

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

Vliv herbicidu nitisinonu na *Caenorhabditis elegans*

Bakalářská práce

Natália Turcelová

Ochrana krajiny a využívání přírodních zdrojů

RNDr. Jan Dvořák, Ph.D.

© 2023 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Vliv herbicidu nitisinonu na *Caenorhabditis elegans*" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20. 4. 2023

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu práce panu RNDr. Jánů Dvořákovi, Ph.D., za odborné vedení, nápady a rady při psaní mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Vojtěchu Vackovi, Ph.D., za jeho vřelý vzhled do práce v laboratoři a odbornou pomoc. Poděkování patří i ostatním členům týmu, kteří mi byli vždy nápomocní. Děkuji také své rodině a přátelům za trpělivost a podporu po celou dobu studia.

Vliv herbicidu nitisinonu na *Caenorhabditis elegans*

Souhrn

Bakalářská práce se zabývala účinkem herbicidu nitisinonu na půdního nematoda háďatko obecné (*Caenorhabditis elegans*). Nitisinon se také používá pod obchodním názvem Orfadin® jako lék na vzácná genetická onemocnění, přičemž mechanismus jeho účinku je dosud málo známý. Probíhající výzkum ukazuje jeho potenciální využití při léčbě dalších onemocnění. Cílem této práce bylo prokázat účinek nitisinonu na inhibici enzymu hpd-1, který katabolizuje degradaci tyrosinu. Účinek nitisinonu nebyl dosud přímo studován na organismu bez krevního oběhu nebo hematofágie. Lepší pochopení fungování nitisinonu a jeho účinku na *C. elegans* tak může být přínosné pro efektivnější výrobu herbicidů, pesticidů a ochranu krajiny s dopadem na vědu nebo medicínu.

Testování nitisinonu bylo provedeno přímým pozorováním inhibice enzymu HPPD v molekulárně-biochemické části práce a pozorováním fenotypových změn na organismu *in vitro*. Metodou alignmentu sekvencí se zjišťovala shoda v sekvenci hpd-1 u *C. elegans* a u dalších organismů s potvrzeným fungováním tohoto inhibitoru.

Jak předpověděla velká shoda v alignmentech sekvencí, inhibici se podařilo v provedených testech potvrdit. Můžeme tak předvídat negativní dopad nitisinonu i na jiné půdní organismy, které měl *C. elegans* reprezentovat jako modelový organismus v případě reziduí nitisinonu v půdě ve formě léčiv nebo herbicidů. Inhibici se však podařilo potvrdit prozatím pouze jednou, a proto v rámci práce proběhla diskuse o možných chybách v laboratorních postupech a o tom, jak je lze napravit. Výsledky zahrnují také zjištění nižšího přežívání *C. elegans* při vyšších koncentracích tyrosinu a také při vyšších koncentracích samotného nitisinonu.

Práce rovněž shrnuje širokou škálu aplikací nitisinonu a může tak spolu s dalšími poznatky sloužit jako základ pro další výzkum v této oblasti.

Klíčová slova: 4-hydroxyphenylpyruvát dioxygenáza (HPPD), inhibice, tyrosin, herbicid, ochrana krajiny

Effects of the herbicide nitisinone on *Caenorhabditis elegans*

Summary

This thesis examined the effects of the herbicide nitisinone on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. Nitisinone is also sold under the brand name Orfadin®, used as a treatment for rare genetic diseases, so far with a poorly understood mechanism of action. Ongoing research proves its potential use for treating more types of diseases. This thesis aimed to prove the effect of nitisinone on the inhibition of enzyme hpd-1, which catalyses tyrosine degradation. A better understanding of nitisinone and its effect on *C. elegans* can be beneficial for more efficient designing of herbicides, pesticides and nature protection, with a reach to science and medicine. The mechanism of action of nitisinone was so far not examined on organism without blood circulation or hematophagy.

Nitisinone testing consisted of a direct examination of inhibition of the hpd-1 enzyme in the molecular-biochemical part of the thesis, and observation of changes in phenotype of the organism *in vitro*. Using the sequence alignment method, we determined the match in the sequences of hpd-1 in *C. elegans* and in other organisms with confirmed functioning of this inhibitor.

As substantial match in the sequence alignments predicted, the inhibition was confirmed in the performed tests. Thus, we can predict the negative impact of nitisinone on other soil organisms, which *C. elegans* was intended to represent as a model organism in the case of nitisinone residues in soil in the form of pharmaceuticals or herbicides. However, the inhibition was only confirmed once, therefore there was a discussion about possible errors in laboratory procedures and how they can be corrected. Results include the finding of lower survival of *C. elegans* at higher concentrations of tyrosine and also at higher concentrations of nitisinone itself.

The work also provides a summary of the broad scope of the use of nitisinone and thus, together with other outcomes of this work, can serve as a basis for further research in this area.

Keywords: : 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD), inhibition, tyrosine, herbicide, nature conservation

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíl práce	9
3 Nitisinon	10
3.1 Toxikologické studie nitisinonu	10
3.1.1 Toxikologické studie nitisinonu u savců	11
3.1.2 Mechanismus účinku nitisinonu a tyrosinémie u zvířat	11
3.2 Tyrosinémie u lidí	12
3.3 Nitisinon jako kandidát na léčbu onemocnění spojených s poruchami metabolismu tyrosinu	13
3.3.1 Alkaptonurie	13
3.3.2 Okulokutánní albinismus	13
3.4 Nitisinon v léčbě Parkinsonovy choroby	14
3.5 Nitisinon proti přenosu africké trypanosomózy a malárie	14
3.6 Nitisinon v boji proti nemocem přenášeným klíšťaty	14
4 <i>Caenorhabditis elegans</i>	15
4.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> jako modelový organismus pro vědu	15
4.1.1 Pozorování <i>Caenorhabditis elegans</i> <i>in vitro</i>	15
4.1.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> na molekulární úrovni	15
4.2 <i>C. elegans</i> a nitisinon	16
5 Metodika	18
5.1 PCR	18
5.1.1 Navrhování primerů	18
5.1.2 Extrakce total RNA z <i>C. elegans</i> a purifikace extrahované RNA	18
5.1.3 Syntéza cDNA z total RNA	19
5.1.4 PCR a analýza výsledků	19
5.2 Restrikční klonování	20
5.3 Kolorimetrická esej sledování inhibitoru hpd-1 – nitisinonu u <i>C. elegans</i>	21
5.4 Fenotypizační testy	22
5.4.1 Příprava NGM – nematode growth medium s agarom	22
5.4.2 Příprava synchronizované kultury larválních stádií L1 <i>C. elegans</i>	22
5.4.3 Testy přežívání <i>C. elegans</i> v médiu s nitisinonem a erytrocyty	22
5.4.4 Testy přežívání a reprodukce <i>C. elegans</i> v médiu s nitisinonem a tyrosinem	23
5.4.5 Pozorování přežívání <i>C. elegans</i> ve fluorescenčních testech	24
5.5 Alignment metoda	24

6	Výsledky.....	25
6.1	Molekulárně-biochemická analýza.....	25
6.1.1	Vyhodnocení kolorimetrické eseje sledování inhibitoru hpd-1 – nitisinonu u <i>C. elegans</i>	25
6.2	Analýza změn fenotypu.....	26
6.2.1	Výsledky testů přežívání <i>C. elegans</i> v médiu s nitisinonem a erytrocyty.....	26
6.2.2	Výsledky testů přežívání a reprodukce <i>C. elegans</i> v médiu s nitisinonem a tyrosinem.....	26
6.2.3	Výsledky přežívání <i>C. elegans</i> ve fluorescenčních testech.....	28
6.3	Analýza alignmentu.....	28
7	Diskuse.....	30
7.1	Kolorimetrická esej sledování inhibitoru hpd-1 – nitisinonu u <i>C. elegans</i> a metoda alignmentu.....	30
7.2	Testy přežívání <i>C. elegans</i> v médiu s nitisinonem a erytrocyty	30
7.3	Testy přežívání a reprodukce <i>C. elegans</i> v médiu s nitisinonem a tyrosinem.....	31
7.4	Pozorování přežívání <i>C. elegans</i> ve fluorescenčních testech	31
7.5	Specifika výzkumu.....	32
8	Závěr.....	33
9	Literatura.....	34

1 Úvod

Nitisinon je syntetická látka, která se v minulosti používala jako účinný triketonový herbicid, patřící do skupiny společně s dosud používanými herbicidy sulcotrionem nebo mesotrionem (Lock 2017). Toxikologické studie tohoto herbicidu později potvrdily, že nitisinon působí jako inhibitor enzymu HPPD u zvířat i rostlin (Ellis et al. 1995). U živočichů tento enzym katabolizuje rozklad tyrosinu, u rostlin je HPPD součástí syntézy plastochinonu nebo tokoferolu, látek důležitých pro fotosyntézu (Prisbylla et al. 1993).

