

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Stanovení expresních profilů prokineticinů
v různých stádiích klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*)**

Bakalářská práce

Anna Juranová

Školitelka: RNDr. Helena Langhansová, Ph.D.

Školitel-specialista: RNDr. Jindřich Chmelař, Ph.D.

České Budějovice 2022

Juranová, A., 2022: Stanovení expresních profilů prokineticinů v různých stádiích klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). [Determination of prokineticin expression profiles in different stages of the common tick (*Ixodes ricinus*). Bc. Thesis, in Czech.] – 34 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANOTACE

Prokineticins have a wide range of effects on biological functions. These are known mainly in vertebrates. Much remains unknown about the homologs of these proteins in ticks. In order to obtain more information about prokineticins in *Ixodes ricinus* I have been concerned in this work with the determination of their expression profiles in ticks.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

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

V Českých Budějovicích, dne 12.4.2022

Anna Juranová

PODĚKOVÁNÍ

Moc bych chtěla poděkovat mojí školitelce RNDr. Heleně Langhansové, Ph.D za její obrovskou vstřícnost, lidský přístup a též za cenné rady, které jsem od ní získala v průběhu práce. Poděkování také patří RNDr. Jindřichu Chmelařovi, Ph.D., který mi pomáhal při pitvě klíšťat a též na teoretické úrovni. V neposlední řadě děkuji Parazitologickému ústavu (Biologické centrum Akademie věd, v. v. i.), zvláště pak Janu Erhartovi za pomoc při strojení morčat.

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Klíšťata	3
3.2	Klíště obecné	4
3.2.1	Interakce klíště – hostitel.....	5
3.3	Prokineticiny.....	6
3.3.1	Avit prokineticiny	6
3.3.2	Prokineticiny u bezobratlých.....	7
3.3.3	Mamba Intestina toxin-1 (MIT-1)	7
3.3.4	Protein Bv8 a prokineticiny od něho odvozené	7
3.3.5	Vliv prokineticinů	8
4	Materiál a metody	11
4.1	Klíšťata	11
4.2	Hostitelé.....	11
4.3	Sání klíšťat na hostiteli	11
4.3.1	Dospělci.....	11
4.3.2	Nymfy.....	12
4.4	Pitva.....	12
4.4.1	Materiál a pomůcky	12
4.4.2	Postup.....	12
4.5	Izolace RNA	13
4.6	Reverzní transkripce	14
4.7	Navržení a účinnost primerů pro amplifikaci prokineticinových genů	14
4.8	Kvantitativní real-time PCR	16
5	Výsledky	17
5.1	Příprava komplementární DNA.....	17
5.2	Účinnost primerů	18

5.3	Expresní profily genu irmgsg-191510 a irsgmg-161935.....	22
6	Diskuze	24
7	Shrnutí.....	27
8	Seznam zkratek	28
9	Seznam literatury	29

1 ÚVOD

Klíšťata, jakožto ektoparazité přenášející infekční onemocnění, jsou velice sledovanými a zkoumanými organismy. Avšak nejen přenos nemocí, který se ve spojení s klíšťaty tak často skloňuje, je zajímavý pro studium těchto bezobratlých organismů.

Mnoho zajímavých funkcí klíšťat lze pozorovat na molekulární úrovni při kontaktu ektoparazita s hostitelem. Například složky ve slinách klíšťat vykazují značné zapojení v obraně proti biologickým procesům, kterými hostitel disponuje. Obrana hostitele je namířena hlavně proti ztrátě krve, též ve vyvolání zánětlivé reakce na cizí strukturu a další imunitní obranné děje. Na tyto překážky musí klíště aktivně reagovat, a proto disponuje velkým arzenálem látek zajišťujících blokádu těchto dějů (Francischetti et al., 2009). Tyto látky jsou hojně zkoumány pro svůj potenciál v medicíně (Chmelař et al., 2019).

Ač se vědění o této problematice prohlubuje, stále zůstává mnoho neznámých v těchto drobných bezobratlých. Příkladem může být v této práci zkoumaná rodina proteinů zvaných prokineticiny. Původní objev těchto proteinů byl uskutečněn u obratlovců, kde mají vliv na mnoho biologických funkcí (Zhou, 2006). Homology těchto obratlovčích prokineticinů byly zaznamenány i u *Ixodes ricinus*. Ovšem o jejich fyziologické funkci v těchto organismech zatím nejsou žádné poznatky, kromě přehledu o jejich expresi z transkriptomických studií (Chmelař et al., 2008) (Schwarz et al., 2013). Proto je jedním z cílů této práce získat podobné expresní profily vybraných prokineticinových genů v průběhu sání *I. ricinus* na hostiteli.

2 CÍLE PRÁCE

- 1) Literární rešerše současných poznatků o prokineticinech.
- 2) Příprava cDNA z nenasátých, částečně nasátých a plně nasátých nymf *Ixodes ricinus*.
- 3) Příprava cDNA z různých tkání (slinné žlázy, střevo, vaječníky) dospělých samic *I. ricinus*.
- 4) Stanovení expresního profilu prokineticinů v průběhu sání pomocí kvantitativní real-time PCR.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

3.1 KLÍŠŤATA

Klíšťata jsou specializovaní obligátní hematofágní ektoparazité savců, ptáků, plazů a nalezneme je i na obojživelnících (Hoogstraal, 1985). Taxonomicky jsou zahrnována do živočišné říše (Animalia) a dále jsou členěna do kmenu Arthropoda, podkmenu Chelicerata, třídy Arachnida, řádu Parasitiformes, podřádu Ixodida (Cupp, 1991). U klíšťat lze hovořit pouze o třech čeledích, takzvaných „tvrdých“ klíšťatech Ixodidae, dále čeledi „měkkých“ klíšťat Argasidae a poslední je čeleď Nuttalliellidae. Součástí Nuttalliellidae je však pouze jeden druh, který nese název *Nuttalliella namaqua* (Barker & Murrell, 2004).

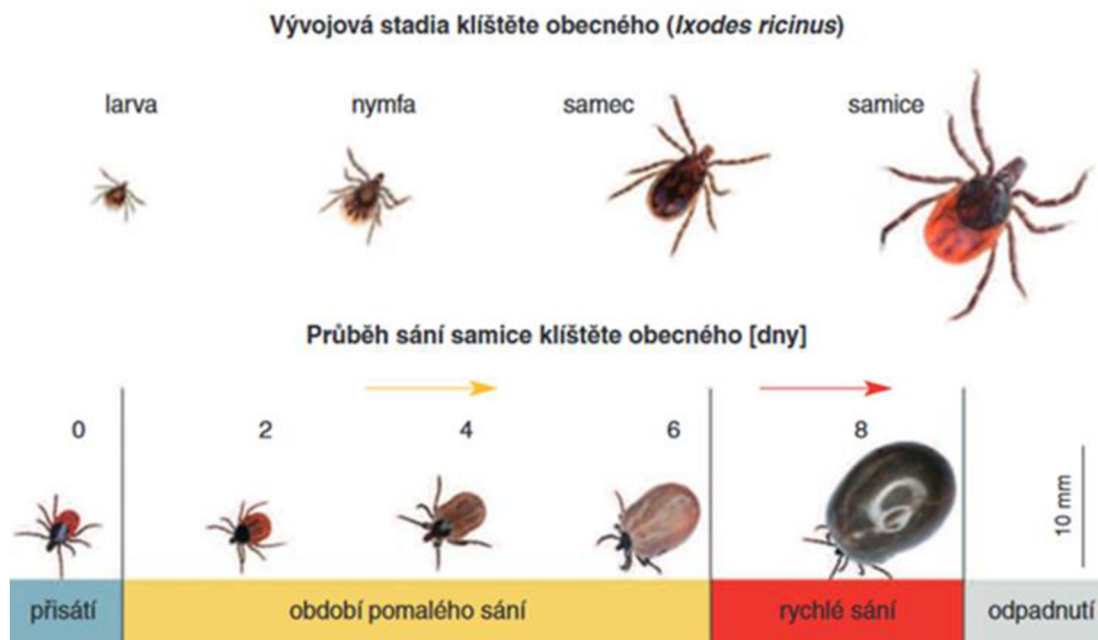
Rozdíl mezi „tvrdými“ a „měkkými“ klíšťaty je v přítomnosti hřbetního štítu (scutum), který nalezneme u Ixodidae, zatímco Argasidae jsou pokryti pouze měkkou kožovitou strukturou (integument). Odlišnosti lze pozorovat i mezi samci a samicemi čeledi Ixodidae. Chitínový štítek u dospělých samců pokrývá celé tělo, čímž je omezeno množství příjmu krve z hostitele. Samicím však tento štítek zasahuje pouze do jedné třetiny těla a zbytek zadečku je z varhánkovité struktury zvané alloscutulum, která může být při nasátí značně rozšířena (Cupp, 1991). Též doba sání je u čeledi klíšťat rozlišujícím znakem. Ixodidae vykazují mnohem delší dobu krmení, v řádech několika dnů až týdnů. Díky tomu přijmou veliké množství krve, která je pak zahušťována a přebytečná voda je slinnými žlázami odvedena zpět do hostitele. U čeledi Argasidae je sání mnohonásobně rychlejším procesem. Doba příjmu krve se pohybuje v řádech minut až hodin a množství nasáté krve koreluje s možnou roztažitelností jejich kožovitého integumentu (Mans et al., 2011).

Obě čeledi mají čtyři vývojová stádia. Vývoj probíhá od vajíčka přes larvální stádium, nymfu až k dospělému jedinci. Larvální stádia se od sebe liší hlavně v počtu končetin. První larvální stádium je šestinohé na rozdíl od druhého, které má nohou osm. Přechod mezi těmito čtyřmi stádii probíhá za svlékání kutikuly, a to po nasátí instaru na hostiteli (Cupp, 1991).

Čeleď Ixodidae zahrnuje dvě bazální linie Prostriata a Metastriata (Black & Roehrdanz, 1998), přičemž tyto linie i celá čeleď mají evoluční původ v Austrálii (Klompen, 2000). Jelikož jsou klíšťata ektoparazité, pojí se s nimi i přenos různých nemocí. Co se týče evropských zemí, nejvíce jsou sledovány právě ty druhy, spadající do Ixodidae, které vykazují nebezpečí možného přenosu onemocnění. Jedná se o *Ixodes ricinus*, kterým je přenášena lymeská borelióza a klíšťová encefalitida, a též o *Hyalomma marginatum*, vektor výše zmíněných nemocí, skvrnitého tyfu a krymsko-konžské krvácivé horečky (*Tick surveillance effort over 2015–2019*, n.d.).

3.2 KLÍŠTĚ OBECNÉ

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je ektoparazitem se čtyřmi vývojovými stádii, jedná se o vajíčko, šestinohou larvu, osminohou nymfu a osminohého dospělce (Obr. 1). Odlišnost mezi instary je nejen v počtu končetin, ale i v hostitelích. Hostitelů je celá škála, avšak platí predikce toho, že nedospělá stádia sají spíše na drobných savcích, ptácích i na kopytnících. Dospělá stádia (především samice, dospělí samci nesají) sají na větších hostitelích, které často představuje skot, jelenovitá zvíř, psi a další (Gray et al., 1992).



Obrázek 1: Vývojová stádia *Ixodes ricinus* a průběh nasávání dospělého v průběhu dní (Erhart, n.d.).

Jelikož je klíště ektoparazitem různých savců, jejich hostitelem se může stát i člověk. Díky tomu jsou klíšťata pro nás určitou hrozbou v přenosu různých onemocnění (Medlock et al., 2013). Nejčastějším přenašečem bývají právě nymfy, které se relativně rychle stihnou úplně nasát a též jsou díky své drobné velikosti snadno přehlédnutelné.

Pro vyhledávání hostitelů klíšťata hojně využívají okolní vegetaci, na kterou vylezou a následně vyčkávají, až kolem nich projde obratlovec, na kterého se uchytí (Gern et al., 2008). Detekce probíhá za pomoci smyslových orgánů a Hallerova orgánu na tarsálních člancích předních končetin, kterými klíště dokáže identifikovat množství světla, teplotu, přítomnost oxidu uhličitého, vibrace a též míru vlhkosti. To všechno klíštěti pomáhá najít správného hostitele pro budoucí sání (Medlock et al., 2013).

