amerických dolarů (Strydom et al. 2023). U člověka představují hlístice závažný zdravotní problém především v rozvojových zemích. Tzv. půdní helmintózy, označované také jako geohelmintózy, jsou infekce způsobené hlísticemi, u nichž se infekční stádia vyvíjejí v půdě a k nákaze dochází zejména při kontaktu s kontaminovaným prostředím (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*). Celosvětově postihují 1,5 miliardy lidí (WHO 2023), nejčastěji v oblastech s nedostatkem čisté vody a nízkou úrovní hygieny. Infekce těmito parazity vede k chronické anémii, malnutrici a zpomalenému fyzickému a kognitivnímu vývoji dětí. Filariálními hlísticemi (*Wuchereria bancrofti*, *Onchocerca volvulus*) je infikováno přibližně 51 milionů lidí (WHO 2024). Jejich výskyt je omezen na subtropické a tropické pásmo, kde se přirozeně vyskytují vhodné přenašeči. Způsobují chronická onemocnění jako lymfatickou filariózu (elefantiázu) a onchocerkiázu, známou také jako říční slepota. Kombinace vysoké prevalence, chronického průběhu a omezené dostupnosti léčby činí z parazitických hlístic jednu z nejvýznamnějších zanedbávaných tropických chorob (Mitrevu et al. 2007).

Navzdory negativním dopadům na zemědělství a zdraví hostitelů mohou mít parazitické hlístice praktické využití v biologické ochraně rostlin. Entomopatogenní druhy pronikají do těla hostitele a ve spolupráci se symbiotickými bakteriemi způsobují rychlé usmrcení napadeného hmyzu. Zejména zástupci rodů *Steinernema* a *Heterorhabditis* jsou využívány jako biologická agens při regulaci populací škůdců a jako alternativa k chemickým insekticidům představují součást integrované ochrany rostlin (Lacey & Georgis 2012).

3.1.3 Význam studia účinku chemických látek na hlístice

Hlístice jakožto mimořádně heterogenní skupina vynikají ve schopnosti adaptace na různé ekologické niky a s tím související odlišné životní strategie – od volně žijících bakteriovorních a fungivorních forem po parazitické formy (Schratzberger et al. 2019). Tato ekologická a fyziologická plasticita má zásadní důsledky pro selektivitu chemických látek používaných k jejich kontrole. Moderní nematocidy a anthelmintika vykazují často nedostatečnou selektivitu a mohou negativně ovlivňovat necílové volně žijící hlístice v půdních a vodních ekosystémech (Thoden et al. 2020). Studie Grabau et al. (2020) potvrdila, že zatímco některé nematocidy na bázi pyridylethylamidů mají minimální vliv na volně žijící skupiny, jiné látky jako 1,3-dichloropropen významně snižují abundanci fungivorů. Naproti tomu novější chemikálie jako fluensulfone a fluazaindolizine vykazují příznivější profil – kontrolují fytoparazitické hlístice při zachování hustoty a diverzity volně žijících druhů (Kawanobe et al. 2019; Talavera et al. 2021). Důležitým zjištěním je, že některé nematocidy mohou také poškozovat entomopatogenní hlístice používané v biologické ochraně, což vytváří konflikt mezi chemickou a biologickou kontrolou. Studium účinků chemických látek na hlístice proto propojuje výzkum zaměřený na kontrolu parazitů s hodnocením možných dopadů na necílové organismy (Thoden et al. 2020).

3.2 Hlístice v interakci s xenobiotiky

Termín xenobiotikum označuje jakoukoli chemickou látku, která se v daném organismu přirozeně nevyskytuje a není produktem jeho metabolismu. Do této kategorie patří pesticidy, léčiva i průmyslové chemikálie (Vosála et al. 2025).

3.2.1 Detoxikační systémy hlístic

Přeměna xenobiotik v těle hlístic probíhá typicky ve dvou fázích za pomoci efektivní enzymatické dráhy. Klíčovou roli hrají cytochromy P450 (CYP), které provádějí především oxidační reakce a do molekuly xenobiotika zavádějí funkční skupiny umožňující další úpravy. Chakrapani a spolupracovníci (2008) vyvinuli reportérový systém založený na fluorescenčním proteinu GFP, který je napojen na promotory CYP genů u *Caenorhabditis elegans*. Tento systém ukázal, že xenobiotika (například analogy rifampicinu) silně indukují expresi nematodových CYP enzymů podobně jako u savců. Díky tomuto objevu je možné rychle testovat, které látky indukují detoxikační enzymy, a tím předvídat potenciální problémy s účinností nebo rezistencí (Chakrapani et al. 2008).

V druhé fázi metabolismu se na produkty z první fáze napojují hydrofilní molekuly glutathionu pomocí enzymu glutathion-S-transferáza (GST). Tyto konjugáty jsou pak lépe rozpustné ve vodě a snadněji se vylučují z organismu (Figueiredo et al. 2018). Syntéza detoxikačních enzymů se může zároveň zvyšovat v reakci na přítomnost xenobiotik, což umožňuje organismu přizpůsobit se měnícím se podmínkám (Chakrapani et al. 2008).

Třetím klíčovým prvkem obrany jsou transportní proteiny ze skupiny ABC (ATP-binding cassette), zejména P-glykoproteiny (P-gp). Tyto molekulární pumpy aktivně vyplavují xenobiotika z buněk, čímž snižují jejich intracelulární koncentraci a toxicitu (Whittaker et al. 2017). Raza (2017) v rámci své studie zjistil, že zvýšená hladina P-gp

u rezistentních izolátů *H. contortus* koleruje s vyšší odolností vůči ivermektinu a snížené účinnosti léku. Když však použili inhibitory MDR (multidrug resistance), látky blokující funkci P-gp transportérů, citlivost k ivermektinu se obnovila. Podobně Figueiredo et al. (2018) prokázali klíčovou roli Pgp-12 v rezistenci k ivermektinu u *C. elegans*, kde experimentální potlačení exprese genu *pgp-12* vedlo k reverzi rezistentního fenotypu.

3.2.2 Rezistence k anthelmintikům

Opakované používání anthelmintik v zemědělství i medicíně vede k narůstající rezistenci parazitických hlístic, což představuje globální problém omezující možnosti kontroly. Mechanismy rezistence zahrnují specifické změny v cílových proteinech (například mutace β -tubulinu u benzimidazolové rezistence) i nespecifické změny v metabolismu a transportu léčiv (Whittaker et al. 2017). Transkriptomické studie rezistentních izolátů *H. contortus* odhalily změny v expresi stovek genů kódujících receptory, transportní proteiny, detoxikační enzymy a další komponenty buněčné obrany (Tuersong et al. 2022). Analýzy studie na *Teladorsagia circumcincta* odhalily, že rozdíly v expresi P-gp a CYP mohou být jak konstitutivní, přítomné už před expozicí léčivu, tak indukovatelné, vznikající jako reakce na přítomnost léčiva (Dicker 2010). Rehborg et al. (2023) demonstrovali na modelu *C. elegans*, že genetické změny ovlivňující propustnost buněčných bariér nejen mění citlivost k jednotlivým látkám, ale mohou také pozměnit interakce mezi různými léčivy. V tomto případě kombinační terapie, které byly dříve synergické, mohou u rezistentních kmenů ztratit účinnost nebo dokonce vykazovat antagonismus. Tyto poznatky podporují kombinovaný přístup managementu rezistence spočívající v rotaci různých tříd anthelmintik, vyhýbání se subletálními dávkami, které by mohly aktivovat detoxikační dráhy, a potenciální využití inhibitorů transportních pump (Raza 2017; Rehborg et al. 2023). Kromě modulace transportních mechanismů představují slibnou strategii také metabolické dráhy a enzymy jako potenciální terapeutické cíle (Vosála et al. 2025).

3.3 Metabolické cíle a enzymy jako terapeutické targety

Identifikace a validace metabolických cílů představuje perspektivní metodu pro návrh nových nematocidů a anthelmintik. Metabolické enzymy, jakožto katalyzátory biochemických transformací nezbytných pro homeostázu organismu, nabízejí atraktivní možnosti pro farmakologickou intervenci. Inhibice metabolických drah může vést k narušení energetického metabolismu, biosyntézy esenciálních makromolekul nebo narušení detoxikačních procesů, přičemž v konečném důsledku vede k neschopnosti hlístice přežít a množit se. Metabolické dráhy jsou často propojené, a proto inhibice jednoho klíčového enzymu může mít kaskádové efekty na více procesů současně. Tyto metabolické cíle jsou často konzervovány napříč živými organismy, což usnadňuje jejich studium na modelových organismech jako *C. elegans* (Burns et al. 2023, Vosála et al. 2025).

3.3.1 Principy výběru enzymatických cílů

Výběr vhodného metabolického cíle vyžaduje posouzení několika kritérií. Primárně musí být daný enzym esenciální pro přežití nebo reprodukci nematoda, to lze ověřit prostřednictvím genetických přístupů, jako je RNA interference nebo knock-out mutace (Burns et al. 2015). Dále je nezbytná dostupnost enzymatického cíle pro malé molekuly. Léčivo musí být schopné proniknout ochrannými bariérami hlístice a dostat se do buněk ve správné koncentraci (Holden-Dye & Walker 2014). Třetím aspektem je dostatečná strukturní odlišnost od ortologních enzymů hostitele, což umožňuje návrh selektivních inhibitorů s minimální toxicitou pro necílové organismy (Burns et al. 2023). Tyto tři principy představují ideální scénář pro vývoj anthelmintik, avšak v praxi ne každý potenciální cíl splňuje všechna tato kritéria. Zejména dosažení dostatečné selektivity může být technicky náročné, pokud jsou enzymy vysoce konzervované (Vairoletti et al. 2022).

3.3.2 Příklady enzymatických cílů

3.3.2.1 Energetický metabolismus a anaerobní dráhy

Hlístice, především parazitické druhy žijící v anaerobních podmínkách (*Ascaris suum*, *Haemonchus contortus*), mají modifikované metabolické dráhy pro získávání energie. Inhibice těchto specifických drah může selektivně poškodit parazity, aniž by ovlivnila hostitele. Na rozdíl od savců, kteří využívají kyslík jako terminální akceptor elektronů v dýchacím řetězci, mohou parazitické hlístice za hypoxických podmínek využívat fumarát jako alternativní akceptor elektronů (Kita et al. 2002). Klíčovým enzymem ve fumarát-reduktázové dráze je rhodochinon-dependentní fumarát reduktáza, jejímž účinným inhibitorem je například nafuredin, přírodní metabolit produkovaný houbou *Aspergillus niger* (Omura et al. 2001). Odlišný mechanismus účinku představují benzimidazolová anthelmintika, která nepůsobí přímo na energetický metabolismus, ale narušují polymeraci mikrotubulů vazbou na β -tubulin, čímž dochází k omezení příjmu živin a následnému energetickému vyčerpání parazita (Saidu et al. 2025).

3.3.2.2 Neuromuskulární systém hlístic

Tradiční anthelmintika často cílí na nervový nebo svalový systém hlístic, který je klíčový pro řízení pohybu, příjem potravy a celkovou životaschopnost parazita. Organofosforečné sloučeniny a karbamáty působí jako inhibitory acetylcholinesterázy, enzymu zodpovědného za hydrolýzu acetylcholinu v synaptické štěrbině. Inhibice tohoto enzymu vede k akumulaci acetylcholinu na postsynaptických receptorech, následné spastické paralýze a usmrcení parazita (Wolstenholme et al. 2004). Podobného efektu je dosaženo také u látek, které necílí na enzymy, ale přímo na receptory. Například imidazothiazoly (levamisol) a tetrahydropyrimidiny (pyrantel) působí jako agonisté nikotinových acetylcholinových receptorů. Přestože je mechanismus účinku odlišný, vede rovněž k nadměrné stimulaci svalových buněk a spastické paralýze hlístic (Martin et al. 2012).

3.3.2.3 Detoxikační mechanismus hlístic

Hlístice disponují robustním systémem enzymů, které jim umožňují neutralizovat toxické látky hostitele i podávaná anthelmintika. Tyto dráhy jsou zodpovědné za přirozenou odolnost i rozvoj získané rezistence. Detoxikační enzymy a transportní systémy proto představují významnou skupinu potenciálních terapeutických cílů. Jejich inhibice může vést ke zvýšení účinnosti anthelmintik. V případě ABC transportérů, zejména P-glykoproteinů, bylo navíc prokázáno, že jejich blokáda může vést k obnovení citlivosti rezistentních kmenů, jak bylo zmíněno v kap. 3.2.1 (Chakrapani et al. 2008; Figueiredo et al. 2018).

3.3.2.4 Metabolismus aminokyselin

Dalším slibným cílem jsou enzymy zapojené do syntézy a metabolismu aminokyselin, které slouží nejen jako stavební bloky proteinů, ale také jako výchozí látky pro biosyntézu neurotransmiterů, kofaktorů a dalších biologicky aktivních látek. Narušení jejich metabolismu může mít devastující důsledky, zejména pokud jsou hlístice závislé na příjmu určitých aminokyselin zvenčí nebo pokud se hromadí toxické meziprodukty. Specifickým příkladem metabolického cíle, který si zaslouží pozornost, je 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenáza (HPPD), která má nezastupitelnou funkci v metabolismu tyrosinu (Vosála et al. 2025). Tento enzym a jeho inhibitory jsou předmětem následujících kapitol.

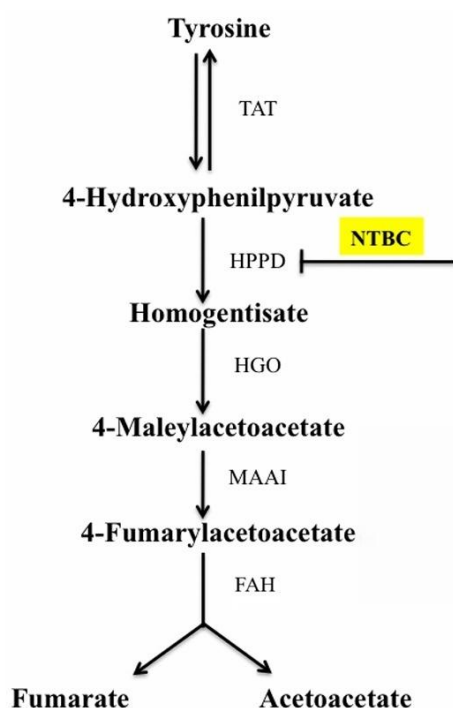
3.4 Metabolismus tyrosinu

Tyrosin (para-hydroxyfenylalanin) je aromatická aminokyselina, která hraje multifunkční roli v buněčném metabolismu. Kromě své inkorporace do proteinů slouží jako prekurzor pro biosyntézu katecholaminových neurotransmiterů (dopamin, noradrenalin, adrenalin), thyroidních hormonů (thyroxin, trijodthyronin), melaninových pigmentů a dalších fenolických sloučenin. Tyrosin může být získáván přímo z potravy nebo syntetizován v těle z fenylalaninu, a proto je považován za semi-esenciální aminokyselinu (Shah & Moran 2015). Fenylalanin se hydroxyluje na tyrosin pomocí enzymu fenylalanin hydroxylázy (PAH), který vyžaduje kofaktor tetrahydrobiopterin. Tato reakce je u savců hlavním zdrojem tyrosinu a její porucha vede k fenylketonurii, dědičnému metabolickému onemocnění, při kterém dochází k akumulaci fenylalaninu a jeho alternativních metabolitů (fenylpyruvát, fenyllaktát, fenylacetát) v těle organismu. U hlístic je biosyntéza tyrosinu méně prostudovaná. Genomické analýzy však naznačují, že u *C. elegans* existují homologní geny k lidské PAH, což připouští možnost endogenní syntézy. Vedle toho mohou hlístice tyrosin přijímat alimentárně, v případě parazitických druhů přímo z tkání a tělních tekutin hostitele. Přebytek tyrosinu je rozkládán prostřednictvím katabolické dráhy (Moran 2005).

3.4.1 Katabolická dráha tyrosinu

Degradace tyrosinu probíhá v sekvenci pěti enzymatických kroků, které přeměňují tyrosin na fumarát a acetoacetát, intermediáty centrálního metabolismu. První krok je katalyzován tyrosin aminotransferázou (TAT), která přenáší α -amino skupinu z tyrosinu na α -ketoglutarát za vzniku 4-hydroxyfenylpyruvátu (4-HPP) a glutamátu. V druhém kroku

je meziprodukt 4-HPP oxidativně dekarboxylován a hydroxylován enzymem 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenázou (HPPD aka 4-HPD) na homogentisát (2,5-dihydroxyfenylacetát). Tato reakce je považována za rozhodující v katabolismu tyrosinu, jelikož homogentisát nepodléhá alternativním metabolickým přeměnám a pokračuje pouze v této degradační dráze (Raspail et al. 2011). Ve třetím kroku je aromatický kruh homogentisátu oxidativně štěpen homogentisát 1,2-dioxygenázou (HGD), čímž vzniká maleylacetoacetát. Čtvrtý krok zahrnuje izomerizaci maleylacetoacetátu na fumarylacetoacetát, která je katalyzována maleylacetoacetát izomerázou (MAAI). V poslední fázi je fumarylacetoacetát hydrolyticky štěpen fumarylacetoacetát hydrolázou (FAH) na fumarát a acetoacetát. Fumarát vstupuje do citrátového cyklu a představuje glukogenní produkt, zatímco acetoacetát může být využit pro syntézu ketolátek nebo přeměněn na acetyl-CoA, což řadí tyrosin mezi aminokyseliny současně glukogenní i ketogenní (Lewis & Botham 2013).



Obrázek 1: Schéma katabolické dráhy tyrosinu a místo účinku nitisinonu (NTBC) – inhibitoru HPPD (Angileri et al. 2014).