Rozsáhlejší toxikologické studie nitisinonu u savců prokázaly problémy v podobě očních lézí u zvířat s přímou souvislostí s tyrosinemií - poruchou metabolismu aminokyseliny tyrosinu (Lock et al. 1996).

Tyto nové vědecké poznatky se staly základem pro studie S. Lindstedta a jeho kolegů (1992) týkající se použití nitisinonu v léčbě lidské tyrosinémie typu 1. V tomto případě nitisinon blokuje tvorbu toxických metabolitů, přispívá ke zlepšení zdravotního stavu pacientů s tímto vzácným onemocněním a může zabránit transplantaci jater. Lék byl po pozitivních výsledcích schválen a dále používán pro léčbu alkaptonurie a také jako potenciální kandidát pro léčbu dalších onemocnění. Stále však zůstává velmi nedostatečně prozkoumaným lékem.

Toxikologické studie se dále zaměřily i na menší organismy, jako je například hmyz rodu *Drosophila*- známé mouchy octomilky, které jsou škůdci zemědělských plodin, u kterých měl nitisinon rovněž prokazatelný účinek. *Drosophila* navíc figuruje také jako důležitý modelový organismus pro vědu, s její genomem ze 60 % shodným s genomem člověka (Ugur et al. 2016).

Podle našich nejlepších znalostí však nitisinon dosud nebyl studován u organismů bez krevního oběhu nebo hematofágie. Pro naši práci jsme proto jako modelový organismus zvolili *C. elegans*, který se často používá i v praxi. *C. elegans* nám poslouží také jako modelový půdní organismus, který ukáže potenciální riziko pro ostatní půdní organismy v případě aplikace herbicidů nebo reziduí léčiv v půdě. Podrobnější pochopení mechanismu účinku nitisinonu může mít přínos pro vědu, efektivnější výrobu herbicidů, pesticidů nebo aplikace v medicíně.

2 Cíl práce

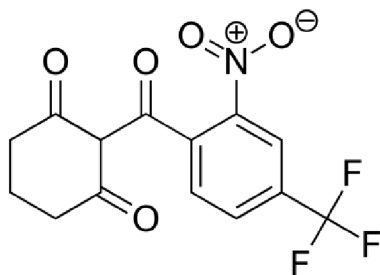
Cílem práce bylo prokázat účinek nitisinonu na *C. elegans*. Jeho účinek byl zkoumán přímým pozorováním inhibice enzymu HPPD v molekulárně-biochemické části práce a pozorováním fenotypových změn na organismu *in vitro*.

3 Nitisinon

Nitisinon (2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1, 3-cyclohexanedione), (NTBC) je synteticky vyráběná látka objevená při výzkumu triketon herbicidů. Triketonové alkaloidy se přirozeně vyskytují v rostlinách čeledi Myrtovité (*Myrtaceae*) a lišejnících.

V roce 1977 si vědec Reed Gray, který pracoval pro společnost Stauffer Chemicals ve Western Research Center v Kalifornii, všiml, že kolem australského okrasného keře *Callistemon citrinus* z čeledi *Myrtaceae* roste méně plevelů. Oddělil tedy výtažky z rostliny a aplikoval je na travní porost, který vybledl a zůstal zakrnělý v růstu. Izolací se mu podařilo určit strukturu herbicidně účinné látky, kterou byla acylsynkarboxylová kyselina, nazývaná leptospermon. Další výzkum potvrdil účinnost leptospermonu jako mírného herbicidu proti úzkému profilu nežádoucích rostlin. Pro travní plevely se stává účinným při dávce 1000 g/ha a vyšší (Beaudegnies et al. 2009).

Další studie zkoumaly kombinace leptospermonu s benzoilem za účelem zkvalitnění a rozšíření herbicidního účinku, které se ukázaly jako úspěšné. Vzinkli tak syntetické herbicidy, jako sulcotrion nebo mesotrion, což dále nastartovalo trend výroby nových herbicidů se stejným mechanismem účinku, mezi něž patří například nitisinon. Podrobné fungování benzoyl acylsynkarboxylových kyselin a benzoyl cyklohexanů při hubení rostlin však dosud nebylo jasné (Lock 2017).

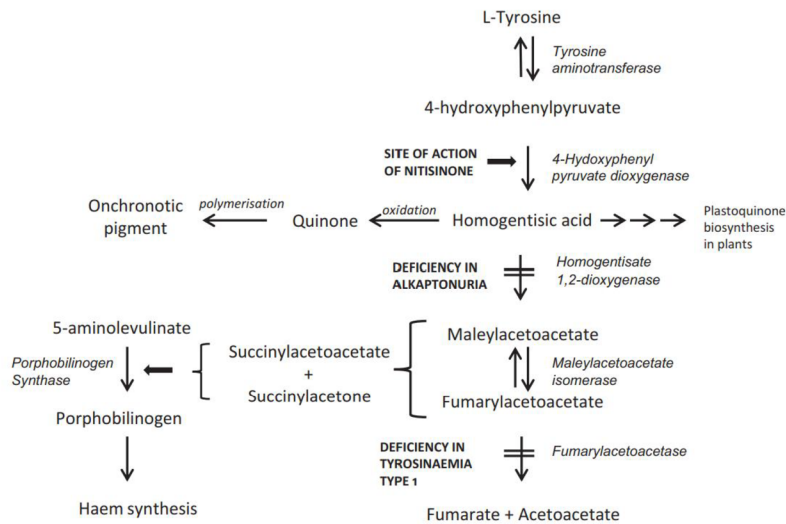


Obrázek 1 – Molekula nitisinonu (<https://en.wikipedia.org/wiki/Nitisinone>).

3.1 Toxikologické studie nitisinonu

Toxikologické studie tohoto herbicidu později ukázaly, že potkani, kterým byl nitisinon podáván, vykazovali zvýšené koncentrace tyrosinu v krvi a zvýšené množství 4-hydroxyfenylpyruvát dioxygenázy (HPPD) v moči (Ellis et al. 1995; Lock et al. 1996; Lee et al. 1997). Následný výzkum potvrdil, že nitisinon je inhibítozem HPPD, která u zvířat katabolizuje rozklad tyrosinu (Ellis et al. 1995). Při degradaci tyrosinu tento enzym katalyzuje oxidativní dekarboxylaci a přeskupení 4-hydroxyfenylpyruvátu na homogentisát.

U rostlin je HPPD součástí syntézy plastochinonu nebo tokoferolu, což bylo objeveno až o několik let později Prisbyllou a spol. (1993). Přítomnost enzymu byla objevena u kukuřice, kde byla prokázána citlivost na NTBC. Ošetření povijnice břechťanovité (*Ipomoea hederacea*) nitisinonem vedlo ke zvýšení koncentrace tyrosinu v rostlině a odpovídajícímu snížení obsahu plastochinonu, který byl zodpovědný za zblednutí. Obě zmíněné organické chemické látky jsou důležitými součástmi fotosyntézy.



Obrázek 2- Degradáční cesta tyrosinu a místo působení nitisinonu (Lock 2017).