3.2.1 INTERAKCE KLÍŠTĚ – HOSTITEL

Při parazitaci dochází k proříznutí svrchní vrstvy kůže hostitele pomocí párových chelicer klíštěte se střídavým pohybem do stran, a též k narušení kapilární sítě. To má za následek tvorbu krevního pohárku. V ústním ústrojí se kromě ozubených chelicer také nachází hypostom se zpětnými háčky a žlábkem. Chelicery, které ohraničují tento žlábek spolu s hypostomem tvoří kanál, kterým je nasávána krev. Tento kanál je však využíván i pro proudění slin vylučovaných klíštětem do hostitele. Sání krve je v intervalech střídáno s vypouštěním slin. Hypostom je též klíšťaťy využíván k ukotvení v hostiteli. Dalším nástrojem k uchycení je struktura jakéhosi pouzdra na konci chelicer, která zároveň slouží i k jejich ochraně (Richter et al., 2013).

Dlouhá doba pro sání, v řádech dnů až týdnů, vyžaduje u klíštěte nutnost úniku před imunitním systémem hostitele, zabránění vzniku zánětlivého stavu v oblasti kousnutí a v neposlední řadě nastolení procesů zabraňujících krevnímu srážení. K této obraně klíšťaťata používají slinné sekrety, které jsou tvořeny nízko- a vysokomolekulárními bioaktivními molekulami. K potlačení hemokoagulace jsou ve slinách obsaženy inhibitory, které zabraňují agregaci krevních destiček, vazbě krevních destiček na fibrinogen a též inhibici trombinu. Pro protizánětlivou reakci sliny klíšťaťat obsahují například proteiny, které slouží k inhibici cytokinů neboli látek přítomných v zánětlivé reakci hostitele. Inhibují regulace prozánětlivých makrofágů a Th1-lymfocytárních cytokinů. Dále imunoprese zprostředkovaná klíšťaťecími slinami zahrnuje inhibici komplementu, potlačení funkčnosti NK buněk (natural killer cells), enzymy proti svědivým reakcím vznikajícím u hostitele, menší proliferaci T-lymfocytů pro aktivaci na mitogen a další. Celkově se tedy jedná o proteiny, které jsou součástí jedinečných klíšťaťecích proteinových rodin, vykazující jak redundantní, tak pluripotentní vlastnosti, což má za následek rozsáhlý vliv na obranné mechanismy hostitele a též imunitní únik klíštěte (Francischetti et al., 2009) (Chmelař et al., 2016) (Wikel, 1999).

Proteinové rodiny prošly evolucí díky genovým duplikacím. Jedná se o příbuzné proteiny, které mají kořeny v jednom společném předku, se kterým buďto sdílí jeho funkčnost, nebo se od jeho původních vlastností liší. Redundance je spojena s proteiny s velice úzkou škálou působnosti a velkou specifitou, kdežto pluripotence u proteinů souvisí s širokým potenciálem zasahovat do různých typů imunitní odpovědi i funkčnosti buněk. Různé vlny vylučování těchto proteinových rodin představují pro klíšťaťata též zbraň v boji proti hostitelské imunitě (Chmelař et al., 2016).

Výše popsané děje napomáhají nejen klíšťaťatům a jejich sání, ale také díky nim vzniká vhodné prostředí pro řadu mikroorganismů. Jedná se například o *Borrelia burgdorferi* a *Anaplasma phagocytophilum* (Narasimhan et al., 2007).

3.3 PROKINETICINY

Historii této rodiny proteinů započal objev takzvaného proteinu A, který byl popsán během analýzy jedu mamby černé *Dendroaspis polylepis*. Protein A byl jedinečný, jelikož nebyl toxický (Joubert & Strydom, 1980). Podobnost s tímto proteinem vykazoval další protein, který byl izolován z kožního sekretu kuňky žlutobřiché *Bombina variegata* a kuňky obecné *Bombina bombina*. Homolog získaný z tohoto sekretu byl pojmenován Bv8 (Negri et al., 2009). Později se při studiu obou příbuzných proteinů, tedy proteinu A a Bv8, prokázal společný znak ve schopnosti stimulace kontrakcí hladkých svalů ilea morčete. Dalším účinkem obou homologů je například vyvolání hyperalgezie neboli stavu, kdy je zvýšena citlivost na bolest (Mollay et al., 1999).

Zkoumání dalších organismů ukázalo další podobné proteiny u savců, které byly nazvány prokineticin 1 (PK1 nebo EG-VEGF) a prokineticin 2 (PK2 nebo mBv8). Tyto savčí prokineticiny měly mimo jiné i funkční podobnost, díky shodnému vlivu na ileum morčete (Negri et al., 2009).

3.3.1 AVIT PROKINETICINY

Prokineticiny spadající do této rodiny obsahují 80–90 aminokyselin. Za typickou strukturu jsou zodpovědné cysteiny, kterých je v proteinu obsaženo deset a dávají tak vzniknout pěti disulfidickým můstkům. Označení AVIT si proteiny vysloužily na základě shody v prvních čtyřech aminokyselinách na N-terminálním konci. Jedná se o aminokyseliny alanin, valin, isoleucin a threonin, které tvoří tuto AVIT doménu. Shoda mezi těmito proteiny je na N-konci a v centrální oblasti, avšak liší se v karboxylových koncích. N-konce jsou pro prokineticiny zásadní, musí vykazovat naprostou shodu pro to, aby byla zaručena jejich správná bioaktivní funkčnost. U C-konců není zapotřebí tak striktní podobnosti, avšak velké změny mohou tuto funkčnost ovlivnit. Často se tedy mluví o tom, že tento konec není tolik důležitý pro biologické funkce jako části, které jsou pro proteiny velice podobné (Bullock et al., 2004) (Kaser et al., 2003).

Proteiny s AVIT doménou jsou obsaženy v mnoha savčích tkáních a mají tendenci vázat se na receptory, které jsou spřaženy s G-proteiny. Tuto AVIT doménu, která je charakteristická pro obratlovce ovšem nenacházíme u všech prokineticinů. Izolované proteiny bezobratlých AVIT doménu postrádají (Lin et al., 2009).

3.3.2 PROKINETICINY U BEZOBRATLÝCH

O prokineticinech u bezobratlých toho zatím není moc známo, avšak u *Pacifastacus leniusculus* (rak signální) byl nalezen endogenní faktor podobný cytokinu, který má prokineticinovou doménu. Faktor zvaný astakin má podíl na krvetvorbě u bezobratlých. Tento astakin patřící korýši obsahuje deset cysteinových zbytků stejně jako prokineticiny. Charakteristická AVIT doména na N-terminálních koncích v případě astakinu není přítomná a díky tomu nedokáže aktivovat savčí prokineticinové receptory (Negri & Ferrara, 2018) (Söderhäll et al., 2005). Peptidy podobné prokineticinům byly též nalezeny v jedu některých pavouků. Opakuje se zde absence AVIT domény a podobnost v rámci deseti cysteinových zbytků, stejně jako u astakinu (Fry et al., 2009).

Výzkum zabývající se slinnými žlázami klíšťat přinesl informace o proteinu z rodiny ixodegrinů. Jedná se o protein bohatý na cystein s funkcí destičkového inhibitoru a s možností ovlivnění vrozené imunity. Ixodegrin obsahuje prokineticinovou doménu a je řazen do superrodiny podobné kolipáze (Trentelman et al., 2020). Kolipáza jakožto koenzym zajišťuje rozklad tuků pomocí lipázy. Obsah deseti cysteinů naznačuje podobnost s MIT-1 (mamba intestina toxin-1) v jeho trojrozměrné struktuře, ale strukturní homologie je pouze 20 % (Schweitz et al., 1999).

3.3.3 MAMBA INTESTINA TOXIN-1 (MIT-1)

Jedná se o polypeptid o velikosti 81 aminokyselin, který je spojen pěti disulfidickými můstky tvořenými z deseti cysteinových zbytků. Když byl peptid poprvé objeven, byl nazván proteinem A (Joubert & Strydom, 1980). Jednalo se o výzkum jedu *Dendroaspis polylepis*, ze kterého byl izolován netoxický protein A. Pozdější výsledky jeho zkoumání prokázaly silný vliv na kontrakce podélné hladké svaloviny ilea a distálního tračníku u morčete, proto byl přejmenován na MIT-1. Ve stejné síle kontrakcí má MIT-1 vliv i na uvolňování, a to v proximální oblasti tlustého střeva. Prokázalo se, že MIT-1 má nejen velmi silnou vazebnou afinitu k membránám ilea u morčat, ale stejně tak se ochotně váže v mozku myši (Zhao et al., 2019) (Schweitz et al., 1999).

3.3.4 PROTEIN BV8 A PROKINETICINY OD NĚHO ODVOZENÉ

Protein Bv8 o velikosti 77 aminokyselin (včetně deseti cysteinů) a molekulové hmotnosti 8kDa byl izolován z kožního sekretu žab *Bombina variegata* a *Bombina orientalis*. Příbuznost s MIT-1 nalezneme jak v počáteční sekvenci, takzvané AVIT doméně, tak v podobnosti účinku. Příkladem může být vyvolání hyperalgezie po aplikování velice malého množství (v řádech mikrogramů) Bv8 do mozku potkana. Přecitlivělost se projevuje po vystavení

potkanů mechanickému tlaku. V případě Bv8 se jedná o stav trvající přibližně hodinu, avšak MIT-1 se projevuje při navozování tohoto stavu ještě aktivněji a účinky lze pozorovat déle. U jedinců s takto aplikovanými proteiny též dochází ke zvýšení krevního tlaku. Dalším znakem příbuznosti je fakt, že oba proteiny jsou shodné v 58 % jejich sekvence (Mollay et al., 1999).

Homology pro Bv8 byly objeveny u řady dalších organismů, jakými jsou například opice, potkani, člověk a další. Silně příbuznými s Bv8 jsou Prokineticin 1 (PK1, též endokrinní žlázo vaskulární endoteliální faktor neboli EG-VEGF) o velikosti 86 aminokyselin a Prokineticin 2 (PK2/mBv8) čítající 81 aminokyselin. Oba dva tyto savčí proteiny, vykazují velikou shodu a sdílí takzvanou AVIT doménu. Lidský PK1 sdílí jak s lidským PK2, tak s myším Bv8 (mBv8) 58% shodu v sekvenci. Při srovnání s původně objeveným Bv8 (z *Bombina variegata*) je shoda 34%. (Bullock et al., 2004) (Li et al., 2001) (Negri et al., 2007).

Receptory (PKR1, PKR2) pro tyto prokineticiny jsou spřaženy s G-proteiny. Řadí se též do skupiny receptorů neuropeptidu Y (NPY), které mají největší procento odlišnosti na N- koncích. Rozličné N-konce receptorů mají za úkol rozeznávání různých ligandů, proto se nachází na vnější straně buňky, na rozdíl od intracelulárních C-konců. Po navázání ligandu putuje signál do intracelulární oblasti, kde je dále přenášen na G-proteiny. Zapojení receptorů spočívá hlavně v přenosu Ca^{2+} iontů (Negri et al., 2007) (Zhang et al., 2015).

Bylo prokázáno, že tyto receptory jsou přítomny v orgánech trávicího traktu a endokrinních žlázách. Přítomnost PKR1 byla pozorována ve varleti, prodloužené míše, kosterním svalstvu, kůži a vůči PKR2 je více exprimován v trávicím traktu, proto lze předpokládat jeho hlavní roli v této orgánové soustavě. Vysoká exprese PKR2 je pozorována spíše v centrální nervové soustavě (Lin et al., 2002) (Soga et al., 2002). Souvislost je zřejmá i u prokineticinů samotných, jelikož exprese PK1 je značná v trávicím traktu, steroidních žlázách (varlatech, vaječnicích, placentě a nadledvinách) a PK2 je prokázán v tenkém střevě, nicméně v menším množství nežli PK1 (Soga et al., 2002). Vzhledem k expresi prokineticinů a jejich receptorů v mnoha tkáních se předpokládá jejich zapojení do široké škály dějů v organismu.

3.3.5 VLIV PROKINETICINŮ

Výzkum vlivu na biologické aktivity podnítl objev vlivu MIT-1 a Bv8 na kontrakce hladkého svalstva morčecího ilea již při minimální koncentraci. Pokusu byly též podrobeny ilea myši a potkanů, které za větší koncentrace Bv8 vykazovaly stejný trend, podobně jako při působení na králičí lačník (Mollay et al., 1999). Později se však ukázalo, že prokineticiny hrají roli ve velkém množství fyziologických aktivit.