3.4.2 Enzym HPPD – funkce a inhibice

Enzym HPPD (EC 1.13.11.27) katalyzuje oxidativní dekarboxylaci 4-HPP na homogentisát za přítomnosti molekulárního kyslíku. Je přítomen u většiny aerobních organismů a jeho katalytická funkce je evolučně konzervována (Santucci et al. 2017). U rostlin má HPPD kromě role v katabolismu tyrosinu také významnou úlohu v biosyntéze plastochinonů a tokoferolů, jejichž prekurzorem je homogentisát. Tyto sloučeniny jsou nezbytné pro funkční fotosyntézu a ochranu fotosyntetického aparátu před oxidačním stresem (Shah & Moran 2015). U savců je HPPD výhradně součástí katabolické dráhy tyrosinu. Mutace v genu pro HPPD způsobují tyrosinémii typu III, dědičnou poruchu metabolismu

spojenou se zvýšenou hladinou tyrosinu v krvi a neurologickými symptomy (Santucci et al. 2017). Přítomnost HPPD byla prokázána také u hlístic. U modelového organismu *C. elegans* je gen *hpd-1* kódující HPPD dobře anotován a jeho produkt vykazuje enzymatickou aktivitu (Scott et al. 2023). Analýza sekvenční podobnosti v databázi WormBase dále identifikovala další sekvenci (gen *C31H2.4*) vykazující významnou podobnost s *hpd-1*. Tato sekvence pravděpodobně představuje paralogní gen, jehož funkce však není dosud jednoznačně charakterizována (WormBase 2024).

Strukturním znakem HPPD je přítomnost aktivního centra obsahujícího železnatý iont (Fe^{2+}), který je nezbytný pro katalytickou aktivitu enzymu. Triketonové inhibitory, včetně nitisinonu, chelatují toto katalytické železo a kompetitivně blokují přístup substrátu 4-HPP. Inhibiční konstanta nitisinonu vůči HPPD se liší v závislosti na organismu a může se pohybovat v rozmezí od nanomolárních hodnot po vyšší koncentrace, což řadí nitisinon mezi velmi potentní inhibitory tohoto enzymu (Kučera et al. 2025).

3.5 Nitisinon

Nitisinon (2-(2-nitro-4-trifluormetylfenyl)-1,3-cyklohexandion), též známý pod zkratkou NTBC, představuje pozoruhodný příklad převedení původně agrochemické sloučeniny do humánní farmakoterapie a je tak jednou z mála látek s uplatněním v zemědělství jako herbicid a zároveň v medicíně jako registrované léčivo (Lock 2022). V současnosti je také využíván k experimentálnímu studiu účinku inhibice HPPD u různých organismů, především krev sajícího hmyzu a dalších hematofágních členovců (Kučera et al. 2025).

3.5.1 Historie a objev nitisinonu

Triketonové sloučeniny byly poprvé syntetizovány v 80. letech 20. století jako strukturní analogy přírodního herbicidu leptospermonu, izolovaného z australské rostliny *Callistemon citrinus* (Lewis & Botham 2013). Během preklinického testování triketonových herbicidů bylo zjištěno, že tyto látky způsobují u laboratorních zvířat tyrosinémii, tedy zvýšení hladiny tyrosinu v krvi. Tento efekt nebyl spojen s hepatotoxicitou, což vedlo k hypotéze, že látky inhibují enzym zapojený v katabolismu tyrosinu (Lindstedt et al. 1992). Následné in vitro experimenty s HPPD izolovanou z potkaních jater prokázaly, že NTBC je potentní, časově dependentní a reverzibilní inhibitor HPPD s IC_{50} přibližně 40 nM. Tento mechanismus vysvětlil pozorovanou tyrosinémii a současně naznačil potenciální terapeutické využití látky u onemocnění spojených s metabolismem tyrosinu (Ellis et al. 1995; Lock et al. 1998).

3.5.2 Chemická struktura a vlastnosti

NTBC je syntetická triketonová sloučenina charakterizovaná přítomností tří karbonylových skupin, které jsou uspořádány v β -triketonovém motivu. Struktura molekuly se skládá z 1,3-cyklohexandionového kruhu obsahujícího dvě karbonylové skupiny a z benzoylové karbonylové skupiny navázané na aromatické jádro, čímž vzniká celková triketonová konfigurace. Aromatické jádro je dále substituováno nitro- a trifluormethylovou skupinou. Tato struktura je podobná přirozenému substrátu HPPD (4-HPD) a umožňuje NTBC kompetitivně se vázat do aktivního místa enzymu. Trifluormetylová skupina zvyšuje lipofilitu

molekuly a stabilitu vůči metabolické degradaci. Nitroskupina může přispívat k vazbě do aktivního místa prostřednictvím interakcí s železným iontem nebo okolními aminokyselinami. Relativně malá molekula NTBC (molekulová hmotnost 329 g/mol) je stabilní za fyziologických podmínek. U savců je NTBC dobře absorbován po perorálním podání a má dlouhý biologický poločas (u člověka až několik dní). Tyto vlastnosti přispívají k jeho dlouhodobému účinku a účinné inhibici enzymu HPPD (Lock 2022).

3.5.3 Využití a potenciál nitisinonu

NTBC byl využit jako modelová sloučenina pro vývoj triketonových herbicidů. Biologické testy na citlivých rostlinách potvrdily, že inhibice HPPD vede k rychlému poklesu obsahu karotenoidů a následnému fotooxidačnímu poškození chlorofylu, což má za následek charakteristické zblednutí listů – chlorózu (Lock et al. 1998). Na základě struktury NTBC byly syntetizovány účinnější a selektivnější sloučeniny, z nichž některé byly zavedeny do zemědělské praxe, například mesotrion (Callisto) a tembotrion (Laudis). Tyto herbicidy se používají především k regulaci dvouděložných plevelů v porostech kukuřice, a to při zachování selektivity vůči plodině (Beaudegnies 2009).

Do humánní medicíny byl NTBC zaveden pod obchodním názvem Orfadin® jako terapeutické činidlo pro léčbu hereditární tyrosinémie typu I, závažného dědičného onemocnění způsobeného deficitem fumarylacetoacetát hydrolýzy (FAH). Kumulace fumarylacetoacetátu a maleylacetoacetátu vede k poškození jater a ledvin, přičemž před zavedením NTBC byla jedinou účinnou léčbou transplantace (Holme a Lindstedt 2000). Klinická studie Lindstedt et al. (1992) ukázala, že inhibice HPPD vede k výraznému snížení koncentrací toxických metabolitů v plazmě a moči pacientů. Současně bylo pozorováno zlepšení jaterních funkcí a snížení mortality. Následné dlouhodobé sledování pacientů prokázalo, že léčba NTBC v kombinaci s dietním omezením tyrosinu a fenylalaninu významně snižuje riziko jaterního selhání a rozvoje hepatocelulárního karcinomu.

NTBC je v současnosti zkoumán u hematofágních členovců jako inhibitor metabolismu tyrosinu po příjmu krve. Experimentální práce na komáru *Anopheles stephensi* prokázala vysokou mortalitu jedinců po nasátí krve při podání triketonových inhibitorů HPPD, zatímco u jedinců bez příjmu krve nebyl tento efekt výrazný. Tato mortalita byla spojena právě s akumulací tyrosinu a narušením metabolické homeostázy (Kučera et al. 2025). Podobné výsledky byly zaznamenány také u much tse-tse (rod *Glossina*), kde inhibice HPPD vedla k významnému snížení přežívání po nasátí krve (Sterkel et al. 2021). Tyto experimenty poukazují na možnost využití NTBC při kontrole vektorů infekčních onemocnění prostřednictvím cílené inhibice metabolismu tyrosinu.

Navzdory prokázanému účinku NTBC u rostlin, savců i hematofágních členovců zůstává jeho potenciál u parazitických hlístic nedostatečně prozkoumán. Žádné ze schválených anthelmintik ani nematocidních látek v současnosti necílí na enzym HPPD ani obecně na metabolismus tyrosinu. Inhibice této metabolické dráhy tak představuje odlišný mechanismus účinku ve srovnání s dosud používanými látkami určenými k regulaci hlístic. Klíčovou otázkou zůstává selektivita, tedy zda inhibice HPPD poškozuje parazitické druhy při koncentracích bezpečných pro hostitele a volně žijící organismy. Vzhledem k evoluční konzervovanosti enzymu HPPD nelze předpokládat vysokou selektivitu bez další optimalizace

inhibitorů. NTBC však může sloužit jako referenční inhibitor pro ověření zranitelnosti metabolismu tyrosinu u hlístic a jako výchozí struktura pro případný vývoj selektivnějších analogů. Pro experimentální zhodnocení účinků NTBC na hlístice byli vybráni zástupci volně žijícího a parazitického druhu.

3.6 Studované organismy

3.6.1 *Caenorhabditis elegans*

C. elegans (řád Rhabditida) je volně žijící půdní hlístice, která se běžně vyskytuje v organicky bohatých substrátech, jako je kompost nebo rozkládající se rostlinný materiál. Patří mezi nejvýznamnější modelové organismy v biologii a je široce využívána v genetických, vývojových i toxikologických studiích. Dospělý jedinec dosahuje délky přibližně 1 mm a jeho životní cyklus je za laboratorních podmínek krátký, 3–4 dny při 20 °C. Vývoj probíhá přes čtyři larvální stadia (L1–L4) oddělená svlékáním kutikuly. Za nepříznivých podmínek může larva vstoupit do alternativního diapauzního stadia dauer larvy, které umožňuje přežití v prostředí s nedostatkem potravy nebo vysokou hustotou populace (Brenner 1974).

Velkou výhodou *C. elegans* je plně sekvenovaný genom (přibližně 100 Mb, 20 000 genů) a detailně popsaná buněčná linie zahrnující přesně definovaný počet buněk u dospělého hermafrodita (959 somatických buněk). Organismus je transparentní, což umožňuje přímé sledování morfologických změn a fyziologických procesů pomocí mikroskopie. *C. elegans* se živí bakteriemi a v laboratorních podmínkách se běžně kultivuje na agarovém médiu s bakteriálním kmenem *Escherichia coli* OP50. Díky snadné kultivaci, krátkému životnímu cyklu a dostupnosti genetických nástrojů je tento druh vhodný pro screening biologicky aktivních látek, včetně testování účinku potenciálních anthelmintik (Kaletta & Hengartner 2006).

Metabolické dráhy u *C. elegans*, včetně metabolismu aminokyselin, vykazují vysokou míru konzervace s parazitickými hlísticemi. Genom tohoto druhu obsahuje homologní geny pro enzymy katabolismu tyrosinu, včetně genu *hpd-1* kódujícího HPPD. Díky tomu představuje *C. elegans* vhodný model pro studium účinku inhibitorů HPPD a jejich dopadu na fyziologii hlístic (Corsi et al. 2015; Scott et al. 2023). V kontextu této práce reprezentuje neparazitický půdní druh, jehož citlivost k NTBC slouží jako základ pro hodnocení ekotoxikologického rizika a jako komparativní referenční bod vůči parazitickým druhům.



Obrázek 2: Larvální stádium L4 druhu *C. elegans* (délka těla 616,2 μm) zachycené pomocí světelné mikroskopie (Leica DMLB, software Leica Application Suite, foto: autorka).

3.6.2 *Meloidogyne hapla*

M. hapla je fytoparazitická hlístice patřící mezi kořenová hád'átka (root-knot nematodes) řádu Tylenchida. Tento druh napadá široké spektrum hostitelských rostlin, včetně zeleniny, okrasných rostlin a některých polních plodin. Infekce se projevuje tvorbou charakteristických hálkovitých zduření na kořenech, která vznikají v důsledku indukce hypertrofie buněk hostitelské rostliny. Životní cyklus *M. hapla* zahrnuje embryonální vývoj ve vajíčku, čtyři juvenilní stadia a dospělé. Infekčním stadiem jsou larvy druhé vývojové fáze (J2), které pronikají do kořenového pletiva a zakládají krmná místa. Jejich následný vývoj je silně závislý na teplotě a dostupnosti hostitelské rostliny. Samice jsou sedentární, hruškovitého tvaru a zůstávají trvale v kořenovém pletivu hostitele, kde produkují vajíčka. Naproti tomu samci mají vermiformní tvar, jsou pohybliví a kořenové pletivo opouštějí (Perry & Moens 2013; Jones et al. 2013).

Genom *M. hapla* byl kompletně osekvenován, dosahuje přibližně 54 Mb a obsahuje zhruba 14 000 protein-kódujících genů, včetně genu kódujícího HPPD (Opperman et al. 2008). Přítomnost katabolické dráhy tyrosinu tak umožňuje zkoumat účinek inhibitorů HPPD u fytoparazitických hlístic. Na rozdíl od *C. elegans* jsou však vývoj a metabolická aktivita druhu *M. hapla* úzce vázány na hostitelskou rostlinu. Příjem exogenních látek u tohoto typu hlístic probíhá primárně prostřednictvím hostitelské tkáně během parazitického stadia, zatímco přímý průnik látek přes kutikulu je obecně omezený (Perry & Moens 2013). Z fyzikálně-chemického hlediska vykazuje NTBC střední lipofilitu ($\log P \approx 2,3$, PubChem 2024), což ve srovnání s některými účinnými nematocidy (např. fluopyram, $\log P \approx 3,3$, PubChem 2024) naznačuje omezenou schopnost pasivního průniku přes kutikulární bariéru hlístic. Pasivní difuze látek přes kutikulu je limitována nejen lipofilitou, ale i velikostí molekuly a její polaritou. Z tohoto důvodu nelze očekávat, že by NTBC byl efektivně přijímán přímou expozicí (Ho et al. 1990). Dalším limitujícím faktorem je nutnost současné přítomnosti L-tyrosinu pro manifestaci sledovaného efektu (Turcelová 2023). Tyrosin je polární aminokyselina s nízkou lipofilitou,

kteřá neprochází pasivně lipidovými bariéry, a jeho příjem je proto vázán na aktivní transportní mechanismy nebo příjem potravy (Nelson & Cox 2017). Z těchto důvodů lze předpokládat, že účinná expozice *M. hapla* látkám NTBC a L-tyrosin je možná především prostřednictvím hostitelské rostliny. Tento způsob expozice představuje omezení pro přímé experimentální ovlivnění parazita, nicméně na molekulární úrovni lze účinek inhibitorů HPPD studovat nezávisle na hostitelském systému.

3.6.3 *Haemonchus contortus*

H. contortus neboli vlasovka slezová (řád Strongylida) je jedním z nejvýznamnějších gastrointestinálních parazitů malých přežvýkavců, napadá především ovce a kozy (Schwarz et al. 2013). Vývojový cyklus *H. contortus* je přímý bez účasti mezipřenositelů. Vajíčka parazita se vylučují do prostředí, kde se z nich vyvíjejí volně žijící larvy v několika stádiích (L1, L2 a L3). Při spasení trávy s infekčními stádii L3 se larvy dostávají do trávicího traktu hostitele, kde se přes stádium L4 vyvíjejí do dospělých jedinců. Dospělci jsou hematofágní a parazitují ve slezu hostitele. Aktivní sání krve způsobuje typické příznaky infekce, zejména anémii a celkové vyčerpání zvířete (Laing et al. 2013).

Genetická informace *H. contortus* byla sekvenována a sestavena v několika variantách pro různé izoláty a kmeny. Genom referenčního laboratorního kmene MHco3(ISE).N1 dosahuje velikosti 280–283 Mb a obsahuje přibližně 19 000 kódujících genů (Doyle et al. 2019; Zheng et al. 2024). Dřívější navržená sestava publikovaná pro kmen MHco3(ISE).N1 uváděla zhruba 23 000 genů (Schwarz et al. 2013), zatímco paralelní studie reportovala nižší hodnoty kolem 21 000 genů (Laing et al. 2013). Rozdíly v odhadech velikosti genomu a počtu genů souvisejí především s odlišnostmi mezi kmeny a postupným zlepšováním sekvenačních technologií. Novější přístupy, zejména dlouhočtecí sekvenování, umožnily vytvořit přesnější chromozomální sestavy, které lépe odrážejí skutečnou strukturu genomu (Gasser et al. 2016; Zheng et al. 2024). Podobně jako u modelového organismu *C. elegans* a fytoparazitické hlístice *M. hapla* je i v genomu *H. contortus* přítomen gen *hpd* kódující enzym HPPD (WormBase 2024). Tento druh tak představuje významný model pro studium účinku inhibitorů HPPD u parazitických hlístic veterinárního významu.

4 Metodika

Experimentální přístup byl přizpůsoben biologickým vlastnostem studovaných organismů a dostupnosti experimentálního materiálu. V případě modelového druhu *C. elegans* byl účinek nitisinonu sledován komplexně na úrovni celého organismu i v rámci molekulárních analýz. U fytoparazita *M. hapla* byly původně plánovány fenotypové experimenty, ty však znemožnila výrazná fytoxicita nitisinonu vůči hostitelským rostlinám. Studium tohoto druhu bylo soustředěno na molekulárně-biochemickou analýzu cílového enzymu. U druhu *H. contortus* nebylo možné experimentální část realizovat z důvodu nedostupnosti biologického materiálu. Tento druh byl však zahrnut do komparativní bioinformatické analýzy, která byla zaměřena na detailní srovnání proteinových sekvencí s cílem identifikovat konzervované domény.

4.1 Analýza alignmentu

Metoda vícenásobného sekvenčního zarovnání (multiple sequence alignment) byla použita k posouzení konzervace proteinu HPPD napříč vybranými organismy. Tento přístup umožňuje identifikovat homologní oblasti proteinů a posoudit zachování jednotlivých aminokyselin, které mohou být klíčové pro strukturální a funkční vlastnosti enzymu (Notredame 2007).

Jako výchozí sekvence byl zvolen protein HPPD kódovaný genem *hpd-1* u druhu *C. elegans*. Tato sekvence byla získána z databáze WormBase (Howe et al. 2017) a ve formátu „Conceptual translation“ použita jako vstupní dotaz v programu BLAST (Altschul et al. 1990). Výběr konkrétních organismů byl proveden se záměrem zahrnout zástupce z různých fylogenetických skupin, u nichž byl popsán nebo je předpokládán účinek NTBC. Na základě výsledků a procenta shodnosti byly do analýzy zařazeny následující taxonomické skupiny: hlístice (*Caenorhabditis elegans*, *Haemonchus contortus*, *Meloidogyne hapla*), ploštěnci (*Schistosoma mansoni*), členovci (*Ixodes ricinus*, *Anopheles stephensi*, *Dermanyssus gallinae*) a obratlovci (*Homo sapiens*). Kompletní proteinové sekvence byly exportovány ve formátu FASTA a dále zpracovány v programu MAFFT (Katoh et al. 2002). Výstup byl dále importován do programu Geneious Prime 2023 (Dotmatics), kde byla provedena vizuální úprava, kontrola homologních pozic a grafická finalizace výsledného alignmentu.