3.1.1 Toxikologické studie nitisinonu u savců

Pravidelné toxikologické studie NTBC v laboratořích Environmental Health Centre ve Farmingtonu, CT, USA prokázaly nízkou akutní orální toxicitu nitisinonu. Další výskumy však zjistily souvislost mezi NTBC a zákalmi rohovky u potkanů, ať už se současnou vaskularizací nebo bez ní, vyskytujícími se jednostranně i oboustranně. Potkanům byl předtím podáván nitisinon v koncentracích 0,05-40 mg/kg/den po dobu 90 dnů. První reakce se objevila přibližně týden po zahájení diety, přičemž nejvyšší reakce byla zaznamenána na konci studie, s přibližným výskytem 80 % při nejvyšších dávkách (Lock et al. 1996). U některých potkanů v této studii se však známky nežádoucích účinků vůbec neprojevíly. Na konci pokusu se oči potkanů vrátily do normálního stavu, při vaskularizaci vykazovaly pouze rezidua zbytků krevních cév.

Studie na myších, kterým byl NTBC podáván v dávkách 1-350 mg/kg/den po dobu 90 dnů, neprokázaly žádné léze rohovky spojené s experimentem (Lock et al. 2000), zatímco u psů plemene bígl v dávkách 0,1-5 mg/kg/den došlo k zákalům rohovky při všech podávaných dávkách (Lock et al. 2006). Stejný pokus byl proveden také na opicích makak rézus v dávkách 10 mg/kg/den po dobu 90 dnů, kdy nebyl prokázán žádný nežádoucí účinek (Lock et al. 2006). Primární toxikologická pozorování tedy prokázala nepříznivý účinek NTBC spojený se zákallem rohovky u potkanů a psů již při nízkých dávkách, zatímco myši a makak rézus byli vůči tomuto účinku odolní.

Zajímavým zjištěním při testech radioaktivního značení na potkanech bylo zadržení velké části dávky NTBC v játrech a menší části v ledvinách. Retence NTBC byla zaznamenána také v harderově žláze, která se nachází v oční orbitě, bez selektivní retence v rohovce nebo v samotném oku (Lock et al. 1996).

3.1.2 Mechanismus účinku nitisinonu a tyrosinémie u zvířat

Při inhibici enzymu HPPD nitisinonem se NTBC neváže kovalentně na enzym, protože komplex enzym-inhibitor disociuje s odhadovaným poločasem 25 °C, *in vitro* 63 hodin. Interakce NTBC s enzymem se tedy může vyznačovat rychlou inaktivací vytvoření komplexu,

který může pomalu disociovat s obnovením aktivity enzymu. Tento proces naznačuje, že NTBC se váže na stejnou část aktivního místa jako substrát.

Při pokusech s podáváním vyšších dávek NTBC potkanům, např. 10 mg/kg, se odbourávání z jater výrazně zpomalilo po 24 hodinách, s menší ztrátou na čtvrtý až sedmý den (Lock et al. 1996). Z této skutečnosti vyplývá, že během druhého a třetího dne podávání denní dávky byla HPPD zcela inhibována, což vedlo k ustáleným plazmatickým koncentracím NTBC a tyrosinu po několikanásobném podání, které způsobily poškození očí. Oční léze byly tedy způsobeny tyrosinemií, která byla prokázána u potkanů krmených nízkobílkovinnou dietou obsahující 5 % hm. tyrosinu, což vedlo k oční toxicitě podobné toxicitě NTBC. U samotného tyrosinu však byl pozorován 100% výskyt očních lézí, které byly závažnější než léze pozorované u NTBC.

Podobný pokus byl opět proveden na myších, kde byly použity vyšší koncentrace NTBC a nedošlo k žádným očním lézím. Při téměř úplné inhibici jaterní HPPD bylo pozorováno rychlejší odbourávání tyrosinu z plazmy než u potkanů. Za rychlou degradaci byla pravděpodobně zodpovědná aktivita jaterní tyrosinaminotransferázy, která je u myší vyšší. Tato zjištění vedla k domněnce, že dolní hranice pro tyrosin v plazmě a výskyt poškození očí je 1000 nmol/ml (Lock & Smith 2003). Další výskumy na jiných zvířatech však ukázala, že ani při hladinách tyrosinu v plazmě vyšších než 1000 nmol/ml nedocházelo k poškození očí. Opět tedy existoval předpoklad vlivu jiných faktorů.

3.2 Tyrosinémie u lidí

Tyrosinémie je dědičné onemocnění metabolismu, způsobené neschopností organismu účinně odbourávat aminokyselinu tyrosin. Pacienti trpí mutací genu kódujícího enzym fumarylacetoacetát hydrolázu (FAH), který katalyzuje přeměnu fumarylacetoacetátu na kyselinu fumarovou a acetocetovou. Má vysokou morbiditu a mortalitu, zejména v prvních letech života, především v důsledku závažných jaterních onemocnění, včetně rakoviny jater nebo úplného selhání jater (Lindstedt et al. 1992).

Předchozí výzkum inhibitorů HPPD položil základy pro jejich další využití. Výzkum Svena Lindstedta a jeho kolegů z univerzity ve švédském Göteborgu se zaměřil na použití NTBC u tyrosinémie 1. typu. Koncept spočíval v blokování HPPD u pacientů, což by zabránilo tvorbě toxických metabolitů počínaje kyselinou homogentisovou a dále po degrační dráze zlepšující jejich zdravotní stav. Inhibice lidské HPPD byla prokázána na lidských játrech.

V roce 1991 použil Lindstedt se souhlasem švédské Medical Products Agency (MPA) NTBC ke klinické léčbě vážně nemocného dvouměsíčního kojence, která byla úspěšná (Lindstedt et al. 1992). Podobná léčba byla úspěšně provedena i u dalších pacientů, což vedlo k zákonnému schválení léku US Food and Drug Administration v roce 2002 a European Medicines Agency (EMA) v roce 2005. Lék byl uveden na trh pod obchodním názvem Orfadin®.

koumaným parametrem toxických metabolitů byla přítomnost sukcinylacetonu v moči, přičemž hladiny tyrosinu byly v tomto případě zanedbatelné (Sander et al. 2006). Hladiny tyrosinu v plazmě pro terapeutické účely by však neměly překročit 400 μ M kvůli potenciální tyrosinové toxicitě. Léčba NTBC tedy musí být kombinována s nízkobílkovinnou dietou doplněnou směsí aminokyselin zbavenou tyrosinu a fenylalaninu (Das 2017). Za velký úspěch

se považuje zejména skutečnost, že léčba nahradila transplantaci jater, která bývala v mnoha případech nutná.

Ačkoli je NTBC stále nedostatečně prozkoumaným lékem, dosud zjištěné nežádoucí účinky jsou vzácné a obvykle reverzibilní. Oční léze, které se vyskytly v předchozích studiích na savcích, byly u lidí minimální, obvykle souvisely s vysokou hladinou tyrosinu a byly reverzibilní při snížení hladiny dodržováním přísné diety (Mayorandan et al. 2014). Neurokognitivní deficity vyskytující se u některých pacientů jsou stále předmětem zkoumání (Thimm et al. 2012).

3.3 Nitisinon jako kandidát na léčbu onemocnění spojených s poruchami metabolismu tyrosinu

3.3.1 Alkaptonurie

Mezi další onemocnění spojená s poruchami metabolismu tyrosinu patří alkaptonurie, která je důsledkem nedostatku enzymu homogentisát dioxygenázy (HGD). Alkaptonurie je (autozomálně recesivní) porucha, při níž nedostatek HGD brání metabolismu kyseliny homogentisové (HGA) na kyselinu maleylacetoctovou (O'Brien et al. 1963). Výsledným efektem je tedy hromadění HGA v tělesných tekutinách, a to i přes účinné vylučování ledvinami. Při této poruše dochází k procesu zvanému ochronóza, kdy se cirkulující HGA přeměňuje na pigmentovaný polymer, který může být viditelný na uších a očích. Tento pigment se ukládá v tkáních vysoce selektivním, dosud nevysvětleným způsobem. Výše uvedené procesy napadají především chrupavku, takže kloubní tkáň jsou u alkaptonurie nejzranitelnější oblastí.

Studie potvrdily snížení vylučování HGA při léčbě nitisinonem, což naznačuje pravděpodobnost snížení tvorby polymerů. Tento výzkum však vyžaduje další zkoumání k potvrzení klinické účinnosti (O'Brien et al. 1963).