Jeden z vlivů byl pozorován u cirkadiánních rytmů. Savci mají centrum pro tento biorytmus uložený v hypothalamu, konkrétně v místě označovaném jako suprachiasmatická jádra. Právě v tomto místě byl prokázán velký výskyt mRNA PK2 během dne. Během noci však hladiny PK2 byly téměř nedetekovatelné. Za expresi PK2 jsou zodpovědné takzvané cirkadiánní hodiny udávající cirkadiánní rytmus. Bylo prokázáno, že při nefunkčnosti těchto hodin nedochází k zmíněné expresi mRNA PK2 v suprachiasmatických jádrech (Zhou & Cheng, 2005). Avšak dalším faktorem ovlivňujícím rytmus s PK2 je světlo, což bylo prokázáno během pokusu, který pozoroval změny v rytmech při rozsvícení světla během začátku či konce noci. Výsledkem byl předstih či zpoždění PK2 rytmu v suprachiasmatických jádrech, což mělo dopad na posun rytmu (Cheng et al., 2002). Při odlišném pokusu se ukázalo, že po dodání PK2 intracerebroventrikulární injekcí, tedy přímo do mozkomíšního moku v mozkových komorách, dojde během noci k inhibici noční aktivity myši. Dále PK2 zřejmě také působí na spánek a bdělý stav, tato myšlenka vychází z faktu, který poukazuje na expresi PKR2 ve zrakových jádrech a jádrech pro regulaci spánku a bdění (Zhou & Cheng, 2005).

Zjištění, že prokineticiny hrají roli při vnímání bolesti, odhalilo pozorování, při kterém byly sledovány stavy zvýšené citlivosti na mechanické a tepelné podněty po vpravení Bv8/PK2 do mozku potkana (Mollay et al., 1999). PKR1 i PKR2 jsou exprimovány v dorzálních kořenových gangliích a míše. Nepřítomnost PKR1 způsobuje zhoršení detekce bolesti na podněty jako jsou teplo, kapsaicin, mechanické podněty a další. Předpokladem tedy je, že PKR1 je důležitým k aktivaci TRPV1, který zprostředkovává chemické a tepelné podněty, jež působí na vyvolání bolesti primárními senzoryckými neurony. Zánětlivá bolest bývá často způsobena PK2, který působí jako ligand pro PKR1. Díky tomu, že je PK2 exprimován v neutrofilech, s jejichž pomocí se dostane do místa zánětu a následně má vliv na makrofágy a prozánětlivé cytokiny, hraje zásadní roli v bolesti při zánětu. Potvrzuje to i experiment, který ukazuje, že myši, které postrádají PK2, mají sníženou nocicepci vyvolanou tepelnými a chemickými podněty. Díky tomu se uvažuje o možném zablokování PKR1 pro terapeutické využití v boji proti bolesti (Negri et al., 2006) (Zhou, 2006).

Prokineticiny jsou spjaty se spoustou dalších biologických funkcí. Příkladem je PK1, který podporuje proliferaci a přežívání endoteliálních buněk, je též hojně exprimován v Leydigových buňkách ve varlatech a má se za to, že podporuje jejich endokrinní aktivitu. Větší exprese byla také například pozorována při rakovině tlustého střeva, kde se účastní procesu angiogeneze a proliferace buněk (Negri et al., 2009). Studie u myši též prokázaly, že prokineticiny mají vliv na ochranu kardiomyocytů před oxidativním stresem a brání infarktu myokardu. Aktivací PKR1 je chráněn myokard před infarktem a také je jím indukována angiogeneze, za kterou je zodpovědný PK2 (Urayama et al., 2007).

Prokineticiny jsou součástí mnoha důležitých biologických procesů a představují důležitou roli v regulacích správné funkce organismů. Jejich vlastnostmi otevírají široké pole působnosti pro výzkum, který by mohl být v budoucnu prospěšný k různým typům léčebných procesů a hlubšímu pochopení propojení mezi biologickými funkcemi a prokineticiny. Funkce prokineticinů u klíšťat není známá, proto chce tato práce přispět k jejímu poznání.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 KLÍŠŤATA

Pro práci byla využita klíšťata získaná díky spolupráci s Parazitologickým ústavem (Biologické centrum Akademie věd, v. v. i.). Jednalo se o neinfekční jedince z tamějšího chovu, což v tomto případě byly dospělé samice a nymfy *Ixodes ricinus*, které následně sloužily pro izolaci RNA.

4.2 HOSTITELÉ

Zdrojem krve pro klíštěcí sání byli hlodavci. V případě nasávání dospělců bylo využito 5 morčat *Cavia porcellus*. Morčata byla konvenčně chována Parazitologickým ústavem AVČR pro laboratorní účely za podmínek daných zákonem na ochranu zvířat proti týrání. Krmena byla komerční krmnou směsí pro morčata a do vody byl přidáván vitamín C. Naopak nymfy sály na inbredních SPF myších kmene C3H/HeN. Jednalo se o 3 myši samice, stáří osmi týdnů, které byly dodány firmou Velaz, s.r.o. Myši byly umístěny do chovných nádob ve sterilním prostředí zvěřince v bariérovém chovném systému IVC s řízenou fotoperiodou. Krmeny byly sterilní směsí pro hlodavce a vodou, vše *ad libitum*. Ve zvěřinci docházelo k nepřetržitému monitoringu teploty dosahující 20–24 °C a vlhkosti okolo 55 %.

4.3 SÁNÍ KLÍŠŤAT NA HOSTITELI

4.3.1 DOSPĚLCI

Nasazení dospělců *I. ricinus* na morčata bylo prováděno ve spolupráci s Parazitologickým ústavem AVČR. Morčatům byl nejprve intramuskulárně injikován Narkamon (100 mg/kg živé hmotnosti) firmy BIOVETA a. s. pro navození krátkodobého stavu narkózy. Uspaným morčatům byla vyholena záda, kam byly aplikovány takzvané kloboučky (jakési ohrádky, které se morčeti přilepí na kůži). Do těchto kloboučků bylo každému z morčat vsazeno 30–35 samic *I. ricinus* z chovu. Také byli přidáni samci z důvodu potřeby sajících samic.

Pro účely práce byla použita nenasátá klíšťata (značena D0) a též klíšťata postupně odebíraná z kloboučků morčat po 24 hodinách. Jedná se tedy o klíšťata odebíraná od prvního dne sání (D1) až po plné nasátí v osmém dni (D8) s výjimkou pátého a sedmého dne. Počty odebíraných jedinců *I. ricinus* v průběhu dní byly následující: D0–D3 = 15 samic, D4, D6, D8 = 9 samic. Celkově bylo spotřebováno 87 samic (15 nenasátých a 72 polo/nasátých).

Z důvodu nevyhovující cDNA ze slinných žláz, která byla prokázána v následných měřeních, byla připravena cDNA z tohoto orgánu znovu. V tomto případě bylo na dvě morčata dohromady nasazeno 60–70 dospělých samic *I. ricinus*.

4.3.2 NYMFY

Nymfy byly na inbrední myši aplikovány velice podobně. Myším byla vyholena hřbetní část a následně nasazeny plastové kloboučky, které byly zajištěny náplastí. Do každého kloboučku bylo nasazeno 20 nymf. Sání probíhalo po tři dny do plného nasátí. Stejně jako u dospělců byly využity i nenasátí jedinci (D0).

Přísáté nymfy na hostiteli byly postupně odebírány po 24-hodinových intervalech. Celkově tedy bylo spotřebováno 80 nymf (30 nenasátých a 50 polo/nasátých) v těchto počtech: D0 = 30 nymf, D1 = 12 nymf, D2 = 18 nymf, D3 = 20 nymf.

4.4 PITVA

4.4.1 MATERIÁL A POMŮCKY

Pro pitvu byl využit výše zmíněný klíčecí materiál, který byl získán ze sání na hlodavčích hostitelích. Pitvány byly všechny dospělé samice z každého intervalu sání. U nymf sloužila jako předmět pitvy klíš'ata, která sála po dobu dvou (D2) a tří dnů (D3), a to kvůli nevyhovujícím předešlým Ct hodnotám z nepitvaných jedinců v tomto intervalu sání. Použité pomůcky k pitvání byly následující: binolupa, podložní sklíčka, oboustranná lepicí páska, bezpolštářková náplast, mikronůžky, 2 pinzety s jemnou špičkou, buničitá vata dělená, stříkačka 10 ml, jehla 18G, PBS z DEPC vody, RNaseZap™ (Sigma-Aldrich), mikrozkušavky Eppendorf s Tri Reagent (Molecular Research Center, Inc.), box s ledem.

4.4.2 POSTUP

Nejprve byla na podložní sklíčko nalepena oboustranná lepicí páska, na kterou byla následně nalepena náplast tak, aby lepidlo strana náplasti směřovala vzhůru. Dále byli na takto připravené podložní sklíčko položeni jedinci *I. ricinus*, kteří byli následně zakápnuti kapkou PBS (Obr. 2).



Obrázek 2: Jedinci *I. ricinus* připraveni k pitvě.

Následovalo nastříhnutí dolní části idiosoma a odstranění celé horní alloscutula. Odebíranými orgány byly: slinné žlázy, střeva a vaječníky. V případě střev bylo u více nasátých jedinců provedeno promytí tak, aby co největší množství hlodavčí krve bylo z tkáně odstraněno. Orgány byly následně vkládány do mikrozkušavek s 500 μ l Tri Reagent.

Z dospělých samic *I. ricinus* byly vytvořeny vzorky následujícím způsobem: z každého dne v době sání D0–D3 bylo pitváno 15 samic, vypitvány byly tři výše zmíněné orgány (slinné žlázy, střevo a vaječníky), pro každý typ orgánu byly založeny 3 mikrozkušavky s Tri Reagent, do každé bylo vloženo 5 vzorků.

Pro dobu sání D4, D6 a D8 byl postup stejný, avšak počet pitvaných samic odpovídal devíti a do zkumavek se orgány vkládaly po 3 vzorcích. Celkově tedy z každého dne vzniklo 9 vzorků pro následnou izolaci RNA, tudíž celkový počet vzorků odpovídal 63 vzorkům (po 21 vzorcích z každého orgánu).

Kvůli nevyhovující kvalitě cDNA ze slinných žláz bylo vypitváno 95 (D0=29, D1=35, D2=31) dospělých samic navíc. Vzorky ovšem obsahovaly pouze slinné žlázy pro novou cDNA.

Vzorky z nymf byly vytvořeny jako celotělové homogenáty v těchto počtech: D0=30 nymf, D1= 12 nymf, D2=18 nymf, D3=20 nymf. Jedinci ze sacího intervalu D2 a D3 byli navíc zbaveni většiny krve. Všechny vzorky byly vloženy do mikrozkušavek s Tri Reagent a uloženy při teplotě -70°C .

4.5 IZOLACE RNA

V tomto kroku probíhala extrakce RNA z tkání *I. ricinus*. Použitými tkáněmi pro extrakci RNA, byly předem připravené tkáně dospělých samic a nymf. Extrakce klíštěcích tkání pomocí Tri Reagent probíhala podle následujícího postupu.

Nejdříve byly tkáně zhomogenizovány sterilním tloučkem a poté nechány 5 min odstát při pokojové teplotě (RT). Následně bylo přidáno 100 μl chloroformu (MP Biomedicals) a vše bylo vortexováno na maximální otáčky po dobu 15 sekund. Poté byly vzorky znovu ponechány odstát, tentokrát 2 min při RT. Po uplynutí této doby byly přemístěny na 15 min do chlazené centrifugy na 12 000 g. V dalším kroku byly odebrány horní fáze do čistých RNase-free zkumavek, do kterých byl přidán isopropanol (Fisher BioReagentsTM) v poměru 1:1 (tedy cca 270 μl) a GlycoBlue (Thermo Fisher Scientific) o objemu 0,9 μl . Tato směs byla 10x promíchána v ruce a ponechána odstát 10 min při RT. Po uplynulé době po odstání byly vzorky stočeny po dobu 10 min při 10 000 g, opět v chlazené centrifuze. Z vyjmutých vzorků byl slit supernatant a bylo přidáno 800 μl 80 % etanolu (VWR Chemicals). Následovalo 7 min stočení v chlazené centrifuze při 10 000 g. Ze vzorků byl znovu slit supernatant, zkumavky osušeny a naposledy vloženy do centrifugy na 15 sekund při 10 000 g. Zbylá tekutina byla odsáta pipetou a otevřené vzorky byly ponechány 5 min vysychat na vzduchu. Po odpaření zbylé nežádoucí tekutiny, bylo přidáno 20 μl čisté vody (PCR grade), ve které byl vzorek rozpuštěn. Koncentrace takto připravené RNA byla následně změřena na Nanodropu (IMPLEN, P330).