4.2 *Caenorhabditis elegans*

4.2.1 Fenotypové testy u *Caenorhabditis elegans*

Pro posouzení vlivu inhibitoru NTBC a L-tyrosinu u *C. elegans* (kmen N2, wild-type) byly provedeny experimenty zaměřené na hodnocení přežívání a reprodukční schopnosti jedinců. Pozorování probíhalo *in vitro* v Petriho miskách s agarovým živným médiem NGM (nematode growth medium), které umožňuje vhodné podmínky pro růst a udržování laboratorních kultur nematod. V průběhu několika dní byly pomocí stereoskopického mikroskopu sledovány zmíněné fenotypové projevy.

4.2.1.1 Kultivace *Caenorhabditis elegans*

Standardní kultivační médium NGM (200 ml) bylo připraveno smícháním 0,6 g NaCl, 3,4 g agaru, 0,5 g sójového peptonu a 195 ml dH₂O. Připravená směs byla sterilizována v autoklávu a poté temperována ve vodní lázni na teplotu přibližně 55 °C. Po ochlazení média byly asepticky přidány následující roztoky: 200 µl 1M CaCl₂, 200 µl 1M MgSO₄ a 200 µl cholesterolu (o koncentraci 5 mg/ml v 96% ethanolu). Následně bylo do média doplněno 5 ml 1M KPO₄ pufru a směs byla důkladně homogenizována. Hotové médium bylo dávkováno do Petriho misek o průměru 60 mm (10 ml) a po jeho ztuhnutí inokulováno suspenzí kmene *E. coli* OP50 v LB médiu (200 µl). Takto připravené misky byly ponechány 24 hodin při laboratorní teplotě (21 °C) pro vytvoření souvislého bakteriálního pokryvu (lawn). Pro udržení životaschopné kultury *C. elegans* byly hlístice pravidelně pasážovány na čerstvé misky s NGM a OP50 a uchovávány v inkubátoru při teplotě 20 °C. K transferu *C. elegans* byly vždy využity misky s přerostlou kulturou, ze kterých byl pomocí sterilního skalpelu vyříznut přibližně 1 cm² agarového média a přenesen na novou misku.

4.2.1.2 Synchronizace kultury *Caenorhabditis elegans*

Pro experiment byly použity synchronizované kultury *C. elegans* ve stádiu L4, které představuje poslední larvální stupeň před dosažením pohlavní dospělosti. Sjednání populace bylo nezbytné pro zajištění vývojové uniformity sledovaných jedinců a reprodukovatelnosti experimentálních podmínek.

Synchronizace byla provedena získáním embryí z těl dospělých jedinců metodou alkalické hypochloritové lýzy. Dospělci nesoucí embrya byli z kultivačních misek promyti 1000 µl pufru M9 do mikrozukmavky. Po krátké centrifugaci (5000 r.p.m., 30 s) bylo odpipetováno přebytečné množství supernatantu s ponecháním přibližně 350 µl suspenze. K sedimentu bylo přidáno 150 µl lyzačního roztoku (50 µl KOH, 100 µl hypochloritu), směs byla důkladně promíchána a ponechána 3–4 min. Během působení roztoku byla úspěšnost lýzy mikroskopicky kontrolována do okamžiku narušení těla dospělých jedinců a uvolnění embryí. Následně byla suspenze centrifugována (5000 r.p.m., 30 s) a supernatant opět odstraněn. Sediment obsahující embrya byl třikrát promyt pufr M9 pro odstranění zbytků chemického roztoku. Získaná embrya byla převedena na kultivační misky bez potravy a inkubována při teplotě 20 °C do následujícího dne. Vylíhlé larvy ve stádiu L1 byly přeneseny na nové misky

s OP50 a dále inkubovány za stejných podmínek po dobu 30–40 hodin do vývojového stádia L4.

4.2.1.3 Testy přežívání a reprodukce

Provedené testy vycházely z metody popsané v protokolu Panska et al. (2023). Jedinci *C. elegans* byly kultivovány na Petriho miskách o průměru 35 mm s 2,5 ml NGM média a 100 µl kultury OP50. Fenotypové testy byly realizovány ve čtyřech experimentálních skupinách podle přítomnosti testované látky: kontrolní skupina (bez přidaných látek), skupina s přídavkem L-tyrosinu, skupina s přídavkem NTBC a skupina kultivovaná v přítomnosti obou látek. L-tyrosin (zásobní roztok o koncentraci 100 mg/ml v 1M HCl) byl přidán do tekutého NGM média před vylitím do Petriho misek do finální koncentrace 1 mg/ml. NTBC byl rozpuštěn v PBS (fosfátovém pufru; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ a 1,8 mM KH₂PO₄) v koncentraci 600 mg/l. Tento roztok byl v objemu 100 µl napipetován do misky s tekutým NGM médiem a promíchám sterilní špičkou. Na každou připravenou misku byl přenesen jeden jedinec ve stádiu L4. Misky byly následně inkubovány při 22 °C. Po 24 hodinách (1. den) byl spočítán počet nakladených vajíček a vylíhnutých larev a samice byla přenesena na novou misku odpovídajícího složení. Tento postup byl opakován po dobu 4 dnů pro zachycení celého reprodukčního období samice.

Experiment byl proveden ve třech nezávislých biologických opakováních (sériích) se čtyřmi experimentálními skupinami (kontrola, L-tyrosin, NTBC, NTBC + L-tyrosin). V každé sérii byla použita nová skupina jedinců ze synchronizované kultury *C. elegans* a byly dodrženy stejné experimentální podmínky. Počet replikátů (jednotlivých misek) byl v prvních dvou sériích $n = 4$. Ve třetí sérii byl počet replikátů navýšen na $n = 5$ pro získání více dat a ověření výsledků. Celkový počet jedinců ($n = 13$) byl získán sloučením dat z jednotlivých sérií.

4.2.2 Molekulárně-biochemická analýza u *Caenorhabditis elegans*

Molekulárně-biochemický úsek práce byl zaměřen na přípravu rekombinantního proteinu a následnou verifikaci enzymatické aktivity HPPD. Pro získání zdrojové DNA byl využit expresní vektor pET-22b(+) s již zaklonovaným insertem genu *hpd-1* a *C31H2.4*. Tyto vektory byly připraveny a transformovány do bakteriálního kmene *E. coli* pLysS v rámci předchozích studií (Turcelová 2023) realizovaných na Katedře zoologie a rybářství (FAPPZ, ČZU v Praze). Praktická část zahrnovala PCR amplifikaci sekvence genu *hpd-1* a *C31H2.4*, purifikaci DNA, klonování do expresního vektoru pET SUMO a transformaci hostitelských buněk. Úspěšná transformace byla ověřena pomocí Colony PCR. Následně byla provedena indukce exprese rekombinantního proteinu a stanovena aktivita enzymu HPPD pomocí kolorimetrické esaje.

4.2.2.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) představuje laboratorní metodu používanou k cílenému namnožení definovaného fragmentu DNA. Princip spočívá v opakovaných cyklech zahřívání a ochlazování reakční směsi, během nichž dochází k rozvolnění dvoušroubovice

DNA, navázání specifických primerů na templát a následné syntéze komplementárního řetězce pomocí termostabilní DNA polymerázy. Reakční směs obsahuje templátovou DNA, forward a reverse primery, DNA polymerázu, směs deoxynukleotidů a vhodný reakční pufr (Mullis et al. 1986).

Pro PCR byly použity primery uvedené v Tabulce 1.

Tabulka 1: Sekvence primerů pro PCR reakci.

Primer	Sekvence (5'→3')
HPD-1_pET-SUMO_fwd	ATGACTACATTTCGACAAAGGAGC
HPD-1_pET-SUMO_rev	TTACTTAGTATTTCCATCCTTAACATTATC
Primer C31H2.4	Sekvence (5'→3')
C31H2.4_pETSUMO_fwd	ATGGGTTC AATTTCTGCAATTCATCAC
C31H2.4_pETSUMO_rev	TCAAAAAAGGGTCCACGCTTTTC

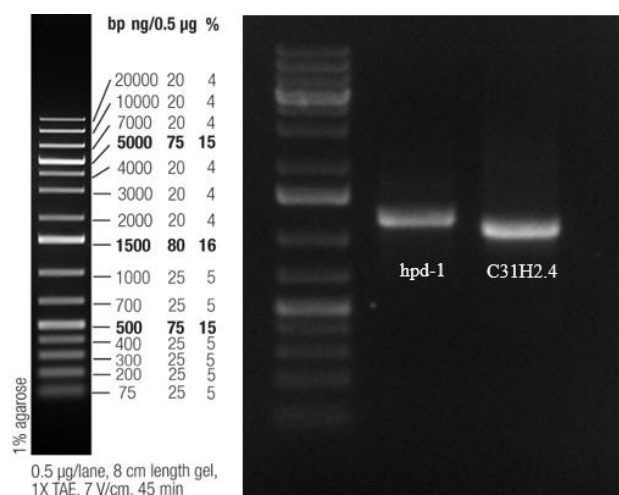
Ze zdrojových bakteriálních kolonií byla izolována plazmidová DNA pomocí GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) podle protokolu výrobce, která byla následně použita pro PCR amplifikaci cílové sekvence genu *hpd-1* a *C31H2.4*. PCR reakce byla připravena v celkovém objemu 50 µl s použitím 25 µl PCR Master Mix DreamTaq (Thermo Fisher Scientific), 1 µl templátové DNA v plazmidu pET-22b(+), 1 µl forward primerů, 1 µl reverse primerů a 22 µl dH₂O. Cyklus probíhal v termocykleru s nastaveným programem uvedeným v Tabulce 2.

Tabulka 2: Teplotní a časový profil PCR reakce.

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Predenaturace	95	3:00	1x
Denaturace	95	0:30	40x
Annealing	52	0:30	
Elongace	72	1:30	
Finální elongace	72	5:00	1x
Uchování	10	∞	—

4.2.2.2 Analýza výsledků PCR

PCR produkt byl analyzován elektroforézou v 1% agarózovém gelu v TAE pufru. Do gelu byl přidán ethidium bromid umožňující vizualizaci DNA fragmentů při prosvícení UV transluminátorem. Pro kontrolu velikosti amplifikované sekvence byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), čímž byla ověřena přítomnost fragmentu odpovídající velikosti (Obrázek 3). DNA byla z agarózového gelu extrahována pomocí Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) podle protokolu výrobce. Koncentrace purifikované DNA byla zkontrolována pomocí mikrospektrofotometru NanoDrop.



Obrázek 3: Vlevo velikostní DNA stupnice GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), vpravo elektroforetická analýza PCR produktu genu *hpd-1* (~1182 bp) a *C31H2.4* (~1175) u *C. elegans*.

4.2.2.3 Klonování do expresního vektoru a transformace buněk

Purifikované PCR produkty byly zaklonovány do expresního vektoru pET SUMO podle doporučení výrobce (Thermo Fisher Scientific). Proces byl založen na principu TA klonování, kdy PCR produkt předem amplifikovaný Taq DNA polymerázou nesl na 3' koncích adeninové nukleotidy, které umožnily jeho navázání na linearizovaný vektor pET SUMO s komplementárními 3' thyminovými přesahy.

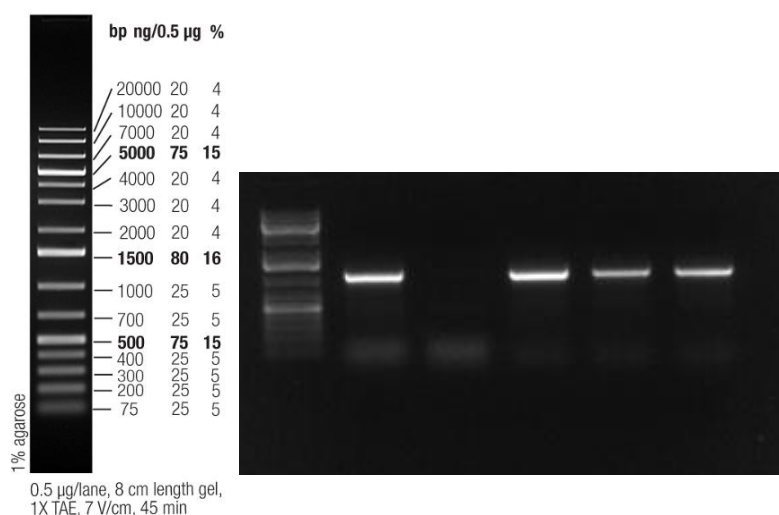
Ligační směs byla připravena v objemu 10 µl smícháním 3 µl PCR produktu, 1 µl T4 ligačního pufru, 2 µl pET SUMO vektoru, 1 µl T4 DNA ligázy a 3 µl dH₂O. Ligační reakce trvala 4 h při 15 °C. Vektor byl následně transformován do hostitelských expresních buněk *E. coli* BL21(DE3) metodou tepelného šoku, při níž krátkodobé zvýšení teploty vede k přechodnému zvýšení permeability buněčné membrány a umožňuje vstup plasmidové DNA (Hanahan 1983). Za účelem regenerace byly transformované buňky nejprve 1 h inkubovány v SOC médiu (0,5 % kvasničný extrakt, 2 % trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukóza) na třepačce při 37 °C a 225 r.p.m. Poté byly naneseny na LB agarové plotny (LB agar: 10 g trypton, 5 g kvasničný extrakt, 10 g NaCl, 15 g agar na 1 l; pH 7,0) se selektivním antibiotikem kanamycinem (v médiu ve finální koncentraci 50 µg/mL). Po 16 h inkubace při 37 °C byly kolonie otestovány pomocí Colony PCR na přítomnost insertu a následně uchovávány při 8 °C. Sekvence primerů použité pro studované geny jsou Pro oba studované geny (*hpd-1* a *C31H2.4*) byl použit vektorový primer a specifické genové primery, jejichž sekvence jsou uvedeny v Tabulce 3. Teplotní a časový profil byl pro obě reakce shodný (Tabulka 4). Úspěšná amplifikace byla potvrzena gelovou elektroforézou. V případě genu *hpd-1* byl detekován produkt o velikosti 1182 bp (Obrázek 4), u genu *C31H2.4* byl potvrzen produkt o velikosti 1175 bp (Obrázek 5).

Tabulka 3: Sekvence primerů pro Colony PCR.

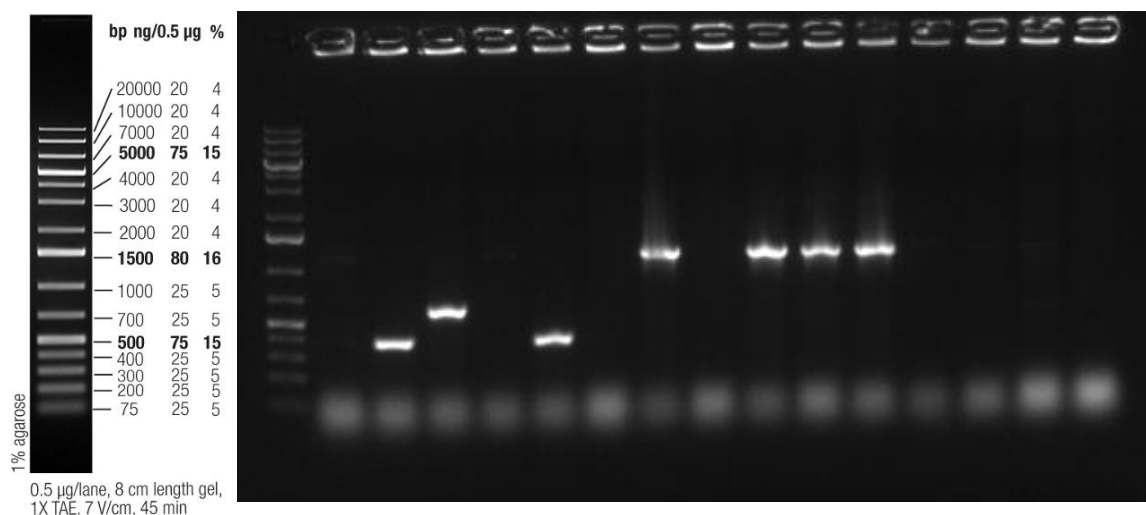
Primer hpd-1	Sekvence (5'→3')
SUMO Forward	AGATTCTTGTACGACGGTATTAG
HPD-1_pETSUMO_rev	TTACTTAGTATTTCCATCCTTAACATTATC
Primer C31H2.4	Sekvence (5'→3')
SUMO Forward	AGATTCTTGTACGACGGTATTAG
C31H2.4_pETSUMO_rev	TCAAAAAAGGGTTCCACGCTTTTC

Tabulka 4: Teplotní a časový profil Colony PCR.

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Predenaturace	95	3:00	1x
Denaturace	95	0:30	40x
Annealing	55	0:30	
Elongace	72	1:30	
Finální elongace	72	5:00	1x
Uchování	10	∞	—



Obrázek 4: Vlevo velikostní DNA stupnice GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), vpravo elektroforetická analýza produktu Colony PCR z transformovaných bakteriálních kolonií s insertem hpd-1 z *C. elegans* (~1182 bp).



Obrázek 5: Vlevo velikostní DNA stupnice GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), vpravo elektroforetická analýza produktu Colony PCR z transformovaných bakteriálních kolonií s insertem C31H2.4 z *C. elegans* (~1175 bp).

Z vybraných transformovaných kolonií byl izolován plazmid pomocí GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) a odeslán k sekvenování za účelem ověření přítomnosti cílového genu *hpd-1* a *C31H2.4*. Analýza potvrdila přítomnost insertů odpovídající očekávané sekvenci a ověřené bakteriální kolonie byly následně použity pro expresi rekombinantního proteinu a kolorimetrickou esej.