3.3.2 Okulokutánní albinismus

Další experimentální výzkum Ighovie F. Onojafe a kolegů pro American Society for Clinical Investigation se zabýval léčbou okulokutánního albinismu, který je způsoben mutací genu tyrosinázy. Tyrosináza (TYR) je enzym, který katalyzuje přeměnu tyrosinu na dihydroxyfenylalanin a poté na dopachinon, z něhož se dále v těle tvoří melanin. Tato forma albinismu se vyznačuje sníženou pigmentací kůže a očí melaninem nebo ztrátou zraku. Ztráta zraku je způsobena především defektním pigmentovým epitelem sítnice. Řešením by tedy mohlo být zvýšení oční pigmentace u pacientů, což by podpořilo správnou funkci očí. Hypotézou výzkumu bylo použití nitisinonu ke zvýšení plazmatické koncentrace tyrosinu, což by vedlo ke stabilizaci TYR a zlepšení pigmentace u pacientů. Pokusy na myších tuto hypotézu potvrdily, takže můžeme jen doufat, že další klinické studie potvrdí jeho účinnost u lidí (Onojafe et al. 2011).

3.4 Nitisinon v léčbě Parkinsonovy choroby

Nedávno se vědcům podařilo odhalit propojení aminokyselinové transaminázy 1 s rozvětveným řetězcem (BCAT1) s pohybovou poruchou Parkinsonovy choroby (PD). Výzkum převedený na *C. elegans* ukázal, že redukce BCAT1 způsobuje u hlístice křečovitě, zkroucené pohyby, které se projevují s rostoucím věkem organismu. Tato zjištění položila základ pro další testování a vývoj léků na PD. K testování bylo vybráno padesát léků schválených FDA, z nichž čtyři, včetně nitisinonu, by mohly v budoucnu představovat vhodné kandidáty na léčbu s ohledem na pozdější věk pacientů. Podle těchto zjištění se za slibné léky pro PD považují především ty, které působí na metabolické (NTBC) nebo mitochondriální funkce (Sohrabi et al. 2020).

3.5 Nitisinon proti přenosu africké trypanosomózy a malárie

Africká trypanosomóza je smrtelné onemocnění lidí a zvířat, které přenáší krev sající moucha tse-tse (*Glossina*). Zatím proti ní nebyla vynalezena žádná vakcína, takže jediným účinným mechanismem zůstává kontrola populace mouchy tse-tse. V současnosti používanou metodou je používání neurotoxických insekticidů s vysokou účinností, ale s nežádoucími účinky na životní prostředí a hmyzí opylovače. Nové studie se snaží vynalézt alternativu šetrnější k životnímu prostředí a zaměřují se na dráhu metabolismu tyrosinu. Krevní potrava mouchy tse-tse obsahuje vysoké množství tyrosinu, který je bez degradace nebo vhodné eliminace pro hematofágní hmyz toxický. Experimentální aplikace nitisinonu byla pro mouchy tse-tse smrtelná, ať už při orálním požití, nebo při povrchové aplikaci. Orální aplikace NTBC čmelákům (*Bombus*) však neměla vliv na jejich přežití, což svědčí o netoxičnosti pro opylovače. Nitisinon by tak mohl být slibným ekologičtějším insekticidem, např. s endektocidním využitím (Sterkel et al. 2021).

Výzkum s podobným mechanismem účinku provedli také Vergaray Ramirez et. al. (2022). Předmětem jejich výzkumu byly však komáři (Culicidae), u nichž prokázali letalitu v nitisinonových krmných testech i při povrchové aplikaci.

3.6 Nitisinon v boji proti nemocem přenášeným klíšťaty

Prostřednictvím osobní komunikace s Mgr. Janem Pernerem, PhD., z Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd ČR nám byl potvrzen účinek nitisinonu v úvodních testech na *Ixodes ricinus*. V testech přežití byla u jedinců *I. ricinus* krmných NTBC pozorována výrazná letalita a změna velikosti snůšky vajec u přeživších samic, což vedlo k tomu, že se nevytvořily žádné larvy.

Všechny výše uvedené příklady použití NTBC podtrhují jeho velký význam a potenciál, stejně jako důležitost dalšího pochopení mechanismu jeho účinku. S lepším pochopením můžeme navrhnout účinné herbicidy, insekticidy nebo léčbu lidí se vzácnými vrozenými chybami metabolismu tyrosinu.

4 *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans je malá, průhledná, volně žijící půdní nematoda s celosvětovým rozšířením. Dospělí jedinci dosahují velikosti 1 mm, zatímco čerstvě vylíhlé larvy jsou velké pouze 0,25 mm. Vyznačují se také velmi rychlým životním cyklem, 3 dny při teplotě 25 °C. Fungují především jako autogamní hermafroditi, s ojedinělým výskytem samců.

Průkopníkem využití *C. elegans* jako modelového organismu pro vědu byl Sydney Brenner z Cambridge University v roce 1974, který chtěl tuto nematodu využít v molekulární biologii, zejména v oblasti vývojové biologie a neurobiologie. Podařilo se mu definovat asi 100 genů a popsat asi 300 mutací ovlivňujících chování a morfologii organismu. Dnes je znám celý genom *C. elegans*, jehož sekvence byla dokončena jako u prvního mnohobuněčného organismu na světě (*C. elegans* Sequencing Consortium 1998).

4.1 *Caenorhabditis elegans* jako modelový organismus pro vědu

V současné době se výzkum *C. elegans* posunul do nových mezí, zahrnující studie základního fungování a interakcí eukaryotických buněk, interakcí mezi hostitelem a parazitem nebo studium lidských chorobných procesů. Zásadní význam pro studium *C. elegans* byla možnost řešit biologické problémy geneticky, a to jak přímými, tak reverzními genetickými přístupy na úrovni celého organismu nebo jedné určené buňky.

4.1.1 Pozorování *Caenorhabditis elegans* *in vitro*

K přímému pozorování organismu se obvykle používá stereomikroskop nebo tzv. složený mikroskop, kterým se nematody pozorují na Petriho miskách během běžných životních aktivit, jako je pohyb, krmení, vývoj, páření nebo kladení vajíček. Stereomikroskop umožňuje pozorování s vyšším rozlišením, což vědcům umožňuje provádět experimenty na úrovni jednotlivých buněk se zaměřením na buněčný vývoj a funkci.

Díky průhlednosti *C. elegans* lze jednotlivé buňky a subcelulární detaily vizualizovat pomocí Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC). Pro ještě lepší zvýraznění detailů lze použít fluorescenční protein ke značení proteinů nebo subcelulárních částí. Tyto proteiny lze také použít ke studiu vývojových procesů, ke screeningu mutantů ovlivňujících vývoj a funkci buněk, k izolaci buněk a k charakterizaci interakcí proteinů *in vitro* (Chalfie et al. 1994; Boulin T et al. 2006; Feinberg et al. 2008).

4.1.2 *Caenorhabditis elegans* na molekulární úrovni

Díky svému rychlému životnímu cyklu se *C. elegans* stal oblíbeným modelem pro genetické studie eukaryot. Kromě toho má tento organismus také neměnný počet somatických buněk, což vědcům umožnilo sledovat osud každé jednotlivé buňky mezi oplozením a dospělostí u živých jedinců a stanovit kompletní buněčnou linii (Sulston & Horvitz 1977; Kimble & Hirsh 1979; Sulston et al. 1983). Vědci také dokázali na základě elektronových mikrofotografií rekonstruovat tvar všech buněk *C. elegans*, včetně každého z 302 neuronů dospělého hermafrodita (White et al. 1986) a zadního pářícího oběhu u dospělého samce (Jarrell et al. 2012). Tyto rekonstrukce poskytly dosud nejúplnější "schému vedení"

jakéhokoli nervového systému a pomohly vysvětlit, jak pohlavní dimorfismus ovlivňuje neuronální okruhy.