4.6 REVERZNÍ TRANSKRIPCE

Extrahovaná RNA získaná v předešlém kroku, byla podrobena přepisu do cDNA pomocí Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Vzorky pro reverzní transkripci byly připraveny podle následujícího schématu zobrazeného v tabulce (I).

Tabulka I Reakční směs na přípravu reverzní transkripce pro 1 vzorek (30 µl reakce):

Oligo dT primer	1,5 µl
Pufř	6 µl
Inhibitor RNáz	0,75 µl
dNTPs	3 µl
Reverzní transkriptáza	0,75 µl
Voda + RNA	18 µl

Jak ukazuje tabulka (I.), součet vody a RNA dodaného do reakce byl roven 18 µl, avšak množství jednotlivých sčítanců bylo vypočítáno z celkového množství směsi pro reverzní transkripci. Pro vaječníky a slinné žlázy z dospělých samic byla hodnota celkového množství pro reverzní transkripci 1000 ng, stejně jako u nymf. Rozdílná hodnota odpovídající 2500 ng, byla použita u střev dospělců.

Proces reverzní transkripce připravených reakčních směsí probíhal v thermocycleru (GeneAmp® PCR System 9700) za těchto podmínek: 55 °C po dobu 30 min, 85 °C po dobu 5 min (zde probíhala inaktivace reverzní transkriptázy) a neomezené chlazení při 4 °C.

Nově vzniklá cDNA byla 5x zředěna čistou PCR vodou a uložena při teplotě -20°C.

4.7 NAVRŽENÍ A ÚČINNOST PRIMERŮ PRO AMPLIFIKACI PROKINETICINOVÝCH GENŮ

Sekvence pro prokineticinové primery byly vybírány s pomocí RNDr. Jindřicha Chmelaře, Ph.D. Vycházeli jsme ze SOČ Kláry Činátlové (*Charakteristika a funkční analýza proteinů rodiny prokineticinů z klíštěte Ixodes ricinus* [Maturitní práce], 2019), která se prokineticiny zabývala. Vybrané sekvence primerů byly zpracovány v programu Geneious. Následně byly primery syntetizovány firmou Generi Biotech s.r.o.

Každý pár primerů byl podroben určení jejich účinnosti (kapitola 5.2). Templátem pro tento postup pomocí qPCR byla směsná cDNA ze všech tří tkání (slinné žlázy, střevo a vaječníky) dospělých samic *I. ricinus*, které pocházely ze závěrečné fáze sání (D6–D8). Tato cDNA byla rozředěna desítkovou řadou a ze získaných Ct (cycle of threshold/prahová hodnota cyklu) hodnot byla vypočtena účinnost primerů podle vzorce:

$$\text{Efficiency}(\%) = \left(10^{\frac{-1}{\text{The Slope Value}}} - 1 \right) \times 100 \quad 1$$

The Slope Value = sklon mezi logaritmicou škálou ředění a průměrnými hodnotami Ct
 Díky tomu byla získána hodnota účinnosti primerů, která by se měla nacházet ve škále
 90–110 % (*How To Calculate PCR Primer Efficiencies*, 2017).

Tabulka II Přehled prokineticinových primerů:

Název primeru	Sekvence (5' → 3')	Velikost ampliconu (bp)
Irsgmg-152081_21 F Irsgmg-152081_184 R	AGGACAGCAGCCAGTCTTTC CTTTAGGCTGGCAGGTGGAA	164
SigP-156612_165 F SigP-156612_259 R	TTCCACCTGCCAGCCTAAAG CTGTTTGACACGGGCAAAGG	95
SigP-154969_40 F SigP-154969_174 R	GGCTTTCCTTCCGGTCCTAC TTTAGGTTGACAGGTGGCCC	135
SigP-156579_86 F SigP-156579_204 R	CGTGTGGCAACTACAGGAGT CTCCTCTGAGCACAGCTGTC	119
Ir2-11069_55 F Ir2-11069_194 R	TCACAATCAGAGTGTGGCGT TGACCTTTGTAGCTGTTCGGC	140
Irmgsg-167388_60 F Irmgsg-167388_174 R	ATCAGAGTGTGGCGTTGACC ACCCTCTTTGCGATCAGAGC	115
Irmgsg-165735_48 F Irmgsg-165735_179 R	ACGAGACTGTAGCAATGGCC CCTTGGTAAGGTTGGTCCCC	132
Irmgsg-191510_72 F Irmgsg-191510_194 R	CAATGGCCAGTGTGTCTGC GCATTGTTGTAGGGTGCCTC	123
Irsgmg-161935_72 F Irsgmg-161935_192 R	TCCACCTCCTGGAGATGTGT CAGAGGCTTGCAAATGGCTG	121
Irsgmg-153552_48 F Irsgmg-153552_213 R	TCCCCCTGGCGTTTCTACTA ACCCTTAATTGGAGCGTCCG	166

4.8 KVANTITATIVNÍ REAL-TIME PCR

Reakční směs pro qPCR byla tvořena podle následujícího schématu v tabulce (III.)

Tabulka III Reakční směs pro 1 vzorek (10 μ l):

FastStart Universal SYBR Green Master Mix (Roche)	5 μ l
Voda	3,4 μ l
Prokineticinové primery F+R (10 μ M)	0,3+0,3 μ l
5x ředěná cDNA	1 μ l

Vzorky byly pipetovány v technických triplikátech, tudíž vzniklo 63 vzorků s cDNA z dospělých samic a 36 vzorků s cDNA z nymf. V obou případech byl vždy k těmto počtům reakcí zařazen ještě triplikát NTC (no template control), do které místo 1 μ l cDNA bylo přidáno stejné množství PCR vody.

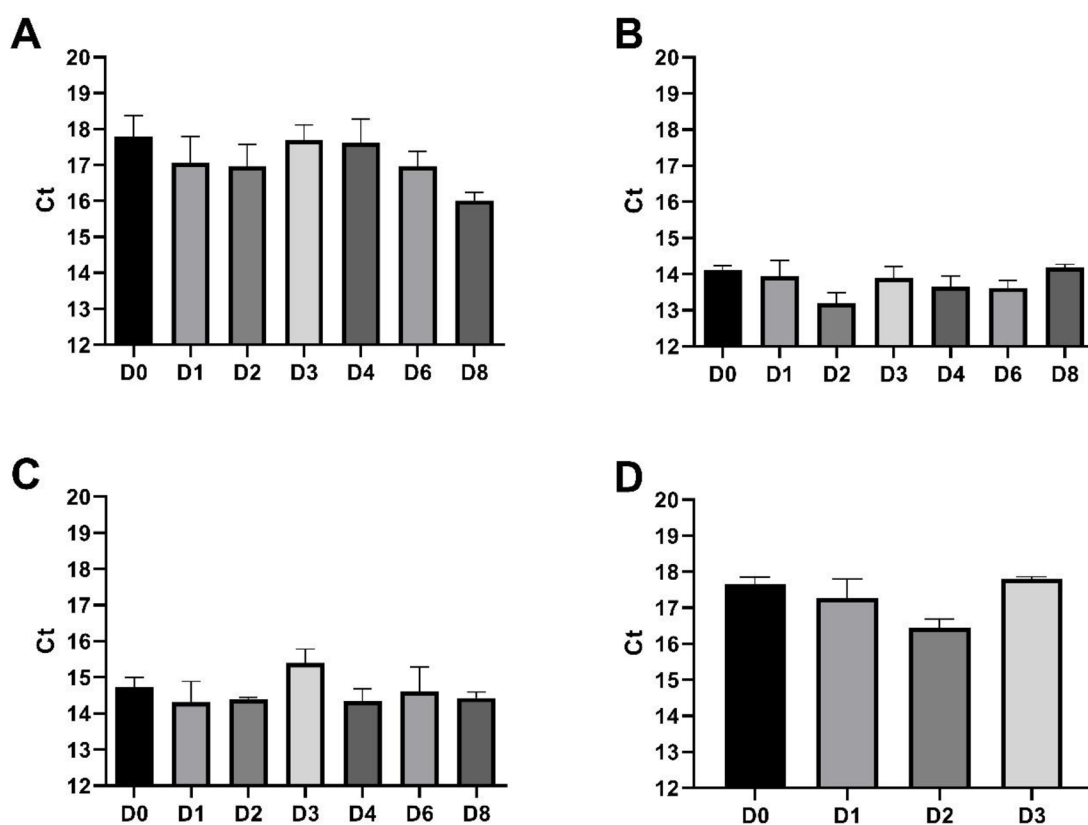
Reakční směsi byly poté vloženy do termocycleru Rotor-gene 6000 (Corbett research) kde byly podrobeny následujícím podmínkám. Počáteční denaturace probíhala po dobu 10 minut při teplotě 95 °C. Následně byl 45x opakovaný cyklus, který se skládal z: denaturace při teplotě 95 °C po dobu 15 sekund, nasedání primerů při 60 °C po dobu 10 sekund, syntetizování DNA vláken při 72 °C po dobu 30 sekund. Analýza křivky tání probíhala při teplotě 70–95 °C.

Data vzešlá touto cestou byla analyzována pomocí Livakovy metody $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Jedná se o porovnání hodnot relativní exprese požadovaného genu (v tomto případě prokineticinové geny) s relativní expresí genu referenčního (Livak & Schmittgen, 2001). Jako srovnávací referenční geny pro *I. ricinus* byly v tomto případě využity *ef-1* neboli elongační faktor 1 α o délce ampliconu 105 bp (MN728895.1, forward primer 5'-CTGGGTGTGAAGCAGATGAT-3' a reverse primer 5'-GTAGGCAGACACTTCCTTCTG-3') a *rps4* neboli ribosomální protein S4 (MN728897.1, 5'-GGTGAAGAAGATTGTCAAGCAGAG-3' a 5'-TGAAGCCAGCAGGGTAGTG-3') o délce ampliconu 80 bp.

5 VÝSLEDKY

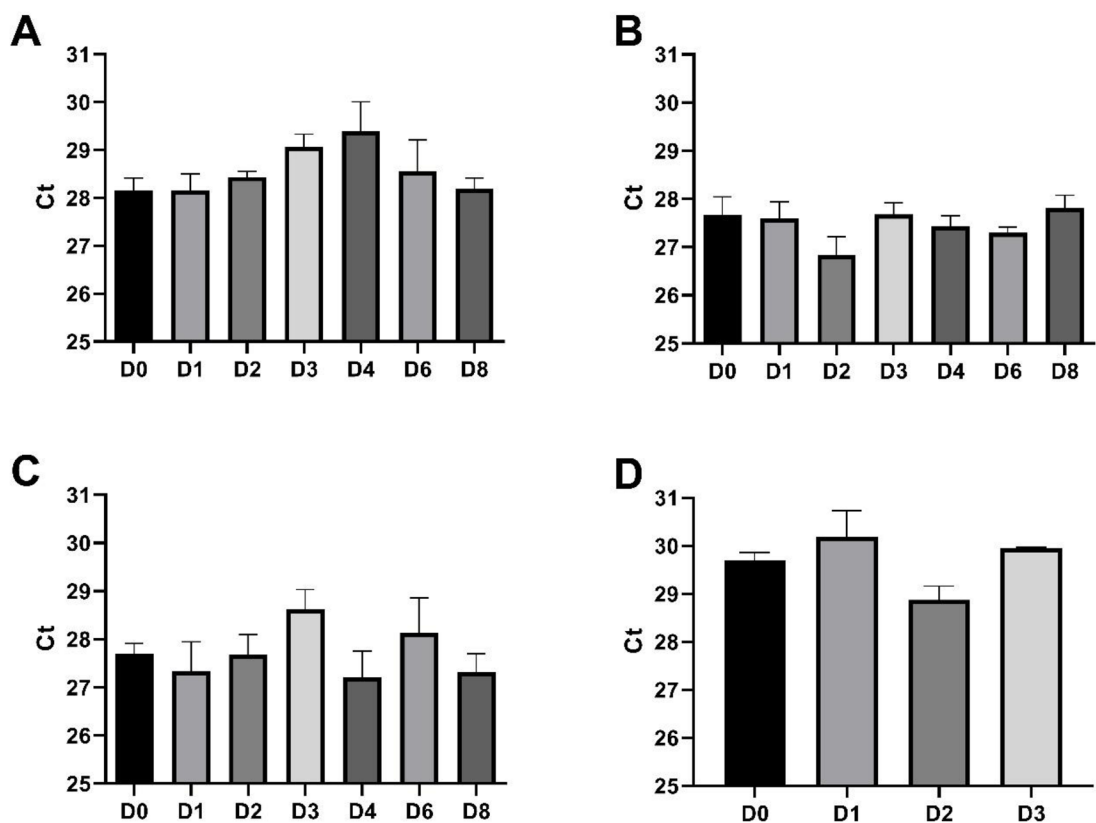
5.1 PŘÍPRAVA KOMPLEMENTÁRNÍ DNA

Z dospělých samic a nymf *Ixodes ricinus* byla připravena cDNA ve fázích sání D0–D8 (nultý – osmý den sání) u dospělých samic a D0–D3 u nymf. Kvalita této komplementární DNA byla ověřena stanovením expresních profilů referenčních genů *ef-1* (Obr.3) a *rps4* (Obr.4).