4.2.2.4 Kolorimetrická esej

Za účelem sledování inhibičního účinku NTBC na aktivitu enzymu HPPD byla provedena kolorimetrická esej podle Neuckermans et al. (2019). Pozitivní bakteriální kolonie BL21(DE3) nesoucí rekombinantní plazmid pET SUMO byly použity pro přípravu reakčního média s 5 ml LB a 5 µl kanamycinu a inkubovány přes noc na třepačce (37 °C, 225 r.p.m.). Z připravené suspenze bylo následně odebráno 0,5 ml bakteriální kultury, která byla přenesena do 100 ml čerstvého LB média a opět ponechána na třepačce za stejných podmínek. Tímto způsobem byly připraveny dvě paralelní kultury. Růst bakterií byl průběžně sledován měřením optické denzity až do hodnoty $OD_{600} = 0,6$. Po dosažení požadované hustoty bylo do obou kultur přidáno IPTG do finální koncentrace 1mM pro indukci exprese rekombinantního proteinu a 75 mg L-tyrosinu (finální koncentrace 0,75 mg/ml) sloužícího jako substrát reakce. Do jedné z kultur bylo současně doplněno 237 µl NTBC (finální koncentrace 5µM), zatímco druhá kultura sloužila jako kontrola bez inhibitoru.

Připravené kultury byly inkubovány na třepačce při 37 °C do následujícího dne. Po inkubaci bylo sledováno zbarvení jednotlivých kultur. Princip metody vycházel z bakteriální přeměny L-tyrosinu na 4-hydroxyfenylpyruvát (HPP), který slouží jako substrát pro exprimovaný HPPD. Vznikající kyselina homogentisová (HGA) je za fyziologických podmínek dále štěpena enzymem homogentisát 1,2-dioxygenázou (HGD) na maleylacetoacetát. Při zvýšené produkci HGA v důsledku exprese rekombinantního enzymu však kapacita tohoto kroku není dostatečná, což vede k akumulaci HGA. Ta následně spontánně oxiduje a polymeruje za vzniku pigmentu pyomelaninu, který způsobuje hnědé zbarvení kultury

(ochronózu). V přítomnosti inhibitoru NTBC měla být aktivita enzymu HPPD snížena nebo zcela blokována, což by vedlo k omezení tvorby HGA a následně snížení intenzity zbarvení, případně jeho absenci. Očekávaným výsledkem experimentu bylo rozdílné zbarvení kultur v závislosti na přítomnosti inhibitoru. Tvorba hnědého pigmentu měla indikovat aktivitu enzymu HPPD, zatímco snížení intenzity zbarvení v přítomnosti NTBC mělo odpovídat inhibici enzymové aktivity.

4.3 *Meloidogyne hapla*

4.3.1 Fenotypové testy u *Meloidogyne hapla*

Před zahájením vlastních fenotypových testů byly provedeny pilotní testy fytotoxicity zaměřené na posouzení vlivu NTBC na klíčivost a raný vývoj modelových a hostitelských rostlin. Cílem bylo ověření, zda testované podmínky umožní vytvoření funkčního hostitelského systému pro následné experimenty.

4.3.1.1 Pilotní testy fytotoxicity

Experimentální práce byla zahájena testy klíčivosti. Jako indikátorová rostlina byla použita řeřicha setá (*Lepidium sativum* L.), běžně využívaná v testech fytotoxicity. Jako hostitelské rostliny hlístice *M. hapla* byly zvoleny okurka setá (*Cucumis sativus* L.) a rajče jedlé (*Solanum lycopersicum* L.).

Test klíčivosti řeřichy seté byl proveden podle upraveného protokolu Plíva et al. (2006). Semena byla umístěna do sterilních Petriho misek (Ø 6 cm) vyložených filtračním papírem. Do každé misky bylo umístěno 10 semen, přičemž pro každou variantu bylo připraveno 5 replikátů (celkem 50 semen). Na každou misku byl aplikován 1 ml testované látky. Misky byly utěsněny parafilmovou fólií a inkubovány při 20 °C ve tmě po dobu 3 dnů.

Testy klíčivosti okurky seté a rajčete jedlého vycházely z protokolu Ibáñez & Blázquez (2020). Semena byla umístěna do větších sterilních Petriho misek (Ø 9 cm) s filtračním papírem (10 semen/miska, 5 replikátů). Do každé misky byly následně přidány 4 ml dané látky. Zaparafilmované misky byly inkubovány při 25 °C ve tmě po dobu 8 dnů. Hodnocení klíčivosti probíhalo 5. a 8. den.



Obrázek 6: Rozmístění semen řeřichy seté (*Lepidium sativum* L.) (foto: autorka).

Testované varianty látek zahrnovaly dH₂O (kontrola 1), PBS (kontrola 2) a roztoky NTBC (v PBS) o koncentracích 600 mg/l, 100 mg/l a 10 mg/l. Za vyklíčené bylo považováno semeno, u něhož délka radikuly přesáhla 1 mm. Klíčivost byla vyjádřena jako konečné procento klíčivosti (Final Germination Percentage, FGP) podle vztahu $FGP = (n / N) \times 100$, kde *n* představuje počet vyklíčených semen a *N* celkový počet semen na začátku experimentu (Kader 2005).

V případě zachování dostatečné klíčivosti rostlin bylo plánováno pokračovat aplikací NTBC do kultivačního média a sledovat růstové parametry hostitelských rostlin. Současně bylo uvažováno o stanovení akumulace NTBC v rostlinné tkáni pomocí LC-MS. Na základě vyhodnocení testů klíčivosti (viz kap. 5.4) nebylo přistoupeno k dalším experimentům fyto toxicity. Jelikož testované podmínky neumožňovaly udržení životaschopného hostitelského systému, nebyly realizovány ani následné fenotypové testy u *M. hapla* a další část práce byla zaměřena na molekulárně-biochemickou analýzu tohoto organismu.

4.3.2 Molekulárně-biochemická analýza u *Meloidogyne hapla*

Molekulárně-biochemická část práce byla zaměřena na klonování genu *hpd* a následné ověření aktivity enzymu HPPD. Původním záměrem bylo získání cílové sekvence genu *hpd* z přirozené populace *M. hapla*. Bylo odebráno 17 půdních vzorků o hmotnosti 1 kg v oblasti Lysá nad Labem – Litol, ze kterých byla flotačně-centrifugační metodou podle standardu EPPO PM 7/119 (2013) extrahována juvenilní stádia *M. hapla*. Izolovaní jedinci měli sloužit k namnožení populace na hostitelských rostlinách za účelem získání dospělých stádií. Z důvodu omezeného množství biologického materiálu v odebraných vzorcích nebylo možné tento postup realizovat, a proto byla zvolena alternativní experimentální strategie s využitím syntetického genu.

Experimentální postup zahrnoval identifikaci sekvence genu *hpd*, návrh primerů a získání syntetického genu. Následovala amplifikace cílové sekvence metodou PCR, purifikace DNA a klonování do expresního vektoru pET SUMO. Rekombinantní vektor byl transformován do hostitelských bakteriálních buněk a byla indukována exprese rekombinantního proteinu. Aktivita enzymu HPPD byla následně sledována pomocí kolorimetrické esaje.

Metodický postup molekulárně-biochemické analýzy u organismu *M. hapla* probíhal obdobně jako analýza u prvního studovaného organismu *C. elegans* (kap. 4.2.2). S ohledem na omezení duplicitních popisů jsou v následujícím textu uvedeny odkazy na předchozí kapitoly.

4.3.2.1 Syntetický gen

Sekvence genu *hpd* kódujícího HPPD u *M. hapla* byla identifikována v databázi WormBase (Howe et al. 2017) pomocí metody BLAST (Altschul et al. 1990) pod označením MhA1_Contig388.frz3.gene13. Na základě této sekvence byl od společnosti Integrated DNA Technologies (IDT) dodán syntetický gen v klonovacím vektoru pUCIDT-AMP nesoucím rezistenci k ampicilinu. Délka insertu činila 1176 bp. Dodaný plazmid byl použit jako templát pro PCR amplifikaci cílového genu.

4.3.2.2 Návrh primerů a PCR

Primery pro amplifikaci sekvence genu *hpd* byly navrženy pomocí nástroje NCBI Primer-BLAST (Ye et al. 2012) a následně upraveny se zohledněním počtu bp, teploty tání, CG obsahu a dalších základních parametrů pomocí programu Oligo Calc (Kibbe 2007). Navržené primery jsou uvedené v Tabulce 5.

Tabulka 5: Sekvence primerů pro PCR reakci.

Primer	Sekvence (5'→3')
HPD_fwd	ATGAAAAACGGAAAAAAGGAAGGAG
HPD_rev	TTAACATATTTTCTCAACTTTTCCCCC

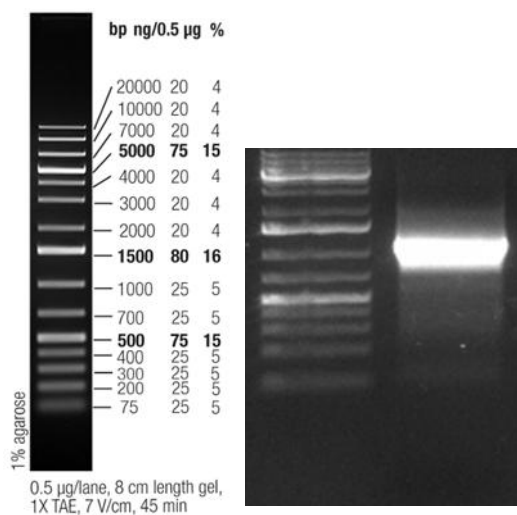
Dodaný plasmid byl resuspendován dle doporučení výrobce (IDT) a následně použit jako templát pro PCR. Reakční směs o celkovém objemu 50 µl obsahovala 25 µl PCR Master Mix DreamTaq (Thermo Fisher Scientific), 1 µl templátové plazmidové DNA, 1 µl forward primerů, 1 µl reverse primerů a 22 µl dH₂O. Amplifikace byla realizována v termocykleru s nastaveným programem viz Tabulka 6.

Tabulka 6: Teplotní a časový profil PCR reakce.

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Predenaturace	95	3:00	1x
Denaturace	95	0:30	40x
Annealing	55	0:30	
Elongace	72	1:30	
Finální elongace	72	5:00	1x
Uchování	10	∞	—

4.3.2.3 Analýza výsledků PCR

Analýza PCR produktu, gelová extrakce (Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit, Geneaid) i následná kontrola koncentrace purifikované DNA na přístroji NanoDrop probíhala shodně s postupem popsáním v kapitole 4.2.2.2. Pro vizualizaci fragmentů byl opět využit 1% agarózový gel s ethidium bromidem a velikost fragmentu byla ověřena pomocí markeru GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), viz Obrázek 7.



Obrázek 7: Vlevo velikostní DNA stupnice GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), vpravo elektroforetická analýza PCR produktu genu *hpd* u *M. hapla* (~1176 bp).

4.3.2.4 Klonování a transformace buněk

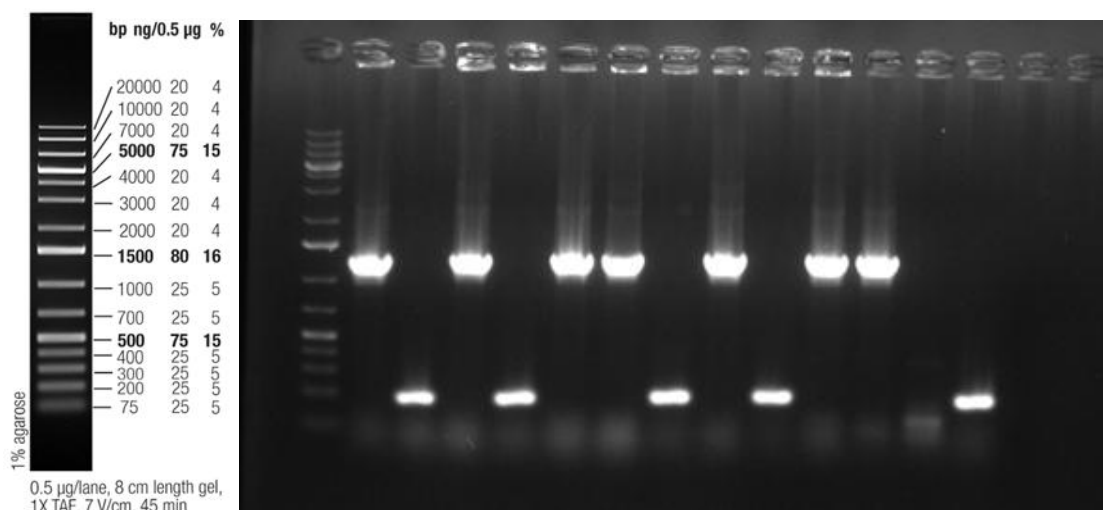
Vzhledem k nižší nákladovosti a snazší manipulaci byly purifikované PCR produkty nejprve zaligovány do linearizovaného vektoru pJET1.2. Reakce byla ponechána 15 min při pokojové teplotě (21 °C). Vektor byl dále transformován metodou tepelného šoku do kompetentních bakterií XL-1 Blue, kmene *E. coli*, za účelem vytvoření stabilní zásoby pro případné opakované využití plazmidové DNA. Transformované bakterie byly nanесeny na LB plotny obsahující ampicilin (v médiu ve finální koncentraci 100 µg/mL) a inkubovány 16 h při 37 °C. U vybraných kolonií byla otestována přítomnost insertu pomocí Colony PCR (Tabulka 7-8, Obrázek 8).

Tabulka 7: Sekvence primerů pro Colony PCR.

Primer	Sekvence (5'→3')
pJET1.2 sequencing primer_fwd	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2 sequencing primer_rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

Tabulka 8: Teplotní a časový profil Colony PCR.

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Predenaturace	95	3:00	1x
Denaturace	95	0:30	40x
Annealing	55	0:30	
Elongace	72	1:30	
Finální elongace	72	5:00	1x
Uchování	10	∞	—



Obrázek 8: Vlevo velikostní DNA stupnice GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), vpravo elektroforetická analýza produktu Colony PCR z xl-1 kolonií s insertem *hpd* z *M. hapla* (~1176 bp).

Plasmidová DNA získaná z pozitivních kolonií pomocí GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) byla odeslána k sekvenování za účelem potvrzení přítomnosti genu *hpd*. Z ověřených kolonií byla připravena zásobní kultura v glycerolu, která byla uchovávána při -80 °C.

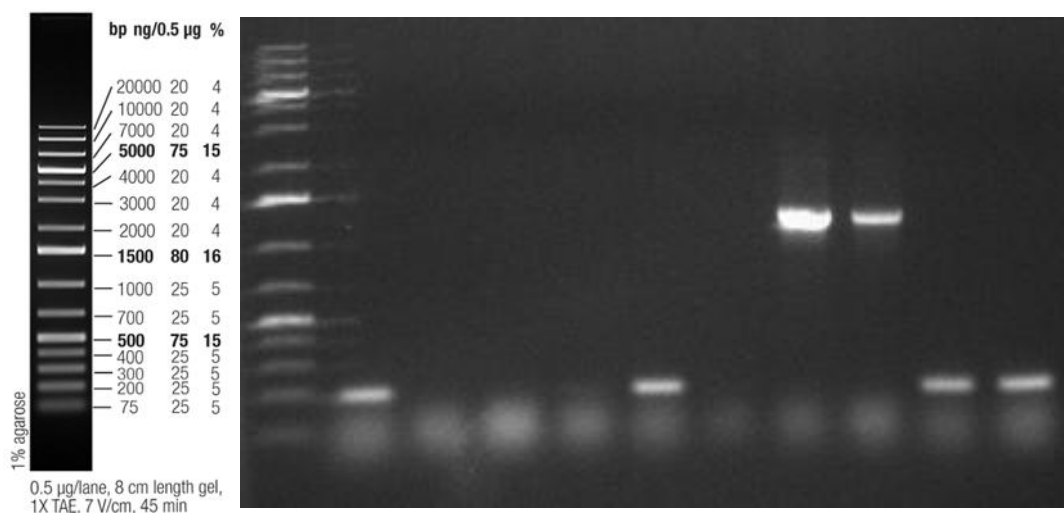
Purifikované PCR produkty byly rovněž zaklonovány do expresního vektoru pET SUMO (TA klonování a složení reakční směsi viz kap. 4.2.2.3). Ligační reakce probíhala 4 h při 15 °C. K transformaci byly použity hostitelské expresní bakterie *E. coli* BL21(DE3), do kterých byla DNA vpravena metodou tepelného šoku. Bakterie byly regenerovány v SOC médiu na třepačce (1 h, 37 °C, 225 r.p.m.) a následně selektovány na LB agaru s kanamycinem (v médiu ve finální koncentraci 50 µg/mL). Po 16 h inkubace při 37 °C byla u narostlých kolonií ověřena přítomnost insertu pomocí Colony PCR (Tabulka 9-10, Obrázek 9). Kolonie byly následně skladovány při 8 °C.

Tabulka 9: Sekvence primerů pro Colony PCR.

Primer	Sekvence (5'→3')
SUMO Forward	AGATTCTTGTACGACGGTATTAG
HPD_rev	TTAACATATTTTCTCAACTTTTCCCCC

Tabulka 10: Teplotní a časový profil Colony PCR.

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Predenaturace	95	3:00	1x
Denaturace	95	0:30	40x
Annealing	55	0:30	
Elongace	72	1:30	
Finální elongace	72	5:00	1x
Uchování	10	∞	—



Obrázek 9: Vlevo velikostní DNA stupnice GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), vpravo elektroforetická analýza produktu Colony PCR z BL21(DE3) kolonií s insertem *hpd* z *M. hapla* (~1176 bp).

Z pozitivních kolonií byl pomocí GenElute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) připraven plasmid, který byl odeslán sekvenační analýze. Správnost sekvence insertu byla potvrzena a vybrané kolonie byly použity k expresi rekombinantního proteinu.