Neměnný tvar buněčné linie a neuroanatomie *C. elegans* také umožnil objev mutací způsobujících vývojové a behaviorální poruchy při genetickém sledování. Jak již bylo zmíněno výše, jako první mnohobuněčný organismus s kompletně sekvenovaným genomem byl *C. elegans* využit pro přímou a zpětnou genetiku, což vedlo k molekulární identifikaci mnoha klíčových genů ve vývojových a biologických buněčných procesech.

Podobnost buněčných a molekulárních procesů u *C. elegans* a ostatních živočichů napříč evolucí (metabolismus, struktura a funkce organel, genová regulace, biologie proteinů atd.) učinila z *C. elegans* ideální organismus pro studium obecné mnohobuněčné biologie. Nejméně 38 % protein kódujících genů u *C. elegans* má předpokládané ortology v lidském genomu (Shaye & Greenwald 2011), 60-80 % lidských genů má ortolog v *C. elegans* (Kaletta & Hengartner 2006) a 40 % lidských genů souvisejících s nemocemi má jasné ortology v genomu *C. elegans* (Culetto & Sattelle 2000). Mnoho objevů u *C. elegans* má tedy významný přínos pro studium lidského zdraví a nemocí. Můžeme zmínit například využití *C. elegans* při výzkumu antihelmintik a nematocidů, při výzkumu obezity a regulace tuku, při zkoumání mechanismu působení těkavých anestetik a mnoho dalších.

V zemědělství se tento půdní nematod běžně používá k testování environmentální toxicity zemědělských přípravků, jako jsou například fungicidy (Raley-Susman et al. 2017).

4.2 *C. elegans* a nitisinon

Toxikologické studie nitisinonu u rostlin a zvířat, zejména savců - včetně člověka, nám umožnily nahlédnout do mechanismu účinku NTBC jako inhibitoru enzymu HPPD. Výzkumy leptospermonu, účinné látky nitisinonu, byly prováděny také u hmyzu rodu *Drosophila*. Účinek na *Drosophila suzukii*, známého škůdce ovoce, byl prokázán při fumigaci nebo kontaktní toxicitě proti dospělcům *D. suzukii* (Park et al. 2017).

Další výzkum se zabýval škůdcem *Drosophila melanogaster*, který se také vyskytuje převážně na ovoci nebo jiných potravinách. Tento škůdce je důležitým modelovým organismem pro vědu, zejména v oblasti genetiky nebo vývojové biologie. Má také značné využití jako genetický model pro lidské nemoci, protože jeho genom je ze 60 % homologní s lidským genomem (Ugur et al. 2016). Výzkum se zaměřil na identifikaci metabolických drah spojených se stárnutím u *D. melanogaster*, přičemž pozoroval zvýšené hladiny tyrozinu s rostoucím věkem. Snížení enzymů v degračních drahách tyrozinu významně prodloužilo délku života organismu (Parkhitko et al. 2020).

Podle našich znalostí však dosud nebyl proveden žádný výzkum NTBC na organismech bez krevního oběhu nebo hematofágie, s výjimkou výše zmíněného výzkumu využití NTBC při léčbě Parkinsonovy choroby. Vzhledem k jeho vlastnostem jsme tedy pro naši práci vybrali *C. elegans* jako vhodný organismus pro další zkoumání fungování NTBC. Navíc je *C. elegans* v praxi běžně používán pro různé toxikologické studie (Toxicology Letters 2019).

Cílem našeho experimentu je prokázat vliv NTBC na HPPD u *C. elegans*, při použití NTBC jako herbicidu, pesticidu nebo léčiva u lidí, s dosahem na půdu. V tomto případě bude *C. elegans* sloužit jako modelový půdní organismus, který poskytne vzhled do potenciální toxicity u námi zkoumaného organismu nebo do předpokládané toxicity u jiných půdních

organismů. Při podrobnějším zkoumání fungování inhibiční reakce HPPD a dráhy degradace tyrozinu *C. elegans* můžeme také dospět k zajímavým poznatkům pro vědu s důsledky pro účinnější výrobu herbicidů, pesticidů nebo pro využití v medicíně.

5 Metodika

Molekulárně-biochemická část práce zahrnovala přípravu komponentů zapojených do PCR reakce, jako je návrh primerů, extrakci RNA a z ní následnou syntézu cDNA. Výsledky PCR reakce byly sledovány pomocí gelové elektroforézy s následným UV prosvícením. Restričním klonováním byl náš cílový gen *hpd-1* dále zaklonován do bakteriálního média pro další laboratorní pozorování, až po cílových expresních bakterií použitých v kolorimetrické esaji pro přímé pozorování inhibice proteinu *hpd-1* nitisinonem.

5.1 PCR

Polymerase chain reaction (PCR), nebo také polymerázová řetězová reakce, je laboratorní metoda používaná k rychlé amplifikaci velkého množství specifického úseku vzorku DNA. Reakce probíhá v termocykleru, kde přístroj v požadovaných intervalech mění teplotu. Součástí reakce jsou vzorek DNA, forward a reverse primery, DNA polymeráza a základní reakční roztok s volnými nukleotidy a podpurnými prvky.

5.1.1 Navrhování primerů

Primery pro naši reakci byly navrženy ze sekvence cílového genu *hpd-1* pomocí platformy WormBase a následně upraveny a vyladěny pro klonování do plazmidu *E. coli* v programu NEBcutter V2.0 (Vincze et al. 2003). Pomocí programu Oligo Calc (Kibbe 2007) byly provedeny konečné úpravy námi vybrané sekvence z hlediska teploty tání a dalších parametrů. Primery byly navrženy pro restriční klonování do vektoru pJET1.2, s restričními místy *NcoI* a *Sall*, která jsou v tabulce sekvencí označena malými písmeny a podtržením.

Tabulka 1- Sekvence primerů:

hpd-1 fwd; <i>NcoI</i> 5'- <u>ccatggac</u> ATGACTACATTCGACAAAGGAGCA-3'
hpd-1 rev(RC); <i>Sall</i> 5'- <u>gtcgac</u> TTACTTAGTATTTCCATCCTTAACATTATCAT-3'

5.1.2 Extrakce total RNA z *C. elegans* a purifikace extrahované RNA

Extrakce probíhala podle protokolu od Green & Sambrook (2020). RNA byla izolována z dospělých červů *C. elegans* pomocí následujících činidel: chloroform, ethanol (75%), minimal medium buffer M9, isopropanol, jednorázové lyzační činidlo TRIzol a destilovaná H₂O bez RNáz. Princip extrakce spočíval ve vymytí červů z misek a jejich několikanásobném promytí pufrem M9 a centrifugace. Po poslední centrifugaci byl supernatant odstraněn a zbytek obsahující červy byl odpipetován do zkumavky a uchován. Přidáním TRIzolu došlo k rozpuštění červů a následné přidání chloroformu umožnilo oddělení RNA od DNA. Vzniklý supernatant obsahující RNA byl izolován přidáním isopropanolu. Vzorek byl dále promyt

75% ethanolem, aby se odstranil TRIzol (Invitrogen™-Ambion®), isopropan (Invitrogen™-Ambion®) a další nežádoucí látky; a nechal se odpařit ve vakuu. Nakonec byl vzorek rozpuštěn v dH₂O bez Rnázy, přenesen do nové zkumavky a uložen při -80 °C.

RNA byla přečištěna od zbytků DNA pomocí Dnázy s Ambion® TURBO DNA-free 9™ Kit.

5.1.3 Syntéza cDNA z total RNA

Syntéza cDNA byla provedena pomocí reakce reverzní transkriptázy z total RNA podle protokolu SuperScript™ IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction. Jako primer byl v naší reakci použit Oligo d(T)20.