Obrázek 3: Amplifikace referenčního genu *ef-1* pro cDNA z nymf (D) a slinných žláz (A), vaječnicků (B) a střev (C) dospělých samic *I. ricinus*, které se sály po dobu 1 (D1), 2 (D2), 3 (D3), 4 (D4), 6 (D6) a 8 (D8) dní, či byly v nenasátém stavu (D0).

Expresa *ef-1* ve slinných žlázách (Obr. 3A) měla ke konci sání klesající tendenci, zatímco u střev (Obr. 3C) a vaječnicků (Obr. 3B) lze na grafech pozorovat víceméně konstantní expresi. Hodnoty pro *ef-1* u nymf vykazují postupné snížení exprese v průběhu sání s následným zvýšením na jeho konci (Obr. 3D).



Obrázek 4: Amplifikace referenčního genu *rps4* pro cDNA z nymf (D) a slinných žláz (A), vaječniců (B) a střev (C) dospělých samic *I. ricinus*, které se sály po dobu 1 (D1), 2 (D2), 3 (D3), 4 (D4), 6 (D6) a 8 (D8) dní, či byly v nenasátém stavu (D0).

Gen *rps4* vykazoval ve slinných žlázách a vaječnicích menší variabilitu, rozdíly v Ct hodnotách se zde pohybují okolo 1 cyklu. Ve slinných žlázách se do třetího dne mírně zvyšovala exprese *rps4* a následně docházelo zase k jejímu snižování (Obr. 4A). Exprese *rps4* ve vaječnicích byla téměř konstantní po celou dobu sání (Obr. 4B). Hodnoty pro nymfy ukazují spíše konstantní expresi s malým poklesem ve druhém dni sání (Obr. 4D). Tento referenční gen byl následně vybrán pro stanovení exprese prokineticinových genů.

5.2 ÚČINNOST PRIMERŮ

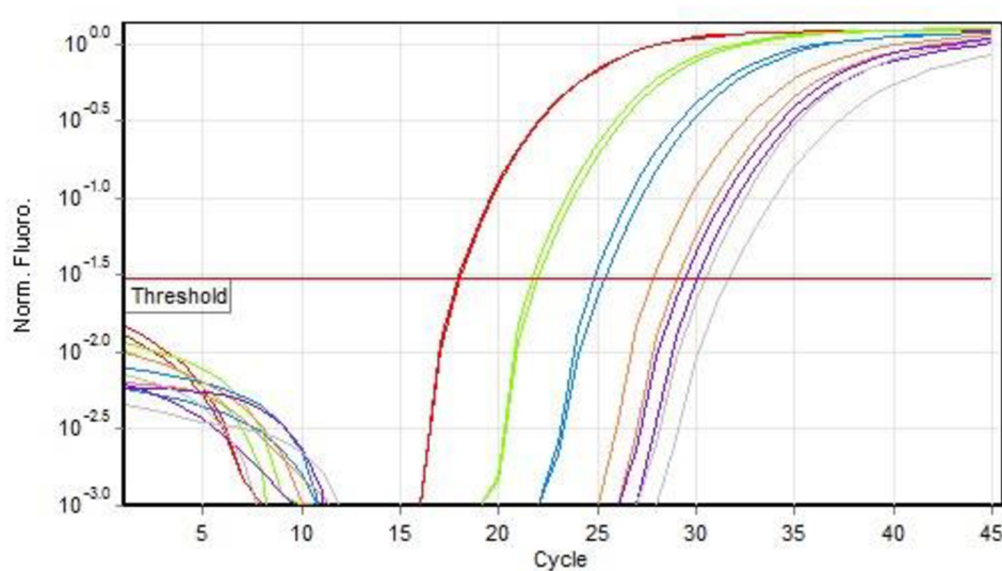
Pro určení účinnosti námi navržených prokineticinových primerů byly sledovány Ct hodnoty jednotlivých ředění a křivka tání směsné cDNA (slinné žlázy, střevo a vaječníky) z dospělých samic *I. ricinus*. Důraz byl kladen na Ct hodnotu pro první ředění vzorku. Na základě získaných hodnot byla vypočtena účinnost těchto primerů viz tabulka (IV).

Tabulka IV Přehled účinnosti primerů:

Název primeru	PCR produkt	Ct v ředění 10x	Komentář	Účinnost
Irsgmg-152081_21 F Irsgmg-152081_184 R	Ano	21,8	dimery	N/A
SigP-156612_165 F SigP-156612_259 R	Ne	N/A		N/A
SigP-154969_40 F SigP-154969_174 R	Ano	30,47	Pozdní Ct: náhodné jevy + dimery	N/A
SigP-156579_86 F SigP-156579_204 R	Ne	N/A		N/A
Ir2-11069_55 F Ir2-11069_194 R	Ano	39,14	Extrémně pozdní Ct	N/A
Irmgsg-167388_60 F Irmgsg-167388_174 R	Ne	N/A		N/A
Irmgsg-165735_48 F Irmgsg-165735_179 R	Ne	N/A		N/A
Irmgsg-191510_72 F Irmgsg-191510_194 R	Ano	20,33	OK	100,6
Irsgmg-161935_72 F Irsgmg-161935_192 R	Ano	25,11	OK	101,3
Irsgmg-153552_48 F Irsgmg-153552_213 R	Ano	24,35	dimery	N/A

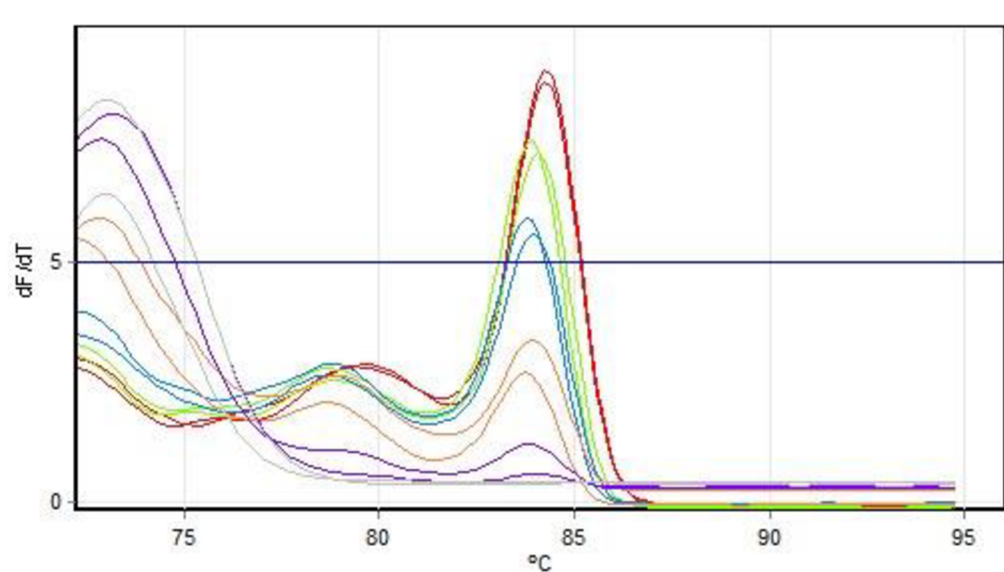
U většiny primerů se nepodařilo stanovit účinnost zřejmě kvůli malému množství templátu v reakci. Některé primery též vykazovaly tvorbu nespecifických PCR produktů (dimerů). Účinnost tedy byla stanovena pouze u primerů pro geny *irmgsg-191510* a *irsgmg-161935*.

Průběh qPCR amplifikace za použití primerů: Irsgmg-152081_21 F, Irsgmg-152081_184 R (Obr. 5 a 6) a Irsgmg-161935_72 F, Irsgmg-161935_192 R (Obr.7 a 8).



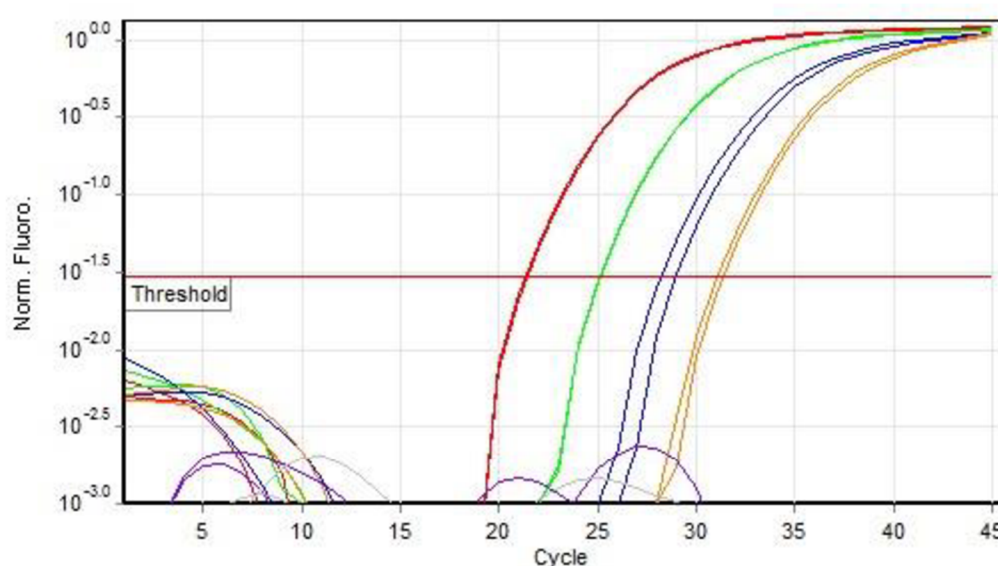
Obrázek 5: Ct hodnoty při PCR amplifikaci genu irsgmg-152081. Ředění vzorků desítkovou řadou je znázorněno barevně: neředěný vzorek (červená), 10x (zelená), 100x (modrá), 1000x (oranžová), 10000x (fialová). Šedou barvou je reprezentována NTC.

Podle očekávání byla nejdříve zaznamenaná hodnota Ct neředěného vzorku (červená). Dále byly zaznamenávány křivky podle míry ředění, avšak pro 10000x ředěný vzorek není zaznamenaný odstup od oranžové křivky, který by měl činit 3,3 cyklu. Produkt byl zaznamenan i ve vzorku NTC (šedá), která naznačuje nespecifické produkty či kontaminaci (Obr. 5).