4.3.2.5 Kolorimetrická esej

Kolorimetrická esej pro sledování inhibice aktivity enzymu HPPD byla provedena podle Neuckermans et al. (2019). Experiment u *M. hapla* probíhal shodně s postupem použitým pro *C. elegans* (kap. 4.2.2.4) za použití vektoru pET SUMO, expresních buněk BL21(DE3) a za stejných experimentálních podmínek. Byly připraveny dvě paralelní kultury, z nichž jedna obsahovala NTBC (finální koncentrace 5 µM), zatímco druhá sloužila jako kontrola bez inhibitoru. Po inkubaci bylo hodnoceno zbarvení kultur, přičemž vznik hnědého pigmentu měl svědčit o aktivitě enzymu HPPD, zatímco snížení intenzity zbarvení v přítomnosti NTBC mělo indikovat inhibici enzymové aktivity.

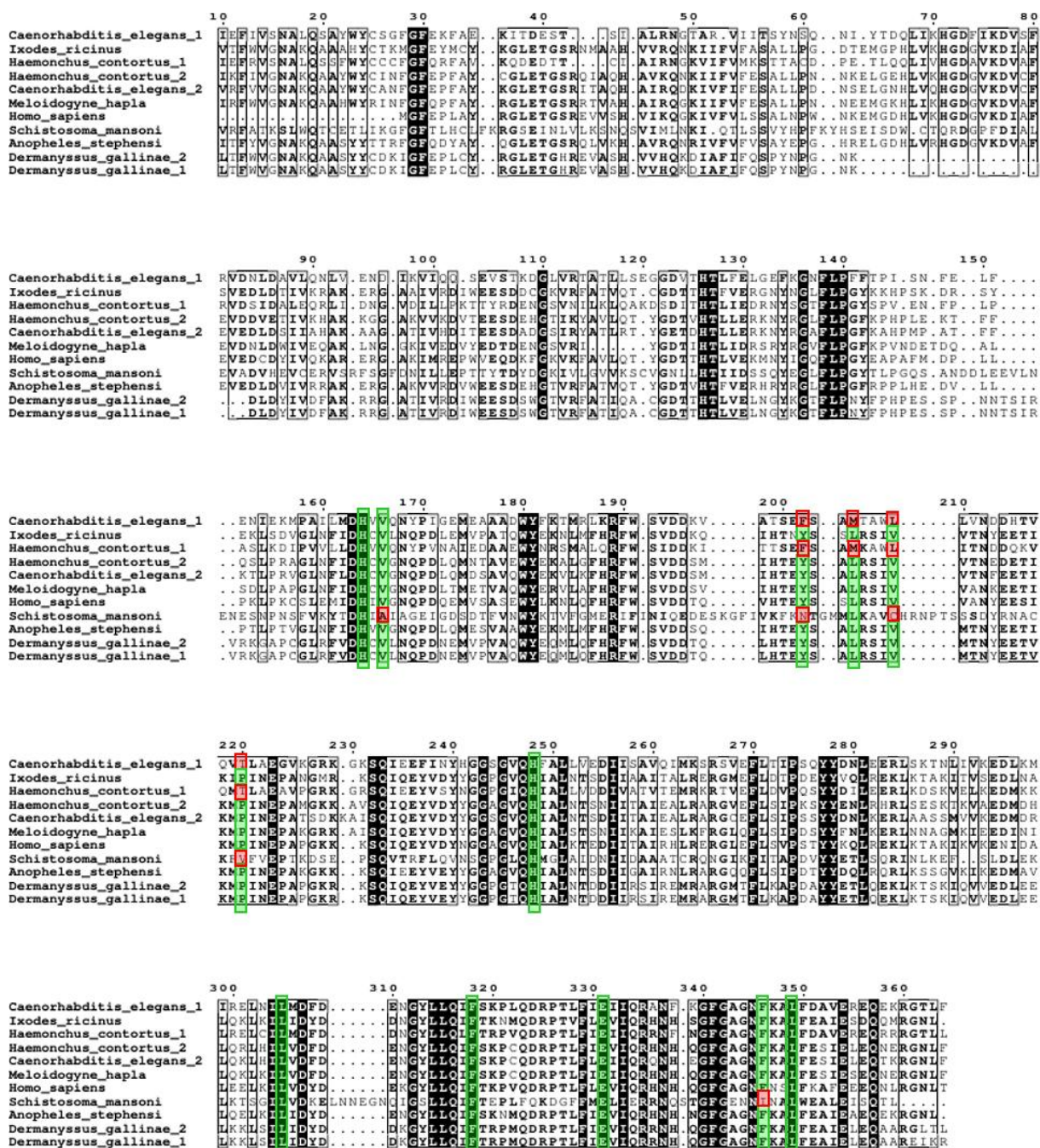
4.4 *Haemonchus contortus*

V případě parazita *H. contortus* nebylo možné laboratorní experimenty realizovat. Hlavním limitem byla absence použitelného biologického materiálu na domovském pracovišti (Katedra zoologie a rybářství, FAPPZ, ČZU) a komplikace při předchozích pokusech, kdy se z izolované cDNA nepodařilo amplifikovat gen *hpd* (zejména z důvodu kontaminace vzorků). Vzhledem k výsledkům kolorimetrických esejí u ostatních dvou studovaných organismů (kap. 5.3 a 5.5) byla objednávka syntetického genu vyhodnocena jako neefektivní. Těžiště studia u tohoto druhu se přesunulo k rozsáhlé komparativní bioinformatické analýze. Tato analýza umožnila hlubší srovnání proteinových sekvencí (multiple sequence alignment) a predikci vlastností enzymu HPPD.

5 Výsledky

5.1 Výsledky analýzy alignmentu

Pro posouzení míry konzervace cílového proteinu HPPD a predikci citlivosti vybraných organismů k inhibitoru NTBC byla vypracována komparativní analýza 11 proteinových sekvencí. Ve výsledném alignmentu byly patrné konzervované oblasti sdílené mezi druhy, zejména úseky odpovídající aktivnímu místu enzymu (Obrázek 10).



Obrázek 10: Alignment sekvencí proteinu HPPD.

Vícenásobné sekvenční porovnání se zaměřilo na identifikaci aminokyselinových zbytků, které tvoří aktivní místo enzymu, tj. vhodné prostředí pro uchycení inhibitoru. Nejdůležitějším zjištěním byla absolutní konzervace katalytické triády tvořené rezidui His183, His266 a Glu349. Tato kombinace je zásadní pro koordinaci železnatého iontu (Fe^{2+}) a následnou přímou vazbu NTBC (Lin et al. 2019). Stoprocentní identita této triády potvrzuje, že základní aparát pro koordinaci kofaktoru je zachován bez ohledu na taxonomickou příslušnost organismu.

Další část analýzy se soustředila na aminokyseliny Tyr221 a Leu224, které představují klíčové determinanty určující selektivní vazebnou afinitu inhibitoru k enzymu HPPD. Studie prokázaly, že jejich experimentální mutace na alanin vede k dramatickému poklesu schopnosti NTBC vázat se do aktivního místa (Liu et al. 2020). V rámci alignmentu byla tato rezidua potvrzena jako konzervovaná u většiny studovaných druhů, avšak významné odchylky byly identifikovány u ploštěnce *S. mansoni* a u specifických sekvencí hlístic *C. elegans* 1 (protein C31H2.4) a *H. contortus* 1. Zjištěné substituce v místech zodpovědných za afinitu mohou naznačovat sníženou citlivost těchto proteinů k působení inhibitoru.

Pro stabilitu komplexu enzym-inhibitor jsou dále podstatné hydrofobní interakce se strukturou cyklohexanového kruhu NTBC, které zajišťují Val185, Val228 a Pro239 (Lin et al. 2019). Analýza ukázala, že pozice Val185 je shodná u všech sledovaných zástupců s výjimkou druhu *S. mansoni*. U zbývajících dvou pozic, Val228 a Pro239, vykazovaly sekvence *S. mansoni*, *C. elegans* 1 a *H. contortus* 1 aminokyselinové záměny, což opět poukazuje na odlišné uspořádání vnitřního prostoru aktivního místa u těchto zástupců.

Poslední sledovanou oblastí byla vazebná místa pro trifluoromethyl skupinu NTBC a methylsulfonyl skupiny herbicidních inhibitorů, jako jsou sulcotrion a mesotrion. Tuto funkci plní rezidua Leu323, Leu367, Phe336 a Phe364 (Lin et al. 2019, Liu et al. 2020). První tři jmenované aminokyseliny byly zcela shodné v rámci celého souboru sekvencí. Jedinou výjimku v této oblasti představovala pozice Phe364 u druhu *S. mansoni*.

Při celkovém pohledu na alignment vykazovala sekvence *C. elegans* 2 (produkt genu *hpd-1*) v aktivním místě shodu s lidským modelem i s většinou ostatních vybraných druhů.

5.2 Výsledky testů přežívání a reprodukce *Caenorhabditis elegans*

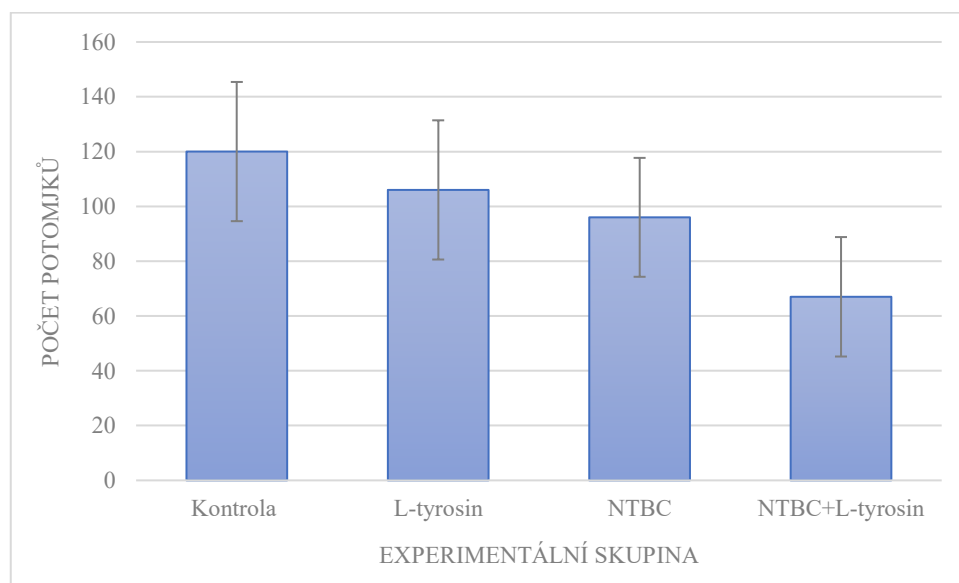
Byly provedeny tři biologické opakování (série) se čtyřmi testovanými variantami (kontrola, L-tyrosin, NTBC, NTBC + L-tyrosin). Data z jednotlivých experimentů byla analyzována pomocí jednofaktorové analýzy variance (ANOVA, $\alpha = 0,05$) a pro následná párová srovnání mezi skupinami byl použit dvouvýběrový t-test ($\alpha = 0,05$). Vzhledem k vícenásobnému porovnávání byla aplikována Bonferroniho korekce a upravená hladina statistické významnosti byla stanovena na $\alpha = 0,0083$. Statistické analýzy byly provedeny v programu Microsoft Excel (Microsoft 365). Souhrnné výsledky jsou prezentovány níže. Kompletní přehled dat včetně denního počtu nakladených vajíček, počtu vylíhnutých larev a přežívání samic je uveden v přílohách (Příloha 1).

5.2.1 Reprodukce *Caenorhabditis elegans*

Ve všech experimentálních skupinách byl průběh reprodukce obdobný. Nejvyšší produkce potomků byla zaznamenána během druhého dne experimentu, zatímco ve čtvrtém dni došlo k výraznému poklesu reprodukce. Po sloučení dat ze tří sérií byl nejvyšší průměrný celkový počet potomků zjištěn v kontrolní skupině. Naopak nejnižší reprodukce byla pozorována ve skupině s kombinací NTBC a L-tyrosinu (Tabulka 11). Celkové průměrné hodnoty reprodukce jsou znázorněny prostřednictvím Grafu 1.

Tabulka 11: Reprodukce a přežívání samic *C. elegans*. Průměrné počty potomků označené odlišnými písmeny se mezi sebou statisticky významně liší (ANOVA, párové t-testy s Bonferroniho korekcí; $\alpha = 0,0083$).

Skupina	n	Celkový počet potomků (průměr $\pm$ SD)	Počet přežívajících samic (4. den)
Kontrola	13	120 $\pm$ 25,4 a	13
L-tyrosin	13	106 $\pm$ 25,4 a	9
NTBC	13	96 $\pm$ 21,7 a	10
NTBC + L-tyrosin	13	67 $\pm$ 21,8 b	5



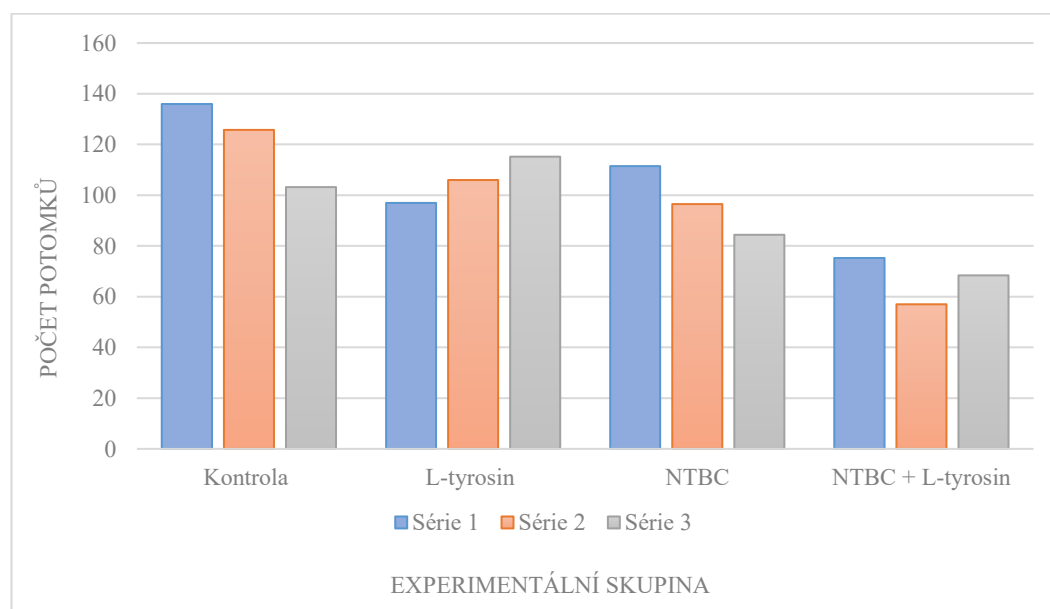
Graf 1: Průměrný celkový počet potomků *C. elegans* během čtyřdenního reprodukčního období.

Mezi sledovanými skupinami byly zjištěny vysoké statisticky významné rozdíly (ANOVA, $p < 0,001$). Následná párová porovnání s Bonferroniho korekcí ($\alpha = 0,0083$) ukázala, že skupina NTBC + L-tyrosin se statisticky významně liší od ostatních skupin. Konkrétně byly zaznamenány následující rozdíly:

- kontrola vs. NTBC + L-tyrosin ($p = 7,58 \times 10^{-6}$),
- L-tyrosin vs. NTBC + L-tyrosin ($p = 0,0003$),
- NTBC vs. NTBC + L-tyrosin ($p = 0,0020$).

Naproti tomu mezi kontrolní skupinou, skupinou L-tyrosin a skupinou NTBC nebyly při vzájemném porovnání zjištěny žádné statisticky významné rozdíly.

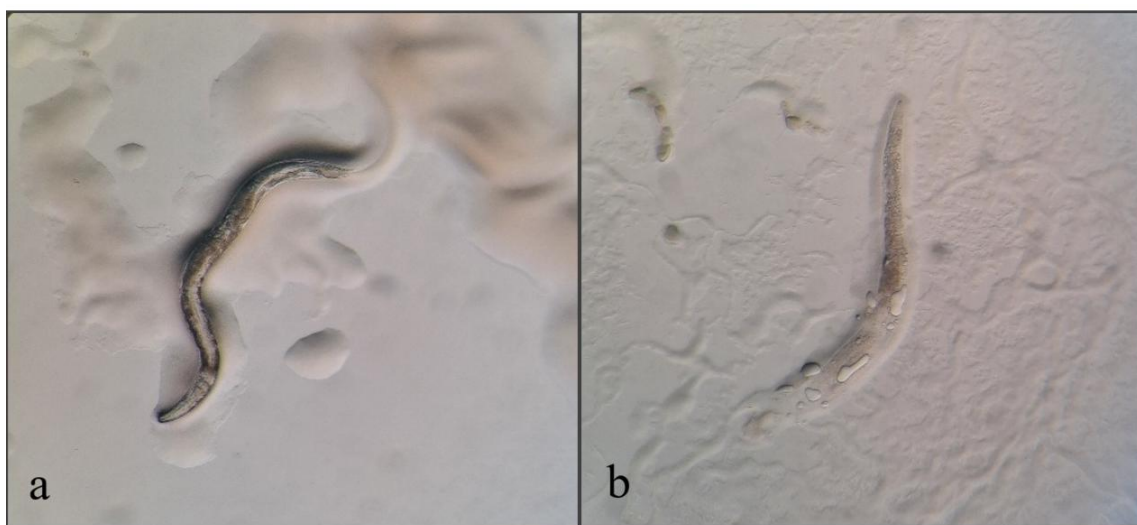
Při podrobném vyhodnocení reprodukčních parametrů byla napříč všemi sledovanými skupinami patrná značná individuální variabilita mezi jednotlivými samicemi. Tento rozptyl hodnot nebyl omezen pouze na vnitřní variabilitu v rámci jedné skupiny, ale projevoval se rovněž při srovnání výsledků mezi jednotlivými časově oddělenými sériemi experimentu. Rozdíly mezi těmito sériemi, které jsou znázorněny v Grafu 2, zahrnovaly jak odchylky v průměrných hodnotách celkového počtu potomků, tak i proměnlivost v relativním pořadí úspěšnosti ostatních experimentálních skupin. Navzdory uvedeným rozdílům však získaná data vykazují jeden vysoce stabilní a konzistentní trend. Ve všech sériích byla zaznamenána nejnižší úroveň reprodukce u skupiny s kombinací NTBC a L-tyrosinu. Tento pokles byl natolik dominantní, že jej neovlivnila ani kolísavá úspěšnost kontrolních skupin či jiných testovaných variant, a ukazuje, že vliv kombinace NTBC a L-tyrosinu na reprodukční schopnosti není náhodným jevem.