5.1.4 PCR a analýza výsledků

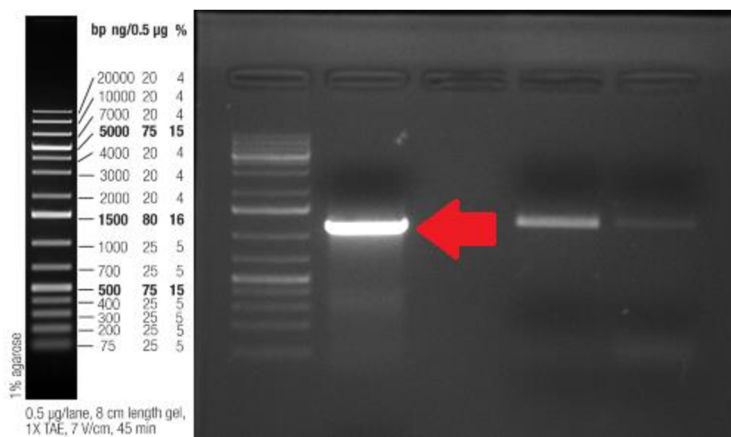
Samotná PCR reakce byla smíchána na koncentraci 50 µl s použitím 25 µl PCR Master Mix EmeraldAmp® (TaKaRa), 2 µl KO21 cDNA, 1 µl námi navržených forward a 1 µl reverse primerů a 21 µl dH₂O. Teplotní cyklus byl nastaven podle návodu k použití PCR Master Mix (EmeraldAmp®).

Tabulka 2- Počet, délka a teplota reakčních cyklů PCR:

1.	denaturace	98 °C	0:30 min
2.	denaturace	98 °C	0:10 min
3.	renaturace	58 °C	0:30 min
4.	syntéza	72 °C	1:30 min
	krok č.2-4		35 x
5.	syntéza	72 °C	10:00 min
		10 °C	∞

Analýza výsledků PCR byla provedena elektroforézou v 1% agarózovém gelu a pufru TAE. Přidání ethidium bromidu umožnilo následné UV prosvícení a detekci cílového genu hpd-1.

Kódující sekvence hpd-1 obsahuje 1182 bp. V gelu pro elektroforézu byl použit GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™), podle něhož byla kontrolována velikost našeho genu pomocí bendu, a tím i úspěšnost PCR reakce a přítomnost genu.



Obrázek 3- Vlevo stupnice GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder , vpravo PCR produkt *hpd-1* *C. elegans* v elektroforézním gelu (cca 1182 bp).

Extrakce PCR amplifikované DNA z gelu byla provedena pomocí Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit. Koncentrace DNA byla měřena pomocí mikrospektrofotometru NanoDrop.

5.2 Restrikční klonování

PCR produkty byly zaklonovány do klonovacího vektoru pJET1.2 (CloneJET™ PCR Cloning Kit). „Sticky-end“ konce insertu *hpd-1* vytvořené Taq polymerázou byly odštěpeny tzv. „blunting“ reakcí (podle protokolu poskytnutého výrobcem), což umožnilo následné vložení do „blunt-end“ vektoru pomocí ligace T4 DNA ligázou.. Vektor byl dále transformován do hostitelského organismu kompetentních bakterií DH5-Alpha, kmene *E. coli*, metodou tepelného šoku. Hostitelské bakterie byly nařeny na LB plotny s ampicilinem a následně udržovány při 37 °C, kde vytvořily kolonie s plasmidy obsahujícími *hpd-1*. Po 24 hodinách byly kolonie otestovány na přítomnost insertu pomocí Colony PCR s plasmidovými primery (sekvence jsou uvedeny v tabulce 3).

Tabulka 3- Sekvence primerů:

pJET1.2 forward sequencing primer; 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC- 3'
pJET1.2 reverse sequencing primer; Sall 5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3'

Tabulka 4- Počet, délka a teplota cyklů Colony PCR reakce:

1.	denaturace	95 °C	3:00 min
2.	denaturace	95 °C	0:30 min
3.	renaturace	55 °C	0:30 min
4.	syntéza	72 °C	1:30 min
	krok č.2-4		35 x
5.	syntéza	72 °C	5:00 min
		10 °C	∞

Výsledky DNA z Colony PCR ukázaly pozitivní kolonie. Vybrané kolonie byly naočkovány do zkumavek s 5ml LB media s Ampicilinem a byly inkubovány přes noc na třepačce (72 °C, 225rpm). Cílový amplifikovaný plazmid byl následně izolován pomocí GenElute™ Plasmid Miniprep Kit.. Izolovaný plazmid byl odeslán k sekvenování, aby se ověřila přítomnost genu hpd-1.

Po pozitivních výsledcích sekvenace byl náš cílový gen klonován z vektoru pJET1.2 do expresního vektoru pET-22b(+) pomocí restriční klonování. Insert hpd-1 byl vyštěpen z vektoru pJET1.2 pomocí restričních enzymů NcoI a Sall (37 °C, 20 min.), oddělen na agarové elektroforéze a izolovaný z gelu (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit). Stejně tak vektor pET-22b(+) byl linearizován pomocí stejných restričních enzymů. Insert byl následně zaligován do linearizovaného plasmidu pomocí T4 DNA ligázy. Ligační směs byla použita pro transformaci kompetentních bakterií. Pro druhou Colony PCR byly použity primery T7.

Tabulka 5- Sekvenace primerů:

T7 promotor fwd; 5'-TAATACGACTCACTATAGGG- 3'
T7 terminator rev; 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

Tabulka 6- Počet, délka a teplota cyklů druhé reakce Colony PCR:

1.	denaturace	98 °C	0:30 min
2.	denaturace	98 °C	0:10 min
3.	renaturace	50 °C	0:30 min
4.	syntéza	72 °C	0:07 min
	krok č.2-4		35 x
5.	syntéza	72 °C	10:00 min
		10 °C	∞

Na základě pozitivních výsledků DNA z Colony PCR byl z bakterií opět izolován plazmid pomocí GenElute™ Plasmid Miniprep Kit a odeslán k sekvenování. Sekvenací ověřené vektory pET-22b(+) obsahující hpd-1 byly transformovány tepelným šokem do hostitelských expresních bakterií pLysS. Bakterie s plazmidem byly poté opět udržovány 16 hodin při 37 °C na Petriho miskách v LB médiu spolu se selektivním antibiotikem Ampicilinem a následně uchovávány v 8 °C.

5.3 Kolorimetrická esej sledování inhibitoru hpd-1 – nitisinonu u

C. elegans

Esej byla provedena podle protokolu Neuckermans et al. (2019) a začala přípravou reakčního média v podobě 5 ml LB, 5 µl Ampicilinu a bakterií z pozitivní kolonie. Reakční médium bylo ponecháno přes noc v třepačce při 37 °C, 225 r.p.m.

Z takto připraveného reakčního média bylo odebráno 0,5 ml kultury kterou jsme přidali do 100 ml LB. Takto byly připraveny dvě zkumavky a byly opět umístěny na třepačku při 37 °C. Průběžně jsme kontrolovali růst bakterií až do OD₆₀₀= 0,6; což se nám podařilo asi po 3 hodinách. Po uplynutí této doby jsme do každé zkumavky přidali 100 µl ITPG (do finální koncentrace 1mM), 75 mg L-tyrosinu (finální koncentrace 0,75 mg/ml) a pouze do jedné zkumavky 237 µl NTBC (finální koncentrace nitisinonu 5 µM). Připravený roztok byl vrácen na třepačku při stejné teplotě, kde zůstal až do následujícího dne. Tímto postupem byl proveden pokus s bakteriemi ze dvou pozitivních kolonií. Výsledkem eseje mělo být rozdílné zbarvení reakčních roztoků s obsahem NTBC a bez něj.

5.4 Fenotypizační testy

Pro zkoumání a charakterizaci vlivu NTBC na fenotypové změny u *C. elegans* bylo provedeno pozorování *in vitro* na NGM destičkách pomocí mikroskopických, kvantifikačních a fluorescenčních metod.

5.4.1 Příprava NGM- nematode growth medium s agarom

Agarové živné médium pro nematody bylo připraveno z 1,5 g NaCl; 8,5 g agaru; 1,25 g peptonu (ze sóji) a 488 ml dH₂O. Roztok byl umístěn do autoklávu a poté se nechal vychladnout ve vodní lázni o teplotě 55 °C. Pokračovali jsme přidáním 500 µl 1M CaCl₂, 500 µl 1M MgSO₄ a 500 µl 5mg/ml cholesterolu v 96% ethanolu. Nakonec bylo přidáno 12,5 ml 1M KPO₄ pufru a hotová směs byla rozpipetována do Petriho misek o průměru 60 mm (10 ml NGM) a 35 mm (3 ml NGM).