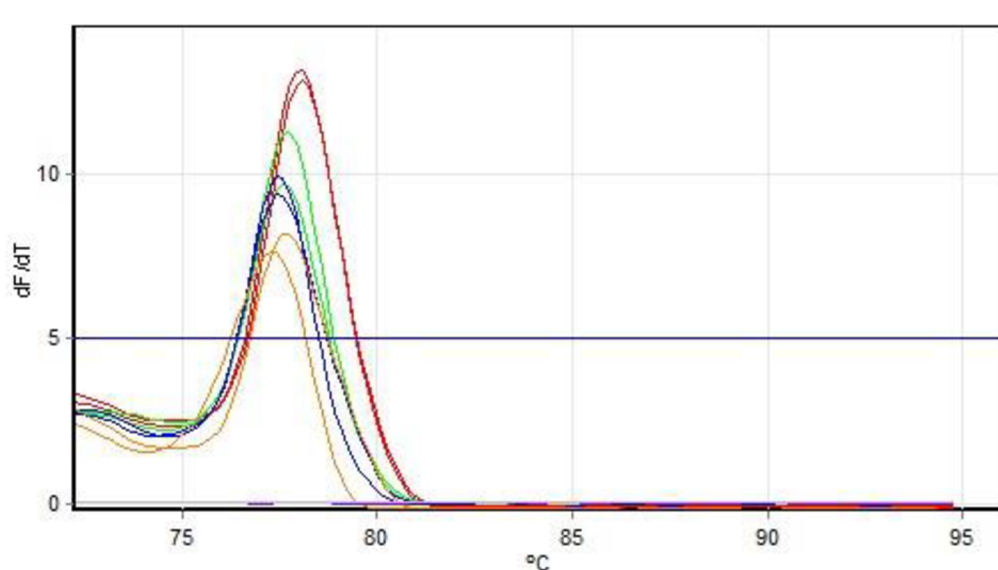
Obrázek 6: Křivka tání PCR produktu irsgmg-152081.

Nejednota křivky tání a přítomnost více vrcholů křivky naznačuje tvorbu dimerů nebo jiných nespecifických produktů PCR reakce (Obr. 6).



Obrázek 7: Ct hodnoty při PCR amplifikaci genu irsgmg-161935. Ředění vzorků desítkovou řadou je znázorněno barevně: neředěný vzorek (červená), 10x (zelená), 100x (modrá), 1000x (oranžová), 10000x (fialová). Šedou barvou je reprezentována NTC.

První zaznamenaná křivka náležela též neředěnému vzorku s průměrnou hodnotou Ct 21,40. Dalšími hodnotami byla ředění 10x, 100x a 1000x. Křivka pro ředění 10000x nebyla zaznamenaná z důvodu vysokého rozředění, což způsobilo nedostatek templátu pro primer. Díky nepřítomnosti křivky pro NTC lze též potvrdit, že nedošlo ke kontaminaci a zároveň předpokládat specifitu produktu PCR (Obr. 7).

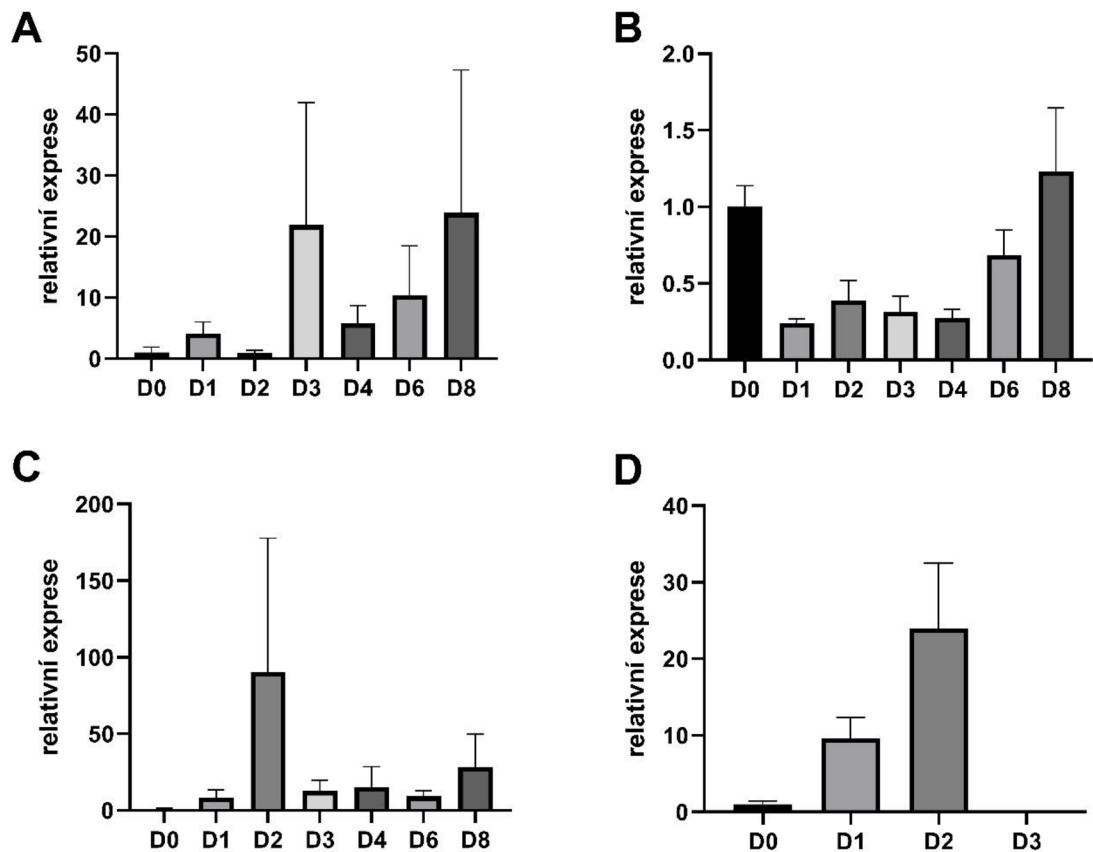


Obrázek 8: Křivka tání PCR produktu irsgmg-161935.

Křivka tání na obrázku tvoří pouze jeden vrchol, díky tomu lze předpokládat pouze specifický PCR produkt (Obr. 8).

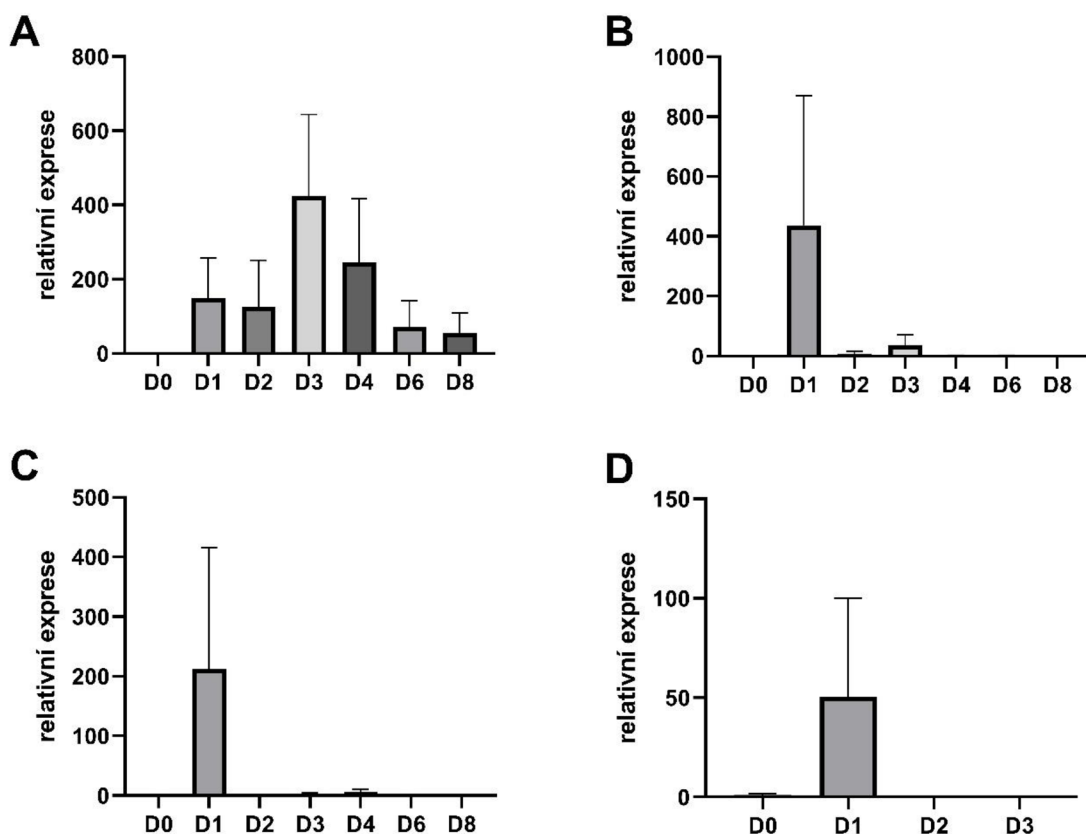
5.3 EXPRESNÍ PROFILY GENU IRMGSG-191510 A IRSGMG-161935

Vzhledem k výsledkům účinnosti většiny primerů byly stanoveny expresní profily pouze u dvou genů *irsgmg-161935* a *irmgsg-191510* (Obr. 9 a 10). Pro analýzu byla využita již připravená cDNA ze tří orgánů dospělých samic a komplementární DNA původem z nymf *I. ricinus*.



Obrázek 9: Expresní profil genu *irsgmg-161935* ve slinných žlázách (A), vaječnicích (B) a střevech (C) dospělých samic a nymf (D) *I. ricinus*, které se sály po dobu 1 (D1), 2 (D2), 3 (D3), 4 (D4), 6 (D6) a 8 (D8) dní, či byly v nenasátém stavu (D0).

Výsledky pro gen *irsgmg-161935* ukazují, že vzhledem k absolutním hodnotám průměru pravděpodobně dochází ke zvýšení exprese ve slinných žlázách (maximální zvýšení exprese osmý den sání (Obr. 9A)), a také ve střevě dospělců (Obr. 9C), ale ve vaječnicích je viditelné spíše utlumení exprese po zahájení sání (Obr. 9B). U nymf z hodnot vyplývá postupný vzrůst exprese v průběhu sání a pokles exprese po jeho dokončení. Největší vrchol vykazuje zvýšení až 24x (Obr. 9D). Nutno podotknout, že kvůli přítomnosti velkých odchylek v rámci biologických triplicátů některých vzorků nelze pokládat výsledky za příliš relevantní.



Obrázek 10: Expresní profil genu *irmsg-191510* ve slinných žlázách (A), vaječnicích (B) a střevech (C) dospělých samic a nymf (D) *I. ricinus*, které se sály po dobu 1 (D1), 2 (D2), 3 (D3), 4 (D4), 6 (D6) a 8 (D8) dní, či byly v nenasátém stavu (D0).

Hodnoty získané pro gen *irmsg-191510* vykazovaly ve slinných žlázách až 425x zvýšenou expresi genu třetí den po zahájení sání a následně docházelo k postupnému útlumu při plném dosátí (Obr. 10A). Opět však s relativně velkou variabilitou v rámci jednoho časového intervalu. U zbylých orgánů není patrná žádná expresní křivka, pouze v D1 dochází ke zvýšení exprese genu (Obr. 10B, C). Také nymfy vykazovaly cca 50x zvýšenou expresi *irmsg-191510* po prvním dni sání (Obr. 10D). Taktéž jsou zde viditelné velké odchylky, proto tyto expresní výsledky nelze považovat za směrodatné.

Bohužel u všech expresních profilů obou genů byly zaznamenány velké rozptyly v biologických triplicátech, které podmiňovaly tvorbu velkých odchylek. Díky tomuto faktu nebylo možné učinit přesnější analýzu, a tudíž je třeba výsledné hodnoty brát s rezervou.

6 DISKUZE

Prokineticiny mají významnou roli v mnohých biologických procesech, avšak tyto funkce jsou spíše známé pro prokineticiny obratlovců. Přítomnost těchto proteinů bohatých na cystein je však potvrzena i v dalších organismech. Příkladem jsou klíšťata, která mají sekvence prokineticinů velice podobné obratlovcům. Jedna z mála studií poukazuje na přítomnost prokineticinů ve slinných žlázách klíšťat spadajících do rodiny ixodegrinů, které jsou inhibitory krevních destiček. Na základě tohoto zjištění je možné, že prokineticiny budou vykazovat podobnou funkčnost s ixodegriny (Trentelman et al., 2020). Nadále jsou však prokineticiny u klíšťat neprozkoumanou skupinou proteinů s nejasnou funkcí a expresí.