Graf 2: Souhrn průměrného celkového počtu potomků *C. elegans* během čtyřdenního reprodukčního období ve třech biologických opakováních (sériích).

5.2.2 Přežívání samic *Caenorhabditis elegans*

Během čtyřdenního experimentu byly sledovány rozdíly v odolnosti jednotlivých dospělců vůči testovaným látkám. Zatímco u kontrolní skupiny byla zaznamenána 100% míra přežití po celou dobu experimentu, u ostatních skupin došlo k narušení vitality a úhynu jedinců (Obrázek 11). Ve skupině s L-tyrosinem došlo k úhynu 4 samic (30,8 %), a to převážně v druhé polovině sledovaného období (3. a 4. den). Ve skupině s NTBC uhynuly 3 samice (23,1 %), přičemž všechny tyto úhyny nastaly shodně až poslední den experimentu. Zcela nejvyšší mortalita byla sledována ve skupině NTBC + L-tyrosin, kde experiment nepřežilo 8 ze 13 samic (61,5 %). U této skupiny docházelo k úhynům již druhý den, což vysvětluje nízké hodnoty celkové reprodukce.



Obrázek 11: Reprezentativní snímky samic 4. den experimentu: a) samice kontrolní skupiny vykazující standardní vitalitu, b) uhynulá samice ze skupiny NTBC + L-tyrosin (foto: autorka).

5.3 Výsledky kolorimetrické eseye u *Caenorhabditis elegans*

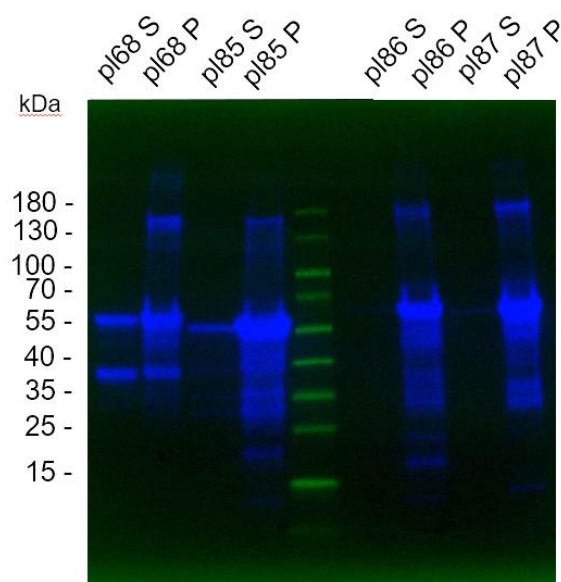
Cílem kolorimetrické eseye bylo ověřit enzymatickou aktivitu sledovaných proteinů a posoudit vliv inhibitoru NTBC na tvorbu pigmentu. V průběhu experimentu však nebyla pozorována žádná barevná změna ani v kontrolních (bez NTBC), ani v experimentálních vzorcích (s NTBC). Absence zbarvení přetrvávala i po prodloužené inkubaci (16 h při 37 °C). Přestože vizuálně nedetekovatelná kolorimetrická reakce neposkytovala podklad pro kvantitativní vyhodnocení, bylo provedeno kontrolní měření optické denzity pomocí mikrospektrofotometru NanoDrop při vlnové délce 405 nm. Zaznamenané hodnoty OD vykazovaly pouze minimální odchylky od nulové hodnoty ($\pm 0,1$) a neprokázaly významné rozdíly mezi jednotlivými vzorky. Vzhledem k absenci detekovatelné enzymatické aktivity nebylo možné provést plánovanou kvantifikaci produktu reakce ani stanovení inhibičního účinku NTBC (výpočet IC_{50}).

Získané výsledky naznačují, že za použitých podmínek nedošlo k funkční expresi sledovaných enzymů nebo jejich aktivita nebyla dostatečná k vyvolání měřitelné kolorimetrické reakce. Tento závěr je podpořen i experimentálními daty z Biologického centra AV ČR (České

Budějovice), kde byla provedena kolorimetrická esej zaměřená na stanovení enzymatické aktivity u proteinů ze *Schistosoma mansoni* a *Caenorhabditis elegans* (geny *C31H2.4* a *hpd-1*). Součástí experimentu byla pozitivní kontrola obsahující funkční enzym HPPD druhu *Dermanyssus gallinae* (čmelíka kuřího), u níž došlo k očekávanému zbarvení. U ostatních vzorků nebyla pozorována žádná kolorimetrická reakce (Obrázek 12). Následná analýza pomocí metody Western Blot ukázala, že sledované proteiny byly převážně lokalizovány v nerozpustné frakci ve formě inkluzních tělísek. Pouze protein C31H2.4 u *C. elegans* byl částečně detekován v rozpustné frakci (Obrázek 13).



Obrázek 12: Kolorimetrická esej enzymatické aktivity HPPD: 68 – zbarvení pozitivní kontroly HPPD *D. gallinae*, 85 až 87 – bez barevné změny C31H2.4 *C. elegans*, HPPD *S. mansoni*, HPPD *C. elegans* (se svolením autora, Mgr. Jan Perner, Ph.D., Biologické centrum AV ČR České Budějovice, nepublikovaná data).

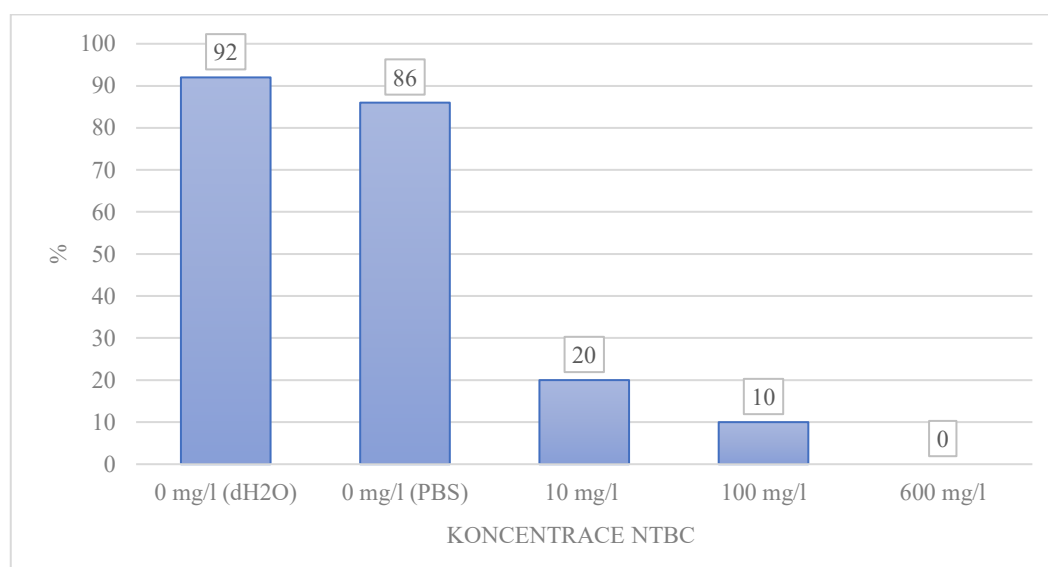


Obrázek 13: Western blot HPPD proteinů (anti-His detekce) po 20 h indukce: S – rozpustná frakce (supernatant), P – nerozpustná frakce (pelet), pl68 – pozitivní kontrola HPPD *D. gallinae*, pl85 – C31H2.4 *C. elegans*, pl86 – HPPD *S. mansoni*, pl87 – HPPD *C. elegans* (se svolením autora, Mgr. Jan Perner, Ph.D., Biologické centrum AV ČR České Budějovice, nepublikovaná data).

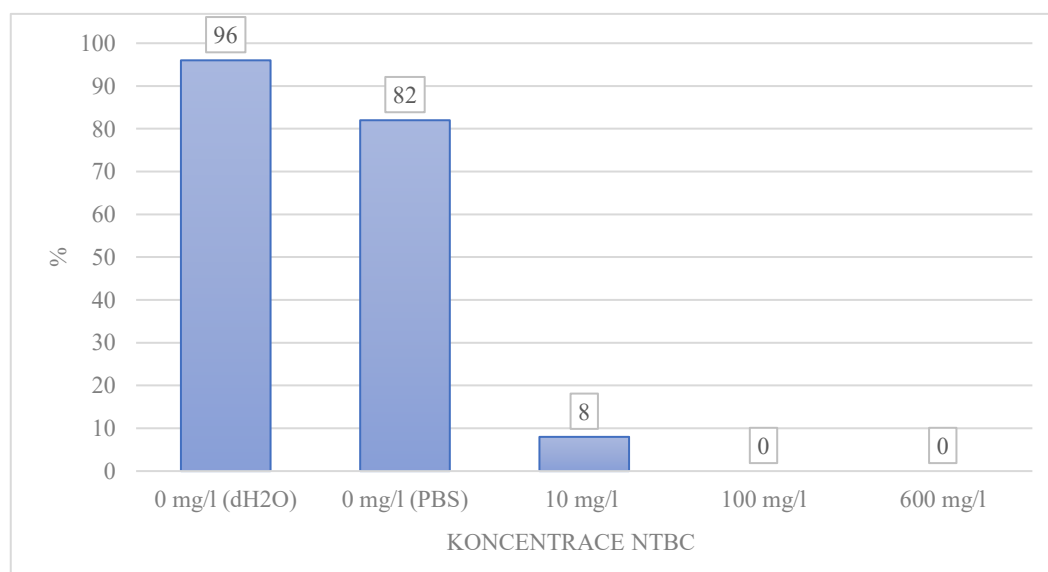
5.4 Testy klíčivosti a limitace fenotypových testů u *Meloidogyne hapla*

Vliv NTBC byl hodnocen u řechy seté (*Lepidium sativum* L.), okurky seté (*Cucumis sativus* L.) a rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.). Výsledky testů klíčivosti jsou znázorněny v Grafech 3-5.

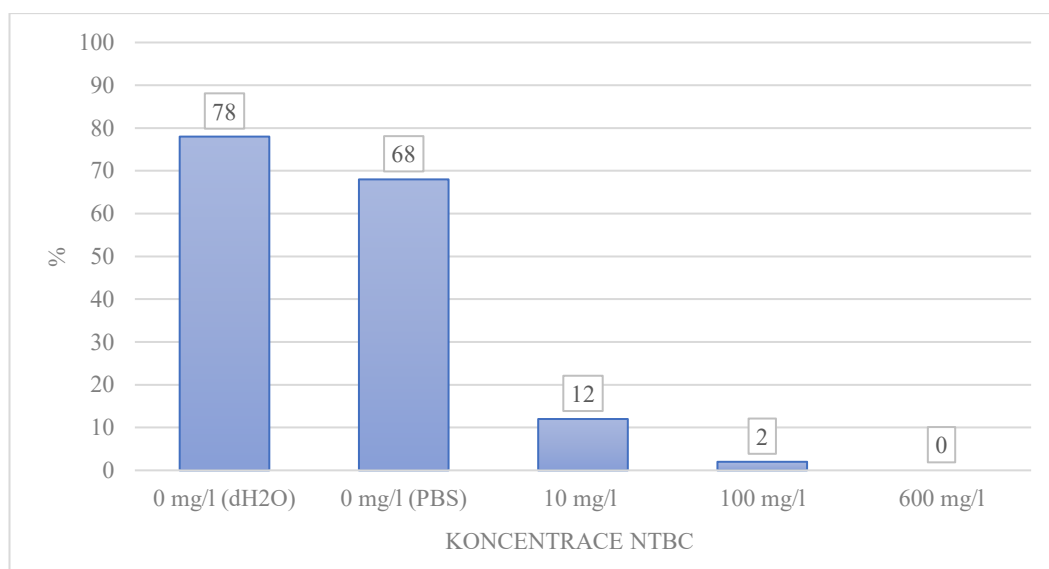
U všech testovaných rostlin byla v kontrolních variantách (dH₂O, PBS) zaznamenána vysoká klíčivost, s mírně nižšími hodnotami u rajčete jedlého. S rostoucí koncentrací NTBC docházelo k výraznému poklesu klíčivosti, přičemž již při nejnižší testované koncentraci byla pozorována výrazná inhibice klíčení (FGP 8-20 %). Při vyšších koncentracích byla klíčivost prakticky zcela potlačena. Nejvyšší citlivost vykazovala okurka setá, u níž byla klíčivost zcela inhibována již při koncentraci NTBC 100 mg/l (FGP 0 %). Řeřicha setá a rajče jedlé vykazovaly mírně vyšší toleranci, nicméně i u těchto druhů byla při koncentraci NTBC 600 mg/l zaznamenána nulová klíčivost (FGP 0 %).



Graf 3: Procento klíčivosti (FGP) řeřichy seté (*Lepidium sativum*).



Graf 4: Procento klíčivosti (FGP) okurky seté (*Cucumis sativus*).



Graf 5: Procento klíčivosti (FGP) rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*).

Na základě výsledků testů klíčivosti nebylo přistoupeno k dalším experimentům zaměřeným na sledování morfologických změn rostlin při kultivaci na médiu s NTBC, jelikož nebylo možné očekávat udržení životaschopných rostlin po delší dobu kultivace, která je nezbytná pro hodnocení růstových parametrů. Výsledky ukázaly výraznou citlivost testovaných rostlin k NTBC již v raných fázích vývoje. Pozorovaná inhibice klíčení pravděpodobně souvisela s narušením metabolických drah spojených s plastidy, které jsou aktivní již během klíčení a nejsou plně závislé na přítomnosti světla (Lock 2022). Za těchto podmínek nebylo možné vytvořit funkční hostitelský systém, a proto nebylo přistoupeno k fenotypovým testům u *M. hapla*.

5.5 Výsledky kolorimetrické esej u *Meloidogyne hapla*

Kolorimetrická esej byla provedena za účelem sledování inhibičního účinku NTBC na aktivitu enzymu HPPD. Experimentální kultura s NTBC nevykazovala žádné barevné změny. Stejně tak u bakteriální kultury bez přídavku NTBC nebylo sledováno viditelné zbarvení. Proces ochrnozy nebyl pozorován ani po delší inkubaci přes noc při 37 °C. Absence pigmentace v obou případech naznačovala, že rekombinantní enzym nebyl exprimován v dostatečném množství nebo nevykazoval detekovatelnou enzymatickou aktivitu. V případě dosažení pozitivní enzymatické aktivity by následovala spektrofotometrická kvantifikace produkce pyomelaninu při vlnové délce 405 nm a stanovení IC_{50} pomocí nelineární regrese křivky dávka-účinek. Vzhledem k nulové reakci nebylo opodstatněné provádět kvantitativní analýzy a dále hodnotit inhibiční účinek NTBC.

Tyto výsledky jsou v souladu s pozorováními získanými u *C. elegans*, kde rovněž nebyla prokázána detekovatelná enzymatická aktivita za stanovených podmínek.

6 Diskuze

6.1 Fenotypová odezva *Caenorhabditis elegans*

Výsledky fenotypových testů u *C. elegans* přinesly jasný důkaz o toxickém účinku kombinace NTBC a L-tyrosinu. Statistická analýza potvrdila významné rozdíly mezi skupinami (ANOVA, $p < 0,001$), přičemž následná párová porovnání s Bonferroniho korekcí ($\alpha = 0,0083$) prokázala statisticky významný rozdíl mezi skupinou NTBC + L-tyrosin a všemi ostatními variantami. Použitá Bonferroniho korekce představuje nejkonzervativnější přístup, který upřednostňuje eliminaci chyby I. typu (falešné pozitivity) za cenu zvýšení rizika chyby II. typu (falešné negativity). Ve statistické analýze však kombinace NTBC a L-tyrosinu vykazovala významnost i při této přísné korekci, což výrazně posiluje spolehlivost závěru.

Zatímco samostatné podávání NTBC nebo L-tyrosinu vedlo pouze k mírnému a statisticky neprůkaznému poklesu plodnosti, jejich společná aplikace způsobila propad reprodukce o 44,2 % oproti kontrolní skupině. Tento trend byl vysoce konzistentní napříč všemi třemi biologickými opakováními, což potvrzuje robustnost pozorovaného jevu. Z výsledků vyplývá, že pokles počtu potomků není způsoben pouze inhibicí reprodukčních procesů, ale především akutní toxicitou pro dospělé samice. Ve srovnání se 100% mírou přežití u kontrolní skupiny mortalita ve skupině NTBC + L-tyrosin dosáhla 61,5 %, přičemž k úhynům docházelo již od druhého dne experimentu. Právě předčasné ukončení reprodukčního období v důsledku úhynu je hlavním faktorem, který stojí za statisticky významným rozdílem počtu potomků u této skupiny. Rychlost a četnost úhynů v této skupině naznačuje, že metabolická zátěž způsobená kombinací látek NTBC a L-tyrosinu je pro organismus samice fatální v mnohem kratším časovém úseku než u látek podávaných samostatně. Tento mechanismus je analogický s patofyziologií lidského tyrosinémie typu III, kde defekt enzymu HPPD vede k akumulaci tyrosinu a jeho meziproduktů, zejména 4-hydroxyfenylpyruvátu (Lock 2022). Výsledky fenotypových testů potvrzují, že tento metabolický rozvrat, vyvolaný uměle kombinací inhibitoru a substrátu, je relevantní i pro hlístice. Pozorovaný jev je také v přímém souladu s poznatky Sterkela et al. (2021), který popsal podobný efekt u krevsajícího hmyzu. U much rodu *Glossina* vedla inhibice HPPD po nasátí krve, která je bohatým zdrojem tyrosinu, k rychlému hromadění toxických meziproduktů a následné smrti.