5.4.2 Příprava synchronizované kultury larválních stádií L1 *C. elegans*

Pro účely našeho výzkumu jsme potřebovali synchronizovanou kulturu wild-type *C. elegans*, abychom zajistili jednotnost vývoje sledovaných nematod.

Samotná synchronizace začala čištěním dospělých jedinců *C. elegans* obsahujících embrya, z misek. K tomuto procesu bylo použito 150 µl KOH, 300 µl SAVO originál a M9 pufru. Miska byla promyta 1000 µl M9 do zkumavky, která byla stočena na 5000 r.p.m, 30 s, ponecháno ve zkumavce bylo 350 µl roztoku a zbytek byl odpipetován. K tomuto množství bylo dále přidáno 150 µl roztoku KOH + SAVO, který byl promíchán a ponechán po dobu 3-4 min, kdy jsme pod mikroskopem pozorovali rozlomení dospělců v místě vulvy a uvolnění embryí. Poté byla zkumavka s obsahem opět stočena na 5000 r.p.m, 30 s, roztok byl odpipetován s ponecháním sedimentu na dně zkumavky a byl přidán pufr M9. Tento postup se opakoval třikrát až do posledního přidání pufru M9, kdy byl celý roztok ze zkumavky přelity do nové misky, kde byl ponechán do dalšího dne. Z embryí (vajíček) se přes noc vylíhly larvy *C. elegans* ve stadiu L1.

5.4.3 Testy přežívání *C. elegans* v médiu s nitisinonem a erytrocyty

Roztok pufru M9 a larev L1 byl naředěn na 200 µl a poté byly 2 µl roztoku odpipetovány do nové zkumavky. Podle našich přibližných výpočtů by ve 2 µl roztoku mělo být asi 50 jedinců L1. Dále bylo přidáno 100 µl roztoku NTBC s PBS (koncentrace nitisinonu v roztoku

600 mg/l) a 98 μ l pufru M9. Takto byly připraveny dva vzorky. Do dalších tří zkumavek bylo přidáno 198 μ l pufru M9 a 2 μ l roztoku pufru M9 s larvami L1. Připravené zkumavky byly ponechány v klidu při pokojové teplotě po dobu 6 hodin. Následně bylo na 5 připravených NGM misek o průměru 60 mm přidáno 200 μ l krmného média bakterií OP50. Další obsah misek je uveden v následující tabulce.

Tabulka 7- koncentrace roztoků v reakcích:

1.	198 μ l M9 pufr + 2 μ l roztoku M9 pufru s L1 larvami	pozitivní kontrola
2.	100 μ l NTBC roztoku + (198 μ l M9 pufr + 2 μ l roztoku M9 pufru s L1 larvami)	NTBC přidán až na misku
3.	100 μ l NTBC roztoku + 100 μ l erytrocytů + (198 μ l M9 pufr + 2 μ l roztoku M9 pufru s L1 larvami)	NTBC přidán až na misku
4.	100 μ l NTBC roztoku + (98 μ l M9 pufr + 2 μ l roztoku M9 pufru s L1 larvami)	L1 inkubovány s NTBC po dobu 6 hodin
5.	100 μ l NTBC roztoku + 100 μ l erytrocytů + (98 μ l M9 pufr + 2 μ l roztoku M9 pufru s L1 larvami)	L1 inkubovány s NTBC po dobu 6 hodin

Misky byly ponechány při pokojové teplotě po dobu čtyř dnů, kdy byl následně výsledek pozorován pod mikroskopem. Finální koncentrace NTBC v tomto experimentu byla 60 μ M.

5.4.4 Testy přežívání a reprodukce *C. elegans* v médiu s nitisinonem a tyrosinem

Testy přežívání byly provedeny podle upraveného protokolu Panska et al. (2023).

Do předem připravených Petriho misek s NGM médiem byl přidán L-tyrosin ve finální koncentraci 1 mg/ml (koncentrace tyrosinu v zásobním roztoku 45 mg/ml v 1M HCl) a 100 μ l OP50. Tímto způsobem bylo připraveno 24 misek o průměru 35 mm. Do 12 z těchto misek bylo přidáno 100 μ l roztoku NTBC v PBS (o koncentraci 600 mg/l).

První den bylo po jednom jedinci ze synchronizované kultury wild-type *C. elegans* přeneseno na 4 misky obsahující NTBC a 4 misky neobsahující tento inhibitor. Vybrány byly larvy ve stadiu L4. Následně byly takto přenesení nematodi umístěny do inkubátoru při 22 °C uchování do následujícího dne.

Druhý den byl pouze na 1 ze 4 NTBC misek nalezen živý jedinec *C. elegans*, na miskách bez inhibitoru přežili 3 jedinci. Tito jedinci byli přeneseni na nové misky se stejným médiem, na kterém se předtím nacházeli. Původní misky byly ponechány a spolu s novými umístěny zpět do inkubátoru při 22 °C.

Třetí den byli nalezeni živí dospělci *C. elegans* pouze ve dvou miskách, z nichž jedna obsahovala NTBC a druhá nikoli.

Celý experiment měl trvat 4 dny pro možnost statistického zpracování fekundity *C. elegans* za daných podmínek, ale bohužel musel být v této fázi ukončen z důvodu nedostatečné kvality dosud získaných dat/pozorování.

Stejný pokus byl opakován ještě jednou po dobu 4 dnů, tentokrát s jinou konečnou koncentrací NTBC - 60 μ M a koncentrací L-tyrosinu 1 mg/ml. Zpočátku byly připraveny 4 destičky (průměr 35 mm s NGM, OP50) od každého ze sledovaných jevů: samotný wild-type *C. elegans*, *C. elegans* + L-tyrosin, *C. elegans* + NTBC a *C. elegans* + L-tyrosin + NTBC.

5.4.5 Pozorování přežívání *C. elegans* ve fluorescenčních testech

Fluorescenční testy byly provedeny podle upraveného protokolu Jackson & Hoste (2010).

Ze synchronizované kultury byly odebrány 2 μ l *C. elegans*, které by podle našich výpočtů měly obsahovat přibližně 30 jedinců L1. Bylo přidáno 193,5 μ l pufru M9. Tímto způsobem bylo připraveno 8 zkumavek. Do všech zkumavek bylo přidáno 4,5 μ l L-tyrosinu (koncentrace tyrosinu v zásobním roztoku 45 mg/ml v jednomolární HCl; konečná koncentrace tyrosinu 1 mg/ml) a následně jenom do 4 zkumavek 1,5 μ l roztoku NTBC v PBS (finální koncentrace NTBC 15 μ M). Připravené zkumavky byly uchovávány v inkubátoru při teplotě 22 °C. Po 8 hodinách byly do všech zkumavek přidány 2 μ l fluorescenčního konjugátu bakterií druhu *E. coli* (Invitrogen™-Ambion®) a takto namíchané roztoky byly opět umístěny do inkubátoru při stejné teplotě, kde byly uchovávány do následujícího dne.

Následující den jsme roztoky odstředili na centrifuze, přičemž jsme se zbavili supernatantu a ve zkumavce zůstal pouze pelet. K peletu byly přidány 2 μ l roztoku antihelmintika Levamisolu v methanolu (o koncentraci 1 mg/ml), na imobilizaci nematod. Po promíchání byly malé kapky pipetou nanášeny na mikroskopická sklíčka, na nichž byly dotyčné organismy pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem.

5.5 Alignment metoda

Metoda alignmentu sekvencí, neboli porovnávání sekvencí, fungovala na principu specifického uspořádání proteinových sekvencí s cílem najít oblasti podobnosti (Wiltgen 2018). V našem případě byl protein hpd-1 u *C. elegans* porovnáván s proteinem hpd-1 u jiných organismů, u rodů kterých již byl prokázán vliv NTBC. U *C. elegans* byla vybrána kódující sekvence z webové stránky WormBase, kterou jsme ve formátu "Conceptual translation" porovnali v programu BLAST® (Altschul et al. 1990) se sekvencemi námi vybraných rodů. Jednalo se o konkrétní rody: *Ixodes scapularis* (*Ixodes*), *Glossina fuscipes* (*Glossina*), *Anopheles maculipalpis* (*Culicoidea*), *Haemonchus contortus* (*Haemonchus*), *Drosophila suzukii* (*Drosophila*) a hpd-1 lidský – *Homo sapiens*. O vhodnosti výběru konkrétních zástupců z rodů rozhodovalo také procento shodnosti v programu BLAST®.