V návaznosti na proniknutí do této problematiky prokineticinů klíšťat bylo jedním z cílů stanovení jejich expresních profilů. Nejdříve tedy bylo nutné získat cDNA z *Ixodes ricinus* a poté ověřit její kvalitu pomocí referenčních genů. Prvním referenčním genem byl elongační faktor 1 α (*ef-1*), který byl v naší laboratoři používán již dříve, např. při stanovení expresních profilů pro Irpin-8 (Kotál et al., 2021). Pro tento referenční gen byla pozorována více méně konstantní exprese ve střevech a vaječnicích, ovšem u slinných žláz, získaných z dospělých samic *I. ricinus*, byl zaznamenán pokles exprese při konci sání. Exprese *ef-1* v cDNA z nymf vykazovala výrazné snížení druhý den sání. Ribosomální protein S4 (*rps4*) byl díky výsledkům studie RNDr. Věchtové a kolektivu vybrán jako druhý referenční gen, jelikož se mezi testovanými referenčními geny pohyboval na předních místech (Vechtova et al., 2020). Jeho exprese byla celkově více konstantní u většiny tkání, i když ve slinných žlázách byl pozorován vzrůst okolo třetího dne sání. Díky již zmíněné menší variabilitě byl *rps4* vybrán pro normalizaci expresních profilů prokineticinů.

Pro zjištění účinnosti primerů byly nejdříve podrobeny PCR amplifikaci jednotlivé geny odpovídající těmto primerům. PCR produkt nebyl přítomen u čtyř genů a amplifikační křivky získané pomocí dalších dvou párů primerů zaznamenávaly příliš vysoké hodnoty Ct. Obecně mohou být vysoké Ct hodnoty zapříčiněny přítomností inhibitorů, které nebyly odstraněny při extrakci a následně inhibují amplifikaci PCR produktu. Dále se může jednat o nízkou kvalitu cDNA, avšak referenční geny na tento problém nepoukazovaly. Dle mého názoru je však důvodem těchto výsledků malé množství templátu pro dané geny ve vzorcích, či špatná funkce primerů. U některých amplikonů se též objevila více-vrcholová křivka tání. Vznik tohoto jevu by mohl mít více vysvětlení. Příkladem by mohla být kontaminace vzorků DNA, která je podle mého názoru nepravděpodobná, i když NTC vyšla pozitivní. Další možností by mohla být přítomnost subdomén bohatých na AT, které by mohly způsobovat nerovnoměrnou denaturaci PCR produktu, a tudíž více vrcholů na křivce tání (Espy et al., 2006) (Vulchi et al., 2021). Avšak domnívám se, že se v tomto případě spíše jedná o tvorbu primerových dimerů.

Tuto možnost podporuje i pozitivní NTC, kdy bez přítomnosti cDNA byla zaznamenána tvorba dvouvláknové DNA. Interkalační barviva, v tomto případě SYBR Green, se totiž váží na jakoukoliv dvouvláknovou DNA. Domnívám se tedy, že došlo k zaznamenání tvorby dimerních struktur primerů, které byly označeny navázaným barvivem, což vedlo k pozitivní NTC (Joseph, 2010). Z celkového počtu deseti párů primerů byla určena účinnost pouze u dvou párů primerů. Velký počet neprůkazných výsledků poukazuje na špatnou funkci primerů, proto by měly být navrženy nové sekvence.

Výzkum exprese neprozkoumaných prokineticinů klíšťat v různých fázích sání dospělců i nymf byl z důvodu předchozích výsledků proveden pouze u dvou prokineticinových genů. Získané expresní profily genu *irsgmg-161935* vykazovaly i přes vysoké odchylky zvýšenou expresi tohoto genu ve slinných žlázách dospělých samic od třetího dne sání, až k jeho konci. Zvýšení exprese tohoto genu bylo zaznamenáno i v druhém dni sání ve střevech, zatímco u vaječníků byla utlumena. Komplementární DNA z nymf též vykazovala postupně rostoucí expresi v průběhu sání. Je známo, že poté co klíštěcí chelicery s hypostomem proniknou do hostitele, dojde k hostitelem vyvolané zánětlivé reakci spjaté s neutrofily (Brossard & Wikel, 2004). Zánětlivé stavy jsou i úzce spjaty s prokineticiny, které mají své receptory právě na neutrofilech a makrofázích, proto se předpokládá jejich autokrinní regulace zánětlivých a imunitních reakcí (Catalano et al., 2010). Tyto jevy byly sice prokázány u savčích prokineticinů, ale podle mého názoru mohou mít klíštěcí homology podobné funkce. Nutnost obrany klíštěte proti hostitelské imunitě totiž mimo jiné zahrnuje potřebu potýkat se se zánětem. Kvůli tomu klíštěcí sliny obsahují mnohé proteiny, které působí na modulaci zánětu tak, aby klíště mohlo dokončit sání (Aounallah et al., 2020). Jelikož zvýšená exprese prokineticinu *irsgmg-161935* byla zaznamenána právě ve slinných žlázách, domnívám se, že by tento prokineticin mohl mít vliv na regulaci zánětu podobně jako u savčích prokineticinů a též jiné imunoregulační funkce. Podobnost prokineticinů s astakinem, který má u bezobratlých vliv na krvetvorbu, nahrává možnosti podobných funkcí. Absence AVIT domény je však jistou bariérou pro vazbu těchto prokineticinů na savčí prokineticinové receptory. Studie zabývající se astakinem však poukazují na funkci β podjednotky ATP syntázy jakožto receptoru právě pro tento prokineticinový homolog. Výsledky studie pracující s touto problematikou u ústřice velké (*Crassostrea gigas*) vykazují vyšší expresi β podjednotky CgATP syntázy u hemocytů, které hrají roli v imunitní reakci a též krvetvorbě, kdy astakin působí pro hemocyty jako růstový faktor. Jelikož klíšťata jakožto bezobratlí živočichové také postrádají onu AVIT prokineticinovou doménu, mohly by vykazovat podobné vlastnosti jako bylo popsáno pro astakin ústřice. Při různých imunitních dějích v průběhu sání klíštěte, může být produkce hemocytů ovlivněna prokineticiny jejich nedílnou součástí (Yang et al., 2022).

Pro gen *irmgsg-191510* se mi nepodařilo získat věrohodný profil. Exprimovaný je hlavně ve slinných žlázách dospělých samic, kde vykazuje pozvolný růst do třetího dne sání. Ostatní orgány stejně tak jako výsledky získané z nymf poté ukazují na určitou expresi tohoto genu během prvního dne sání. Ač se zde vyskytují vysoké odchylky a výsledky lze považovat za neprůkazné, myslím si, že jelikož bylo takového výsledku dosaženo u zbylých dvou orgánů dospělých samic a nezávisle na tom u vzorků z nymf, nebylo by správné tyto výsledky zcela ignorovat. Vše naznačuje, že má tento prokineticin nějaký vliv na začátku sání klíštěte. Mohlo by se jednat například o již zmíněnou inhibici krevních destiček díky podobnosti s ixodegriny (Trentelman et al., 2020). V neposlední řadě by bylo možné uvažovat o vlivu prokineticinu na vazodilatační a vazokonstrikční funkce v odkazu na první záznam vlivu prokineticinů na stahy hladké svaloviny v ileu morčete (Schweitz et al., 1999). Klíště by tak například mohlo regulovat tok krve při sání, či ovlivňovat další procesy v souvislosti s hladkou svalovinou napříč orgány.

Celkově byly pozorovány u expresních profilů obou prokineticinových genů velké rozdíly v biologických triplikátech. Někdy se proto zdálo, že i tyto primery, které prošly testem na účinnost, nasedaly z neznámého důvodu nespolehlivě. Na základě výsledků, které ukazují expresi genů *irsgmg-161935* a *irmgsg-191510* a výsledků, které byly získány při kroku zjišťování účinnosti primerů, se tyto qPCR primery zdají být v nedostatečné kvalitě. Pro získání přesnějších výsledků expresních profilů prokineticinů by měly být v budoucnu navrženy lepší sekvence qPCR primerů, které by lépe seděly odpovídajícím genům.

Jelikož mají prokineticiny zvýšenou expresi v různých dobách sání a neví se ve které fázi je který z nich exprimován, bylo by vhodné pokusit se navrhnout primery, které by zachycovaly celé skupiny těchto proteinů. Pro tento cíl by se mohly v budoucnu navrhnout degenerované primery, které by zachytily většinu variant požadované prokineticinové skupiny. Následně by tyto primery byly podrobeny PCR reakci a pozitivní PCR produkty by byly vloženy do klonovacího vektoru (plazmidu) a ten poté transformován do bakterií. Dále by byla provedena amplifikace genů z narostlých bakteriálních kolonií pomocí PCR. Vybrané sekvence získané díky bakteriálním koloniím by poté byly osekvenovány, díky čemuž by bylo zjištěno, jaké prokineticinové geny se v původních vzorcích vyskytovaly. Poté by bylo možné navrhnout přesnější prokineticinové primery.

7 SHRNUTÍ

Tato práce obsahuje shrnutí současných poznatků, které pojednávají o problematice proteinů zvaných prokineticiny. Dále byla připravena cDNA z nymf *Ixodes ricinus*. Jednalo se o nenasáté, částečně nasáté a plně nasáté nymfy, které sály po dobu 0–3 dnů na inbredních SPF myších kmene C3H/He. Také byla připravena cDNA ze slinných žláz, střev a vaječníků dospělých samic *I. ricinus*, které zahrnovaly nenasáté jedince i klíšťata sající 1–8 dní na morčeti.

Stanovení expresních profilů pomocí real-time PCR bylo provedeno pouze u dvou prokineticinových genů. Jednalo se o geny *irsgmg-161935* a *irmgsg-191510*, které byly podrobeny zkoumání a byla popsána jejich exprese v průběhu sání různých stádií *I. ricinus*. Z důvodu velkých odchylek však nelze stanovit jejich přesnou expresi a pro další kroky je nutné, aby byly navrženy lepší sekvence qPCR primerů.

8 SEZNAM ZKRATEK

AVČR = Akademie věd České republiky

AVIT = doména obsahující alanin, valin, isoleucin a threonin

ATP = adenosintrifosfát

Bv8 = protein izolovaný z *Bombina variegata*

cDNA = komplementární DNA

Ct = cycle of treshold/ prahová hodnota cyklu

D0 = nenasátá klíšřata

D1, D2, D3, D4, D6, D8 = klíšřata sající 1-8 dní

DEPC = diethyl pyrokarbonát

DNA = deoxyribonukleová kyselina

ef-1 = elongační faktor 1 α

EG-VEGF = endokrinní žlázořý vaskulární endoteliální faktor

IVC= individually ventilated cages / oddělené kleřové systémy

mBv8 = myšř Bv8

MIT-1 = mamba intestina toxin-1

mRNA = mediátorová RNA

NK buňky = natural killer cells

NPY = neuropeptidu Y

NTC = no template control

PBS = phosphate-buffered saline

PCR = polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

PK 1/2 = prokineticin 1/2

PKR 1/2 = prokineticinový receptor

qPCR = quantitative polymerase chain reaction/ kvantitativní real-time PCR

RNA = ribonukleová kyselina

rps4 = ribosomální protein S4

RT = pokojová teřplota

SPF = specified pathogen free (prostě specifických patogenů)

TH1 lymřocyty = „záněřtové“ T_H buňky, schopné i řřímé aktivity

TRPV1 = kationřový kanál s řřechodným receptorovým potenciálem, řřlen podrodiny V1

9 SEZNAM LITERATURY

Literatura

Aounallah, H., Bensaoud, C., M'ghirbi, Y., Faria, F., Chmelař, J., & Kotsyfakis, M. (2020). Tick Salivary Compounds for Targeted Immunomodulatory Therapy. *Frontiers in Immunology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583845>

Barker, S., & Murrell, A. (2004). Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. *Parasitology*, *129*(1), S15-S36. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005207>

Black, W., & Roehrdanz, R. (1998). Mitochondrial gene order is not conserved in arthropods: prostriate and metastriate tick mitochondrial genomes. *Molecular Biology and Evolution*, *15*(12), 1772-1785. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025903>

Brossard, M., & Wikel, S. (2004). Tick immunobiology. *Parasitology*, *129*(1), S161-S176. <https://doi.org/10.1017/S0031182004004834>

Bullock, C., Li, J., & Zhou, Q. (2004). Structural Determinants Required for the Bioactivities of Prokineticins and Identification of Prokineticin Receptor Antagonists. *Molecular Pharmacology*, *65*(3), 582-588. <https://doi.org/10.1124/mol.65.3.582>