Výsledky jsou v souladu s bakalářskou prací Turcelové (2023), která při testování vlivu NTBC na *C. elegans* zaznamenala nulové přežívání při kombinaci NTBC a L-tyrosinu. Předložená práce tato pozorování doplňuje o počet testovaných jedinců ($n = 13$) a statistickou analýzu, přičemž potvrzuje reprodukovatelnost sledovaného trendu i přes zachycenou variabilitu v nezávislých opakováních.

6.2 Fytotoxicita nitisinonu jako limit fenotypových testů u *Meloidogyne hapla*

Původním záměrem práce bylo sledovat vliv NTBC na životní cyklus fytoparazitické hlístice *M. hapla* v in vitro podmínkách. Výsledky testů klíčivosti u řeřichy (*L. sativum*), okurky (*C. sativus*) a rajčete (*S. lycopersicum*) však ukázaly extrémní citlivost těchto rostlin k testované látce. Již nejnižší koncentrace NTBC vedly k drastickému propadu klíčivosti (FGP 8–20 %) a při vyšších dávkách byla klíčivost zcela potlačena. Tato pozorování jsou v souladu s historií NTBC, který byl původně patentován jako selektivní herbicid. Mechanismus jeho účinku u rostlin spočívá v inhibici HPPD, která vede k narušení syntézy plastochinonu a následně ke kritickému nedostatku karotenoidů, což způsobuje bělení (bleaching) a smrt rostlinných tkání. Pozorovaná inhibice klíčení pravděpodobně souvisela s narušením metabolických drah spojených s plastidy, které jsou aktivní již během klíčení a nejsou plně závislé na přítomnosti světla (Lock 2022). Za těchto podmínek nebylo možné vytvořit funkční hostitelský systém, což znemožnilo realizaci fenotypových testů u *M. hapla*. Z praktického hlediska se tak NTBC jeví pro přímou ochranu rostlin jako nepoužitelný, neboť jeho fytotoxicita převyšuje potenciální nematocidní účinek.

6.3 Bioinformatická analýza a predikce selektivní toxicity

Porovnání 11 proteinových sekvencí (zahrnující 8 různých druhů) ukázalo, že základní kostra enzymu zůstává vysoce konzervovaná mezi různými řády hlístic (*Rhabditida*, *Tylenchida*, *Strongylida*) i napříč všemi vybranými taxonomickými skupinami. Zatímco dřívější úvahy (Turcelová 2023) vycházely z celkové sekvenční podobnosti, tato detailní analýza zaměřená na aminokyseliny tvořící aktivní místo (His183, His266, Glu349; Lin et al. 2019) odhalila absolutní shodu mezi fylogeneticky vzdálenými organismy, což odráží nezbytnost enzymu HPPD pro metabolismus tyrosinu. Na základě zařazení konkrétních druhů, u kterých byla vědecky prokázána inhibice HPPD za použití NTBC (*Homo sapiens*, Lindstedt et al. 1992; *Anopheles stephensi*, Kučera et al. 2025), bylo možné předpokládat, že i pro organismy s vyšší sekvenční shodou bude tento zásah do metabolismu vysoce účinný.

Tyto výsledky poskytují strukturální rámec pro vysvětlení pozorovaných fenotypových projevů u *C. elegans*. Shoda v klíčových reziduiích (Tyr221, Leu224; Liu et al. 2020) určujících selektivní vazebnou afinitu inhibitoru k enzymu stojí za vysokou citlivostí této hlístice k působení NTBC, která se v experimentální části projevila průkazným snížením reprodukce a zvýšenou mortalitou. Identifikované substituce u homologních sekvence *C. elegans* (protein C31H2.4) naznačují, že vnitřní uspořádání aktivního místa nemusí být pro vazbu inhibitoru optimální. To by mohlo v praxi znamenat, že k dosažení srovnatelného inhibičního účinku by byly zapotřebí vyšší koncentrace látky, neboť tento protein může být vůči NTBC přirozeně odolnější. Nicméně průkazný dopad na vitalitu *C. elegans* naznačuje, že přítomnost této potenciálně odolnější varianty enzymu nedokázala kompenzovat blokádu HPPD (kódovaným genem *hpd-1*). Na tomto základě můžeme předvídat, že pro vyvolání patologického stavu stačí inhibice té varianty enzymu, která vykazuje shodu v aktivním místě s citlivými modely, čímž můžeme předpokládat účinek NTBC i u všech ostatních vybraných druhů s výjimkou *S. mansoni*.

6.4 Interpretace kolorimetrické esej a metodické limity

Kolorimetrická esej byla provedena podle protokolu Neuckermans et al. (2019), který využívá expresi HPPD v buňkách *E. coli* k produkci hnědého pigmentu (pyomelaninu) vznikajícího autooxidací a polymerizací HGA. Tato studie úspěšně využila tento systém pro screening inhibitorů lidského enzymu HPPD a potvrdila inhibiční účinek NTBC. V experimentální části této práce se však při ověřování inhibice HPPD u druhů *C. elegans* a *M. hapla* nepodařilo zaznamenat očekávanou barevnou změnu, a to u vzorků s inhibitorem i bez něj. Absence barevné reakce ve vzorcích bez NTBC vypovídá o tom, že v expresním systému nedošlo k detekovatelné produkci enzymaticky aktivního proteinu. Podobný problém byl již zaznamenán v bakalářské práci Turcelové (2023) na modelovém organismu *C. elegans*, kde při použití expresního vektoru pET-22b(+) rovněž nedošlo ke zbarvení kultur. V této práci jsme se pokusili tento limit překonat použitím pokročilejšího expresního vektoru pET-SUMO, který by měl napomáhat solubilitě proteinu, nicméně se toto řešení ukázalo jako nedostatečné.

Tyto výsledky je nutné interpretovat v kontextu práce Neuckermans et al. (2019). Autoři prokázali, že standardně využívaný kmen *E. coli* BL21(DE3) vykazuje při expresi HPPD značné limity. V jejich studii byla exprese lidského HPPD pro tento kmen dokonce letální na pevných médiích, zatímco v tekutých kulturách dosahoval kmen BL21(DE3) téměř osminásobně nižší produkce pigmentu ($OD_{405} = 0,688$) ve srovnání s kmenem C43(DE3) ($OD_{405} = 5,370$). V našem případě proběhla kultivace kmene BL21(DE3) bez potíží, což dokládá, že HPPD z *C. elegans* i *M. hapla* nevykazuje pro hostitelskou buňku tak vysokou míru toxicity jako lidský enzym. Absence pigmentace po indukci IPTG však potvrzuje nefunkčnost produkovaného proteinu, pravděpodobně v důsledku chyby v jeho prostorovém uspořádání. Příčinou neúspěchu tedy mohla být neschopnost použitého kmene *E. coli* produkovat rekombinantní protein v aktivní solubilní formě. Proteiny cizorodého původu mohou mít při nadprodukci tendenci vytvářet nerozpustné agregáty špatně sbaleného proteinu (inkluzní tělíska), který postrádá enzymatickou aktivitu.

Zásadní vhled do tohoto problému poskytla spolupráce s Biologickým centrem AV ČR, kde byly podobné proteiny (*S. mansoni* a obě varianty *C. elegans*) podrobeny detailní analýze. Skutečnost, že pozitivní kontrola s HPPD druhu *Dermanyssus gallinae* vykazovala silnou pigmentaci, vylučuje chybu v nastavení reakčních podmínek a poukazuje na specifické limity exprese proteinu HPPD. Výsledky analýzy pomocí metody Western Blot potvrdily, že zatímco kontrolní enzym druhu *D. gallinae* byl přítomen v rozpustné frakci, sledované proteiny hlístic a motolic byly lokalizovány téměř výhradně v nerozpustné frakci ve formě inkluzních tělísek. To vysvětluje nulovou enzymatickou aktivitu v kolorimetrickém testu – proteiny byly sice buňkou syntetizovány, ale v důsledku chybného prostorového uspořádání zůstaly katalyticky inertní. Jedinou částečnou výjimkou byl protein C31H2.4 (*C. elegans*), který byl detekován i v rozpustné frakci, avšak ani zde jeho koncentrace nedosáhla prahové hodnoty pro vznik viditelné pigmentace.

Přestože jsme v této práci inovovali vektorový systém, pro budoucí výzkum hlístic se jako nezbytný krok jeví přechod na kmen C43(DE3). Ten disponuje mutacemi, které usnadňují toleranci nadprodukce toxických proteinů a jejich správné sbalení do aktivní formy. Dále se nabízí také optimalizace samotných kultivačních podmínek. Například snížení teploty na 18-20 °C nebo použití nižší koncentrace induktoru IPTG (0,5 mM) by mohly zpomalit

syntézu proteinu a poskytnout dostatek času pro zaujmutí jeho funkční konformace. Pokud by ani tyto optimalizace v bakteriálních systémech nevedly k produkci funkčního enzymu, bylo by nezbytné zvážit alternativní expresní systémy, jako jsou kvasinky (*Pichia pastoris*) nebo hmyzí buňky.

7 Závěr

Předložená diplomová práce se zabývala studiem vlivu nitisinonu (NTBC) na enzym 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázu (HPPD) u volně žijících (*Caenorhabditis elegans*) a parazitárních hlístic (*Meloidogyne hapla*, *Haemonchus contortus*). Výzkum kombinoval bioinformatické srovnání, molekulárně-biochemickou analýzu a fenotypové testy, což umožnilo nahlížet na problematiku zranitelnosti tyrosinové dráhy hlístic z více úrovní.

Získaná fenotypová data u modelového organismu *C. elegans* přinesla jasný důkaz o synergickém toxickém účinku kombinace NTBC a L-tyrosinu. Experimenty na celých organismech (n = 13) prokázaly, že zatímco samotná inhibice HPPD je pro hlístice v in vitro podmínkách zvladatelná, v přítomnosti nadbytku tyrosinu dochází k dramatickému propadu reprodukce (o 44,2 %) a vysoké akutní toxicitě (mortalita 61,5 %). Tento proces, analogický s patofyziologií humánní tyrosinémie typu III, potvrzuje hypotézu, že NTBC vyvolává výraznou nerovnováhu v aminokyselinovém metabolismu. Akumulace L-tyrosinu a jeho meziproduktů je pro organismus hlístice fatální, čímž byl úspěšně splněn cíl zaměřený na ověření vlivu tyrosinu na účinnost NTBC u druhu *C. elegans*.

U fytoparazitického druhu *M. hapla* byla identifikována zásadní bariéra pro využití NTBC v ochraně rostlin. Testy klíčivosti prokázaly extrémní fytotoxicitu NTBC, což znemožnilo vytvoření funkčního hostitelského systému. Ačkoliv by pro účely fenotypových testů bylo možné tento limit obejít využitím transgenních rezistentních rostlin, pro reálnou zemědělskou praxi se NTBC jako přímý nematocid jeví jako nereálný, neboť jeho herbicidní účinek převyšuje potenciální přínos v ochraně proti hlísticím.

V případě druhu *H. contortus* nebylo možné realizovat experimentální část z důvodu sezónní nedostupnosti biologického materiálu a komplikací při zajištění infekčního cyklu v době konání pokusů. Tento druh byl však prioritně zahrnut do detailní komparativní bioinformatické analýzy, která sloužila jako teoretická alternativa k in vitro testům.

V oblasti molekulárně-biochemických analýz narazilo studium druhů *M. hapla* a *C. elegans* na technologické limity heterologní exprese. Navzdory inovaci vektoru (pET SUMO) nedošlo v bakteriálním systému BL21(DE3) k produkci enzymaticky aktivního proteinu. Zásadním přínosem bylo objasnění této neúspěšné exprese prostřednictvím spolupráce s Biologickým centrem AV ČR. Analýza metodou Western Blot odhalila, že parazitární proteiny tvoří nerozpustná inkluzní tělíska, což znemožnilo stanovení míry inhibice (IC₅₀) na biochemické úrovni. Tento výsledek definuje nutnost budoucí optimalizace (využití expresního kmene *E. coli* C43(DE3) či eukaryotických systémů) pro studium HPPD u parazitických nematod.

Bioinformatická analýza 11 sekvencí potvrdila vysokou konzervaci aktivního místa (rezidua His183, His266, Glu349) napříč různými řády hlístic i dalšími fylogeneticky odlišnými taxony. Identifikovaná shoda v klíčových pozicích pro vazbu inhibitoru (Tyr221, Leu224) u *C. elegans*, *M. hapla*, *H. contortus* a dalších taxonů poskytuje strukturální vysvětlení pro pozorovanou citlivost a dává silný předpoklad pro obdobný účinek u dalších parazitických druhů.

Z praktického hlediska práce identifikovala HPPD jako slibný cíl, nicméně aplikace samotného nitisinonu naráží na limity v selektivitě. Vzhledem k vysoké homologii aktivního místa parazitárních a savčích enzymů by stávající inhibitor pravděpodobně vyvolával

nežádoucí vedlejší účinky i u hostitele (člověka). Nitisinon by však mohl sloužit jako výchozí strukturní model pro syntézu specifických analogů, které by díky drobným modifikacím cílily pouze na parazitární varianty enzymu. Tento přístup by mohl zajistit potřebnou selektivní toxicitu a zároveň snížit rizika pro necílové organismy v prostředí, na jejichž vysokou citlivost poukázaly výsledky u modelu *C. elegans*. Cíle práce byly vzhledem k objektivním metodickým překážkám (fytoxicita, stabilita proteinů, nedostupnost biologického materiálu) splněny v maximálním možném rozsahu a vytvořily pevný základ pro navazující výzkum metabolismu parazitických hlístic.

8 Literatura

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**:403-410.
- Angileri F, Morrow G, Roy V, Orejuela D, Tanguay RM. 2014. Heat shock response associated with hepatocarcinogenesis in a murine model of hereditary tyrosinemia type I. *Cancers* **6**:998-1019.
- Bagińska M, Warężak T, Romaniuk W, Kozacki D, Skibko Z, Borusiewicz A, Dąbrowski J. 2025. Soil Nematodes as an Indicator of the Efficiency of Hydrophytic Treatment Plants with Vertical Wastewater Flow. *Sustainability* **17**:1329.
- Beaudegnies R, Edmunds AJF, Fraser TEM, Hall RG, Hawkes TR, Mitchell G, Schaetzer J, Wendeborn S, Wibley J. 2009. Herbicidal 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors—A review of the triketone chemistry story from a Syngenta perspective. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**:4134–4152.
- Blaxter M. 2011. Nematodes: the worm and its relatives. *PLOS Biology* **9**:e1001050.
- Blaxter M, Ley P, Garey J, Liuk L, Scheldeman P, Vierstraete A, Vanfleteren J, Mackey L, Dorris M, Frisse L, Vida J, Thomas W. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* **392**:71-75.
- Bongers T, Ferris H. 1999. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* **14**:224-228.
- Brenner S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**:71-94.
- Burns AR, Baker RJ, Kitner M. 2023. Selective control of parasitic nematodes using bioactivated nematicides. *Nature*. **618**:102-109.
- Burns AR, Luciani GM, Musso G, Bagg R, Yeo M, Zhang Y, Rajendran L, Glavin J, Hunter R, Redman E, Stasiuk S, Schertzberg M, McQuibban AG, Caffrey CR, Cutler SR, Tyers M, Giaever G, Nislow C, Fraser AG, MacRae CA, Gilleard J, Roy PJ. 2015. *Caenorhabditis elegans* is a useful model for anthelmintic discovery. *Nature Communications* **6**:7485.
- Chakrapani BP, Kumar S, Subramaniam JR. 2008. Development and evaluation of an in vivo assay in *Caenorhabditis elegans* for screening of compounds for their effect on cytochrome P450 expression. *Journal of Biosciences* **33**:269-277.
- Coakley G, Buck AH, Maizels RM. 2016. Host parasite communications-Messages from helminths for the immune system: Parasite communication and cell-cell interactions. *Molecular and Biochemical Parasitology* **208**:33-40.
- Corsi AK, Wightman B, Chalfie M. 2015. A transparent window into biology: *C. elegans*. *Genetics* **200**:387–407.

Dicker A. 2010. Comparative gene expression studies of anthelmintic resistance in the parasitic nematode, *Teladorsagia circumcincta* [Ph.D. Thesis]. University of Glasgow, UK.

Doyle SR, Illingworth CJR, Laing R, Bartley DJ, Redman E, Martinelli A, Holroyd N, Morrison AA, Rezansoff A, Tracey A, Devaney E, Berriman M, Sargison N, Cotton JA, Gilleard JS. 2019. Population genomic and evolutionary modelling analyses reveal a single major QTL for ivermectin drug resistance in the pathogenic nematode, *Haemonchus contortus*. *BMC Genomics* **20**:218.

Ellis MK, Whitfield AC, Gowans LA, Auton TR, Provan WM, Lock EA, Smith LL. 1995. Inhibition 4-Hydroxyphenylpyruvate trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione methanesulfonylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione. *Pharmacology* **133**:12–19.

EPPO. 2013. PM 7/119 (1) Nematode extraction. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **43**:471-495.

Figueiredo LA, Rebouças TF, Ferreira SR, Rodrigues-Luis GF, Miranda RC, Araujo RN, Fujiwara RT. 2018. Dominance of P-glycoprotein 12 in phenotypic resistance conversion against ivermectin in *Caenorhabditis elegans*. *Plos One* **13**:e0192995.

Gasser RB, Schwarz EM, Korhonen PK, Young ND. 2016. Understanding *Haemonchus contortus* Better Through Genomics and Transcriptomics. *Advances in Parasitology* **93**:519-567.

Geary TG. 2005. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. *Trends in Parasitology* **21**:530-532.

Grabau ZJ, Mauldin MD, Habteweld A, Carter ET. 2020. Nematicide efficacy at managing *Meloidogyne arenaria* and non-target effects on free-living nematodes in peanut production. *Journal of Nematology* **52**:1-10.

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**:557-580.