Catalano, R., Lannagan, T., Gorowiec, M., Denison, F., Norman, J., & Jabbour, H. (2010). Prokineticins: novel mediators of inflammatory and contractile pathways at parturition?. *Molecular Human Reproduction*, *16*(5), 311-319. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq014>

Cupp, E. (1991). Biology of Ticks. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, *21*(1), 1-26. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(91\)50001-2](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(91)50001-2)

Espy, M., Uhl, J., Sloan, L., Buckwalter, S., Jones, M., Vetter, E., Yao, J., Wengenack, N., Rosenblatt, J., Cockerill, F., & Smith, T. (2006). Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews*, *19*(1), 165-256. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.165-256.2006>

Francischetti, I., Sa-Nunes, A., Mans, B., Santos, I., & Ribeiro, o. (2009). The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience*, *(14)*, 2051-2088. <https://doi.org/10.2741/3363>

Fry, B., Roelants, K., Champagne, D., Scheib, H., Tyndall, J., King, G., Nevalainen, T., Norman, J., Lewis, R., Norton, R., Renjifo, C., & de la Vega, R. (2009). The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *10*(1), 483-511. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>

Gern, L., Morán Cadenas, F., & Burri, C. (2008). Influence of some climatic factors on Ixodes ricinus ticks studied along altitudinal gradients in two geographic regions in Switzerland. *International Journal of Medical Microbiology*, 298, 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2008.01.005>

Gray, J., Kahl, O., Janetzki, C., & Stein, J. (1992). Studies on the Ecology of Lyme Disease in a Deer Forest in County Galway, Ireland. *Journal of Medical Entomology*, 29(6), 915-920. <https://doi.org/10.1093/jmedent/29.6.915>

Hoogstraal, H. (1985). Argasid and Nuttalliellid Ticks as Parasites and Vectors. *Advances in Parasitology Volume 24*, 135-238. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60563-1](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60563-1)

Charakteristika a funkční analýza proteinů rodiny prokineticinů z klišťe Ixodes ricinus [Maturitní práce]. (2019). Gymnázium České Budějovice Jírovцова 8.

Cheng, M., Bullock, C., Li, C., Lee, A., Bermak, J., Belluzzi, J., Weaver, D., Leslie, F., & Zhou, Q. (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature*, 417(6887), 405-410. <https://doi.org/10.1038/417405a>

Chmelař, J., Anderson, J., Mu, J., Jochim, R., Valenzuela, J., & Kopecký, J. (2008). Insight into the sialome of the castor bean tick, Ixodes ricinus. *BMC Genomics*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-233>

Chmelař, J., Kotál, J., Kopecký, J., Pedra, J., & Kotsyfakis, M. (2016). All For One and One For All on the Tick-Host Battlefield. *Trends in Parasitology*, 32(5), 368-377. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.01.004>

Chmelař, J., Kotál, J., Kovaříková, A., & Kotsyfakis, M. (2019). The Use of Tick Salivary Proteins as Novel Therapeutics. *Frontiers in Physiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00812>

Joseph, L. (2010). Setting up a Laboratory. *Genetic Diagnosis of Endocrine Disorders*, 303-314. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374430-2.00027-4>

Joubert, F., & Strydom, D. (1980). Snake Venom. The Amino Acid Sequence of Protein A from Dendroaspis polylepis polylepis (Black mamba) Venom. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 361(2), 1787-1794. <https://doi.org/10.1515/bchm2.1980.361.2.1787>

Kaser, A., Winklmayr, M., Lepperdinger, G., & Kreil, G. (2003). The AVIT protein family. *EMBO reports*, 4(5), 469-473. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor830>

Klompen, J. (2000). Systematics and Biogeography of Hard Ticks, a Total Evidence Approach. *Cladistics*, 16(1), 70-102. <https://doi.org/10.1006/clad.1999.0126>

Kotál, J., Polderdijk, S., Langhansová, H., Ederová, M., Martins, L., Beránková, Z., Chlastáková, A., Hajdušek, O., Kotsyfakis, M., Huntington, J., & Chmelař, J. (2021). Ixodes ricinus Salivary Serpin Iripin-8 Inhibits the Intrinsic Pathway of Coagulation and Complement. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179480>

Li, M., Bullock, C., Knauer, D., Ehlert, F., & Zhou, Q. (2001). Identification of Two Prokineticin cDNAs: Recombinant Proteins Potently Contract Gastrointestinal Smooth Muscle. *Molecular Pharmacology*, 59(4), 692-698. <https://doi.org/10.1124/mol.59.4.692>

Lin, D., Bullock, C., Ehlert, F., Chen, J., Tian, H., & Zhou, Q. (2002). Identification and Molecular Characterization of Two Closely Related G Protein-coupled Receptors Activated by Prokineticins/Endocrine Gland Vascular Endothelial Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 277(22), 19276-19280. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202139200>

Lin, X., Kim, Y., Lee, B., Söderhäll, K., & Söderhäll, I. (2009). Identification and properties of a receptor for the invertebrate cytokine astakine, involved in hematopoiesis. *Experimental Cell Research*, 315(7), 1171-1180. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.01.001>

Livak, K., & Schmittgen, T. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Mans, B., de Klerk, D., Pienaar, R., Latif, A., & Oliveira, P. (2011). Nuttalliella namaqua: A Living Fossil and Closest Relative to the Ancestral Tick Lineage. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023675>

Medlock, J., Hansford, K., Bormane, A., Derdakova, M., Estrada-Peña, A., George, J., Golovljova, I., Jaenson, T., Jensen, J., Jensen, P., Kazimirova, M., Oteo, J., Papa, A., Pfister, K., Plantard, O., Randolph, S., Rizzoli, A., Santos-Silva, M., Sprong, H. et al. (2013). Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-1>

Mollay, C., Wechselberger, C., Mignogna, G., Negri, L., Melchiorri, P., Barra, D., & Kreil, G. (1999). Bv8, a small protein from frog skin and its homologue from snake venom induce hyperalgesia in rats. *European Journal of Pharmacology*, 374(2), 189-196. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00229-0](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00229-0)

Narasimhan, S., Sukumaran, B., Bozdogan, U., Thomas, V., Liang, X., DePonte, K., Marcantonio, N., Koski, R., Anderson, J., Kantor, F., & Fikrig, E. (2007). A Tick Antioxidant Facilitates the Lyme Disease Agent's Successful Migration from the Mammalian Host to the Arthropod Vector, 2(1), 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.001>

Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., Colucci, M., Margheriti, F., Melchiorri, P., Vellani, V., Tian, H., De Felice, M., & Porreca, F. (2006). Impaired Nociception and Inflammatory Pain Sensation in Mice Lacking the Prokineticin Receptor PKR1: Focus on Interaction between PKR1 and the Capsaicin Receptor TRPV1 in Pain Behavior. *Journal of Neuroscience*, 26(25), 6716-6727. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5403-05.2006>

Negri, L., & Ferrara, N. (2018). The Prokineticins: Neuromodulators and Mediators of Inflammation and Myeloid Cell-Dependent Angiogenesis. *Physiological Reviews*, 98(2), 1055-1082. <https://doi.org/10.1152/physrev.00012.2017>

Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., Canestrelli, M., Nicotra, A., & Melchiorri, P. (2009). Chapter 11 Bv8/Prokineticins and their Receptors. *International Review of Neurobiology*, 85, 145-157. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)85011-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)85011-3)

Negri, L., Lattanzi, R., Giannini, E., & Melchiorri, P. (2007). Bv8/Prokineticin proteins and their receptors. *Life Sciences*, 81(14), 1103-1116. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.08.011>

Richter, D., Matuschka, F., Spielman, A., & Mahadevan, L. (2013). How ticks get under your skin: insertion mechanics of the feeding apparatus of *Ixodes ricinus* ticks. *Proceedings of the royal society B*, 280(1773). <https://doi.org/https://doi.org/10.1098/rspb.2013.1758>

Schwarz, A., Reumont, B., Erhart, J., Chagas, A., Ribeiro, J., & Kotsyfakis, M. (2013). De novo *Ixodes ricinus* salivary gland transcriptome analysis using two next-generation sequencing methodologies. *The FASEB Journal*, 27(12), 4745-4756. <https://doi.org/10.1096/fj.13-232140>

Schweitz, H., Pacaud, P., Diochot, S., Moinier, D., & Lazdunski, M. (1999). MIT 1, a black mamba toxin with a new and highly potent activity on intestinal contraction. *FEBS Letters*, 461(3), 183-188. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01459-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01459-3)

Söderhäll, I., Kim, Y., Jiravanichpaisal, P., Lee, S., & Söderhäll, K. (2005). An Ancient Role for a Prokineticin Domain in Invertebrate Hematopoiesis. *The Journal of Immunology*, 174(10), 6153-6160. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.6153>

Soga, T., Matsumoto, S., Oda, T., Saito, T., Hiyama, H., Takasaki, J., Kamohara, M., Ohishi, T., Matsushime, H., & Furuichi, K. (2002). Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1579(2-3), 173-179. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(02\)00546-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(02)00546-8)

Trentelman, J., Sima, R., Krezdorn, N., Tomás-Cortázar, J., Barriales, D., Takumi, K., Butler, J., Sprong, H., Klouwens, M., Urbanova, V., Mahmood, S., Winter, P., Kopacek, P., Anguita, J., Hajdusek, O., & Hovius, J. (2020). A combined transcriptomic approach to identify candidates for an anti-tick vaccine blocking *B. afzelii* transmission. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76268-y>

Urayama, K., Guilini, C., Messaddeq, N., Hu, K., Steenman, M., Kurose, H., Ert, G., & Nebigil, C. (2007). The prokineticin receptor-1 (GPR73) promotes cardiomyocyte survival and angiogenesis. *The FASEB Journal*, *21*(11), 2980-2993. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8116com>

Vechtova, P., Fussy, Z., Cegan, R., Sterba, J., Erhart, J., Benes, V., & Grubhoffer, L. (2020). Catalogue of stage-specific transcripts in *Ixodes ricinus* and their potential functions during the tick life-cycle, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04173-4>

Vulchi, R., Daane, K., & Wenger, J. (2021). Development of DNA Melt Curve Analysis for the Identification of Lepidopteran Pests in Almonds and Pistachios. *Insects*, *12*(6). <https://doi.org/10.3390/insects12060553>

Wikel, S. (1999). Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *International Journal for Parasitology*, *29*(6), 851-859. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00042-9)

Yang, Y., Qiao, X., Song, X., Zhang, D., Yu, S., Dong, M., Liu, X., Wang, L., & Song, L. (2022). CgATP synthase β subunit involved in the regulation of haemocytes proliferation as a CgAstakine receptor in *Crassostrea gigas*, *123*, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2022.02.054>

Zhang, D., Zhao, Q., & Wu, B. (2015). Structural Studies of G Protein-Coupled Receptors. *Molecules and Cells*, *38*(10), 836-842. <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0263>

Zhao, Y., Wu, J., Wang, X., Jia, H., Chen, D., & Li, J. (2019). Prokineticins and their G protein-coupled receptors in health and disease. *G Protein Signaling Pathways in Health and Disease*, 149-179. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.09.006>

Zhou, Q. (2006). The Prokineticins: A NOVEL PAIR OF REGULATORY PEPTIDES. *Molecular Interventions*, *6*(6), 330-338. <https://doi.org/10.1124/mi.6.6.6>

Zhou, Q., & Cheng, M. (2005). Prokineticin 2 and circadian clock output. *FEBS Journal*, *272*(22), 5703-5709. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04984.x>

Webové stránky

Erhart, J. "Krvemlýnek" ve střevě klíštěte / "Blood Mill" in Tick Intestines: Vývojová stadia a dynamický průběh sání samice klíštěte obecného na hostiteli. In *Živa: Rozhled v oboru veškeré přírody*. Academia. <https://ziva.avcr.cz/2016-1/krvemlynek-ve-streve-klisete.html>

How To Calculate PCR Primer Efficiencies. (2017). Top Tip Bio. Retrieved 2022-03-24, from <https://toptipbio.com/calculate-primer-efficiencies/>

Tick surveillance effort over 2015–2019. European Centre for Disease Prevention and Control European Centre for Disease Prevention and Control: An agency of the European Union. Retrieved 2022-03-09, from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tick-surveillance-effort-2015-2019>