Ho NF, Geary TG, Raub TJ, Barsuhn CL, Thompson DP. 1990. Biophysical transport properties of the cuticle of *Ascaris suum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **41**:153-65.

Hodda M. 2022. Phylum Nematoda: trends in species descriptions, the documentation of diversity, systematics, and the species concept. *Zootaxa* **5114**: 290-317.

Holden-Dye L, Walker RJ. 2014. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* **16**: 1-29

Holme E, Lindstedt S. 2000. Nontransplant treatment of tyrosinemia. *Clinical Liver Disease* **4**:805-815.

Holterman M, Schratzberger M, Helder J. 2019. Nematodes as evolutionary commuters between marine, freshwater and terrestrial habitats, *Biological Journal of the Linnean Society* **128**:756-767.

- Howe KL, Bolt BJ, Shafie M, Kersey P, Berriman M. 2017. WormBase ParaSite – a comprehensive resource for helminth genomics. *Molecular and biochemical parasitology* **215**:2-10.
- Ibáñez M, Blázquez M. 2020. Phytotoxic effects of commercial essential oils on selected vegetable crops: Cucumber and tomato. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **15**:100209.
- Jones JT, Haegeman A, Danchin EG, Gaur HS, Helder J, Jones MG, Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius JE, Wesemael WM, Perry RN. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **14**:946-961.
- Kader, M. 2005. A comparison of seed germination calculation formulae and the associated interpretation of resulting data. *Journal and proceedings of the Royal Society of New South Wales* **138**:65-75.
- Kaletta T, Hengartner MO. 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery* **5**:387-398.
- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* **30**:3059-3066.
- Kawanobe M, Toyota K, Fujita T, Hatta D. 2019. Evaluation of nematicidal activity of fluensulfone against non-target free-living nematodes under field conditions. *Agronomy* **9**:853.
- Kibbe WA. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acid Research* **35**:43-46.
- Kita K, Hirawake H, Miyadera H, Amino H, Takeo S. 2002. Role of complex II in anaerobic respiration of the parasite mitochondria from *Ascaris suum* and *Plasmodium falciparum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1553**:123-39.
- Kučera M, Hartmann D, Valdés JJ, Palusová A, Sheshachalam A, Vlot M, Vos MW, Decherer KJ, Perner J. 2025. Killing of *Anopheles stephensi* mosquitoes by selective triketone inhibitors of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase depends on a high protein meal. *Insect biochemistry and molecular biology* **183**:104361.
- Lacey LA, Georgis R. 2012. Entomopathogenic nematodes for control of insect pests above and below ground with comments on commercial production. *Journal of Nematology* **44**:218-225.
- Laing R, Kikuchi T, Martinelli A, Tsai IJ, Beech RN, Redman E, Holroyd N, Bartley DJ, Beasley H, Britton C, Curran D, Devaney E, Gilabert A, Hunt M, Jackson F, Johnston SL, Kryukov I, Li K, Morrison AA, Reid AJ, Sargison N, Saunders GI, Wasmuth JD, Wolstenholme A, Berriman M, Gilleard JS, Cotton JA. 2013. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology* **14**:R88.
- Lewis RW, Botham JW. 2013. A review of the mode of toxicity and relevance to humans of the triketone herbicide 2-(4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoyl)-1,3-cyclohexanedione. *Critical Reviews in Toxicology* **43**:185-199.

Lin HY, Yang JF, Wang DW, Hao GF, Dong JQ, Wang YX, Yang WC, Wu JW, Zhan CG, Yang GF. 2019. Molecular insights into the mechanism of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibition: enzyme kinetics. X-ray crystallography and computational simulations **286**: 975-990.

Liu YX, Zhao LX, Ye T. 2020. Identification of key residues determining the binding specificity of human 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **154**:105504.

Lindstedt S, Holme E, Lock EA, Hjalmarson O, Strandvik B. 1992. Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Lancet* **340**:813-817.

Lock E. A. 2022. The Discovery of the Mode of Action of Nitisinone. *Metabolites* **12**:902.

Lock EA, Ellis MK, Gaskin P, Robinson M, Auton TR. 1998. From toxicological problem to therapeutic use: The discovery of the mode of action of 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC), its toxicology and development as a drug. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **21**:498–506.

Martin RJ, Robertson AP, Bjorn H. 2012. Target sites of anthelmintics. *Parasitology* **114**:111-124.

Mitchell GA. 1996. Bad guy makes good: Inhibition of 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Human & Experimental Toxicology* **15**: 179-181.

Mitreva M, Zarlenga DS, McCarter JP, Jasmer DP. 2007. Parasitic nematodes - from genomes to control. *Veterinary Parasitology* **148**:31-42.

Moran GR. 2005. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Archives of biochemistry and biophysics* **433**:117-128.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. . *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**:263-273.

Nelson DL, Cox MM. 2017. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 7th ed. W.H. Freeman, New York.

Neuckermans J, Mertens A, De Win D, Schwaneberg U, De Kock J. 2019. A robust bacterial assay for high-throughput screening of human 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase inhibitors. *Scientific Reports* **9**:14145.

Notredame C. 2007. Recent evolutions of multiple sequence alignment algorithms. *PLOS Computational Biology* **3**:e123.

Omura S, Miyadera H, Ui H, Shiomi K, Yamaguchi Y, Masuma R, Nagamitsu T, Takano D, Sunazuka T, Harder A, Kölbl H, Namikoshi M, Miyoshi H, Sakamoto K, Kita K. 2001.

An anthelmintic compound, nafuredin, shows selective inhibition of complex I in helminth mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:60-2.

Opperman CH, Bird DM, Williamson VM, Rokhsar DS, Burke M, Cohn J, Cromer J, Diener S, Gajan J, Graham S, Houfek TD, Liu Q, Mitros T, Schaff J, Schaffer R, Scholl E, Sosinski BR, Thomas VP, Windham E. 2008. Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:14802-14807.

Panska L, Nedvedova S, Vacek V, Krivska D, Konecny L, Knop F, Kutil Z, Skultetyova L, Leontovyc A, Ulrychova L, Sakanari J, Asahina M, Barinka C, Macurkova M, Dvorak J. 2023. Uncovering the essential roles of glutamate carboxypeptidase 2 orthologs in *Caenorhabditis elegans*. Available from <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.02.27.529682v1.full> 2023 (accessed February 2026).

Park CG, Jang M, Shin E, Kim J. 2017. Myrtaceae Plant Essential Oils and their β -Triketone Components as Insecticides against *Drosophila suzukii*. *Molecules* **22**:1050.

Perry RN, Moens M. 2013. *Plant Nematology*. CABI Publishing, UK.

Plíva P, et al. 2006. Příručka: Zakládání, průběh a řízení kompostovacího procesu. Kap. 2.4.3. Test fytotoxicity (Řeřichový test). VUZT Praha, ISBN 80 86884-11-2.

PubChem. 2024. PubChem Compound Database. Available from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed December 2025).

Raspail C, Graindorge M, Moreau Y. 2011. 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase catalysis: identification of catalytic residues and production of a hydroxylated intermediate shared with a structurally unrelated enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* **286**:26061-26070.

Raza A. 2017. The role of drug efflux systems in anthelmintic resistance in parasitic nematodes [Ph.D. Thesis]. School of Veterinary Science, The University of Queensland, Australia.

Rehborg EG, Wheeler NJ, Zamanian M. 2023. Mapping resistance-associated anthelmintic interactions in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **17**:e0011705.

Saidu A, Paul BT, Jesse FFA, Kamaludeen J, Mustafa S, Malahubban M, Hakim AH, Stephen J. 2025. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats: A systematic review. *Journal of Advanced Veterinary Research* **15**:397-405.

Santucci A, Bernardini G, Braconi D, Petricci E, Manetti F. 2017. 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase and Its Inhibition in Plants and Animals: Small Molecules as Herbicides and Agents for the Treatment of Human Inherited Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry* **60**:4101-4125.

Schratzberger M, Holterman M, van Oevelen D, Helder J. 2019. A Worm's World: Ecological Flexibility Pays Off for Free-Living Nematodes in Sediments and Soils. *Bioscience* **69**:867-876.

Schwarz EM, Korhonen PK, Campbell BE, Young ND, Jex AR, Jabbar A, Hall RS, Mondal A, Howe AC, Pell J, Hofmann A, Boag PR, Zhu XQ, Gregory T, Loukas A, Williams BA, Antoshechkin I, Brown C, Sternberg PW, Gasser RB. 2013. The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*. *Genome Biology* **14**:R89.

Scott A, Willis CRG, Muratani M. 2023. *Caenorhabditis elegans* in microgravity: An omics perspective. *iScience* **26**:107189.

Shah DD, Moran GR. 2015. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase and hydroxymandelate synthase: 2-oxo acid-dependent oxygenases of importance to agriculture and medicine. Pages 438–457 in RSC Biosciences Collection, Schofield, C, Hausinger, R, editors. Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Smythe AB, Holovachov O, Kocot KM. 2019. Improved phylogenomic sampling of free-living nematodes enhances resolution of higher-level nematode phylogeny. *BMC Ecology and Evolution* **19**:121.

Sterkel M, Haines LR, Casas-Sánchez A, Owino Adung'a V, Vionette-Amaral RJ, Quek S, Rose C, Silva Dos Santos M, García Escude N, Ismail HM, Paine MI, Barribeau SM, Wagstaff S, MacRae JI, Masiga D, Yakob L, Oliveira PL, Acosta-Serrano Á. 2021. Repurposing the orphan drug nitisinone to control the transmission of African trypanosomiasis. *PLOS Biology* **19**:e3000796.

Stojković M, Marjanović DS, Medić D, Charvet CL, Trailović SM. 2025. Neuromuscular System of Nematodes Is a Target of Synergistic Pharmacological Effects of Carvacrol and Geraniol. *Pharmaceuticals* **18**:1232.

Strydom T, Lavan R, Torres S, Heaney K. 2023. The Economic Impact of Parasitism from Nematodes, Trematodes and Ticks on Beef Cattle Production. *Animals* **13**:1599.

Talavera M, Thoden TC, Vela-Delgado MD, Verdejo-Lucas S, Sánchez-Moreno S. 2021. The impact of fluazaindolizine on free-living nematodes and the nematode community structure in a root-knot nematode infested vegetable production system. *Pest Management Science* **77**:5427-5436.

Thoden TC, Alkader MA, Wiles JA. 2020. Biological attributes of Salibro™, a novel sulfonamide nematicide. Part 2: Impact on the fitness of various non-target nematodes. *Nematology* **23**:1-17.

Tiunov AV, Trap J, van der Putten W, Vestergård M, Villenave C, Waeyenberge L, Wall DH, Wilschut R, Wright DG, Yang JI, Crowther TW. 2019. Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature* **572**:194-198.

Tuersong W, Zhou C, Wu S, Qin P, Wang C, Di W, Liu L, Liu H, Hu M. 2022. Comparative analysis on transcriptomics of ivermectin resistant and susceptible strains of *Haemonchus contortus*. *Parasites & Vectors* **15**:159.

Turcelová N. 2023. Vliv herbicidu nitisinonu na *Caenorhabditis elegans* [BSc. Thesis]. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.

Vairoletti F, Paulino M, Mahler G, Salinas G, Saiz C. 2022. Structure-Based Bioisosterism Design, Synthesis, Biological Evaluation and In Silico Studies of Benzamide Analogs as Potential Anthelmintics. *Molecules* **27**:2659.

van den Hoogen J, Geisen S, Routh D, Ferris H, Traunspurger W, Wardle DA, de Goede RGM, Adams BJ, Ahmad W, Andriuzzi WS, Bardgett RD, Bonkowski M, Campos-Herrera R, Cares JE, Caruso T, de Brito Caixeta L, Chen X, Costa SR, Creamer R, Mauro da Cunha Castro J, Dam M, Djigal D, Escuer M, Griffiths BS, Gutiérrez C, Hohberg K, Kalinkina D, Kardol P, Kergunteuil A, Korthals G, Krashevska V, Kudrin AA, Li Q, Liang W, Magilton M, Marais M, Martín JAR, Matveeva E, Mayad EH, Mulder C, Mullin P, Neilson R, Nguyen TAD, Nielsen UN, Okada H, Rius JEP, Pan K, Peneva V, Pellissier L, Carlos Pereira da Silva J, Pitteloud C, Powers TO, Powers K, Quist CW, Rasmann S, Moreno SS, Scheu S, Setälä H, Sushchuk A, Tiunov AV, Trap J, van der Putten W, Vestergård M, Villenave C, Waeyenberge L, Wall DH, Wilschut R, Wright DG, Yang JI, Crowther TW. 2019. Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature* **572**:194-198.

Vosála O, Krátký J, Matoušková P, Rychlá N, Štěrbová K, Raisová Stuchlíková L, Vokřál I, Skálová L. 2025. Biotransformation of anthelmintics in nematodes in relation to drug resistance. *The International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance* **27**:100579.

Whittaker JH, Carlson SA, Jones DE, Brewer MT. 2017. Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* **40**:105-115.

WHO. 2023. Soil-transmitted helminth infections. Available from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections> (accessed February 2026).

WHO. 2024. Lymphatic filariasis. Available from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis> (accessed February 2026).

Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC. 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology* **20**:469-76.

WormBase. 2024. Nematode Bioinformatics Resource. Available from <https://wormbase.org> (accessed December 2025).

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**:134.

Zaru R, Orchard S. 2023. UniProt Consortium. UniProt Tools: BLAST, Align, Peptide Search, and ID Mapping. *Current Protocols* **3**:e697.

Zheng Y, Young ND, Campos TL, Korhonen PK, Wang T, Sumanam SB, Taki AC, Byrne JJ, Chang BCH, Song J, Gasser RB. 2024. Chromosome-contiguous genome for the Haecon-5 strain of *Haemonchus contortus* reveals marked genetic variability and enables the discovery of essential gene candidates. *International Journal for Parasitology* **54**:705-715.

9 Samostatné přílohy

Příloha 1: Data reprodukce a přežívání *C. elegans* (Σ - celkový počet potomků (vajíčka a larvy), L1 – počet vylíhnutých larev, M – úhyn (mortalita) samice v průběhu sledování).

Skupina		L4	1.den		2.den		3.den		4.den		Celkem
			Σ	L1	Σ	L1	Σ	L1	Σ	L1	
1	Kontrola	1	5	2	86	28	20	13	0	0	111
	Kontrola	2	9	0	102	43	18	12	2	0	131
	Kontrola	3	2	0	93	27	89	37	1	0	185
	Kontrola	4	4	0	86	32	24	18	3	0	117
	Kontrola	5	2	0	103	21	15	9	1	0	121
	Kontrola	6	3	0	86	39	31	16	3	0	123
	Kontrola	7	7	3	110	48	17	8	0	0	134
	Kontrola	8	1	0	95	29	25	14	4	0	125
	Kontrola	9	30	5	39	4	19	3	6	3	94
	Kontrola	10	38	1	33	3	28	10	8	1	107
	Kontrola	11	13	0	61	15	39	8	10	1	123
	Kontrola	12	44	7	57	4	13	6	5	2	119
	Kontrola	13	21	0	34	27	16	14	2	1	73
2	L-tyrosin	1	6	3	48	26	27 M	21	0 M	0	81
	L-tyrosin	2	13	3	73	46	16	10	2	0	104
	L-tyrosin	3	16	1	59	38	42	36	0	0	117
	L-tyrosin	4	5	1	63	55	18	16	0	0	86
	L-tyrosin	5	10	4	89	31	43	32	1	0	143
	L-tyrosin	6	5	0	67	47	22	11	0 M	0	94
	L-tyrosin	7	2	0	70	26	14 M	6	0 M	0	86
	L-tyrosin	8	8	1	55	41	36	29	2 M	0	101
	L-tyrosin	9	28	3	5	0	27	16	2	0	62
	L-tyrosin	10	32	7	67	30	22	3	1	0	122
	L-tyrosin	11	36	11	54	23	18	9	2	0	110
	L-tyrosin	12	35	3	64	25	39	30	4	1	142
	L-tyrosin	13	38	11	63	34	31	26	8	7	140
3	NTBC	1	7	0	46	18	36	24	15 M	0	104
	NTBC	2	14	8	70	24	19	15	3	0	106
	NTBC	3	6	0	62	29	43	33	10	0	121
	NTBC	4	4	0	71	21	35	27	5	0	115
	NTBC	5	6	2	61	17	28	19	3 M	0	98
	NTBC	6	1	0	55	26	32	26	6	0	94
	NTBC	7	3	0	49	19	19	10	5	0	76
	NTBC	8	5	1	63	30	41	28	9	0	118
	NTBC	9	10	0	17	4	18	9	4	0	49
	NTBC	10	32	1	52	3	24	11	11 M	4	119
	NTBC	11	24	2	37	8	31	2	4	1	96
	NTBC	12	28	4	25	6	13	9	1	1	67
	NTBC	13	26	4	37	9	23	11	5	2	91
4	NTBC+L-tyrosin	1	4	0	69	44	36	33	2	0	111
	NTBC+L-tyrosin	2	2	0	49	46	28	26	9	0	88
	NTBC+L-tyrosin	3	6	0	26	11	21 M	19	0 M	0	53
	NTBC+L-tyrosin	4	2	0	47 M	36	0 M	0	0 M	0	49
	NTBC+L-tyrosin	5	2	0	34	24	17	15	1	0	54
	NTBC+L-tyrosin	6	3	0	39	31	0 M	0	0 M	0	42
	NTBC+L-tyrosin	7	1	0	48	37	0 M	0	0 M	0	49
	NTBC+L-tyrosin	8	4	0	55	42	24 M	21	0 M	0	83
	NTBC+L-tyrosin	9	18	1	31 M	15	0 M	0	0 M	0	49
	NTBC+L-tyrosin	10	7	7	9	7	39	19	9	8	64
	NTBC+L-tyrosin	11	28	4	31	15	25	16	3	1	87
	NTBC+L-tyrosin	12	29	7	15	13	8	8	1 M	1	53
	NTBC+L-tyrosin	13	33	7	41	22	15 M	14	0 M	0	89