Samotný alignment byl provedený v programu MAFFT, kam byly vloženy sekvence hpd-1 *C. elegans* a zbývajících zástupců ve formátu FASTA a uvedeny do finální podoby v programu Geneious Prime 2023 (Dotmatics).

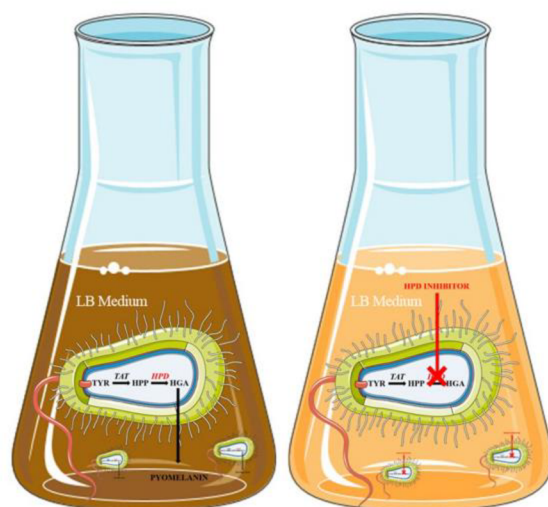
6 Výsledky

6.1 Molekulárně-biochemická analýza

6.1.1 Vyhodnocení kolorimetrické eseje sledování inhibitoru hpd-1 - nitisinonu u

C. elegans

Předmětem této práce bylo přímé pozorování inhibice proteinu hpd-1 inhibitorem nitisinonem. Hpd-1 byl obsažen v plazmidech expresních bakterií pLysS. Cílový gen byl přítomen v reakčním médiu rozděleném do dvou zkumavek, kdy pouze jedna z nich obsahovala inhibitor NTBC. Výsledkem pokusu mělo být rozdílné zbarvení roztoků. Díky přirozenému výskytu transamináz je *E. coli* schopna snadno přeměnit L-tyrosin na 4-hydroxyfenylpyruvát (HPP), což je první krok metabolismu tyrosinu, který je následně enzymem hpd-1 metabolizován na kyselinu homogentisovou (HGA). V roztoku bez NTBC by vzhledem k nepřítomnosti homogentisát 1,2-dioxygenázy (HGD) v *E. coli* mělo dojít k autooxidaci a samopolymeraci HGA. HGA tedy měla takhle produkovat ochronotický pigment podobný melaninu- pyomelanin, který vykazuje charakteristické hnědé zbarvení. V přítomnosti inhibitoru hpd-1 je aktivita tohoto proteinu blokována a proces ochronózy je tak znemožněn, tj. nedochází ke zbarvení.



Obrázek 4- Schéma fungování bakteriální eseje (Neuckermans et al. 2019).

Podle protokolu Neuckermans et al. (2019) měla být změna barvy viditelná po několika hodinách. Jakmile došlo k reakci a změně barvy, mohlo se pokračovat v dalším zkoumání fungování proteinu *C. elegans* hpd-1 na základě kvantifikace vzniklého pyomelaninu a dalších metod, jako je výpočet procenta inhibice v závislosti na dávce (koncentraci) inhibitoru, inhibiční křivky, IC₅₀ (Hendriks 2010) nebo různé další výpočetní a statistické metody.

Při námi použitých koncentracích klíčových látek v reakci – 0,75 mg/ml L-tyrosinu a 5 μ M NTBC v PBS však nebyly pozorovány žádné barevné změny ani po 24 h. Proto nebylo možné esej dále rozvíjet.

6.2 Analýza změn fenotypu

6.2.1 Výsledky testů přežívání *C. elegans* v médiu s nitisinonem a erytrocyty

Při této reakci *C. elegans* s NTBC byly jako zdroj tyrosinu použity erytrocyty. V tomto případě měly erytrocyty sloužit jako srovnávací faktor pro výsledky inhibice hpd-1 u *C. elegans* a u jiných živočichů, protože dosavadní výzkum NTBC se soustředil na hematofágní živočichy a živočichy disponující krevním oběhem.

Ve všech vzorcích však vývoj *C. elegans* přes larvální stádia k dospělcům probíhal i přes přítomnost nitisinonu a nebyly patrné jiné významné fenotypové změny, s výjimkou spozorované nižší motility. Použitá finální koncentrace nitisinonu byla 60 μM.

6.2.2 Výsledky testů přežívání a reprodukce *C. elegans* v médiu s nitisinonem a tyrosinem

V testech přežívání a rozmnožování *C. elegans* se měl sledovat především vývoj embryí a líhnutí vajíček do larválních stádií L1, což by se použilo ke kvantitativnímu stanovení životaschopnosti zkoumaného organismu a jeho odchylky od normálu.

Pokus měl trvat 4 dny, přičemž každý den byl jeden stejný hermafroditní dospělý jedinec schopný kladení vajíček, přenesen z předchozí misky na novou Petriho misku. Jedinci byli vždy přeneseni z misek a do misek se stejným médiem. (1. pokus- tyrosin × nitisinon + tyrosin / 2. pokus- čistá miska × tyrosin × nitisinon × nitisinon + tyrosin).

Při prvním pokusu byl druhý den po přemístění nalezen živý jedinec *C. elegans* pouze v jedné z misek obsahujících NTBC a tři živí jedinci v miskách bez NTBC. Třetí den však přežívali dospělci pouze na jedné misce s NTBC a jedné misce bez NTBC.

U obou nematod byly spozorovány změny v pohyblivosti, které byly výrazně pomalejší ve srovnání s normálními jedinci stejného druhu. Na miskách ze všech dnů byl rovněž pozorován výskyt embryí a larev ve stadiu L1, kde bylo spolu nalezeno pouze několik embryí a také pouze několik larev stadia L1. Tento stav je v rámci normálně přežívajících populací neobvyklý. Mladý dospělý hermafrodit má obvykle v daném okamžiku v děloze uloženo 10-15 vajíček (Schafer 2005). Za optimálních podmínek dospělý hermafrodit naklade 4-10 vajíček za hodinu (Lints & Hall 2009).

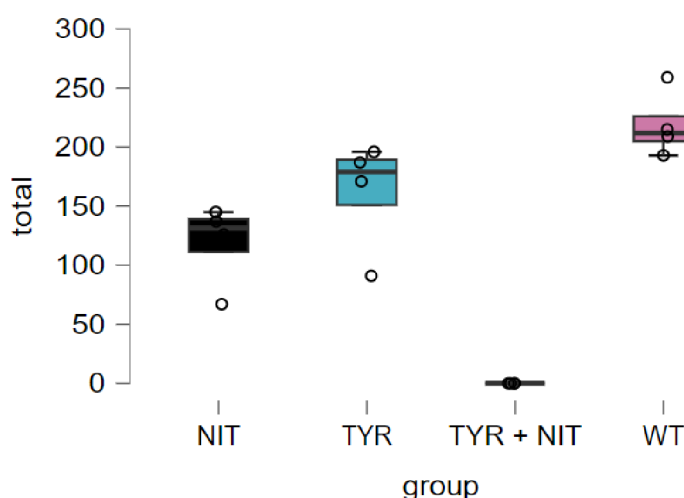
Výsledky prvního pokusu tedy nebyly relevantní pro statistické zpracování, ale předpovídaly nepříznivý účinek nitisinonu na přežití *C. elegans*. Problémy s přežíváním *C. elegans* však byly pozorovány i v tyrosinovém médiu, a tak je velmi obtížné určit, kterým faktorem byly nakonec ovlivněny.

Ve druhém experimentu byla použita jiná konečná koncentrace NTBC- 60 μM s koncentrací L-tyrosinu 1 mg/ml. Přežívání *C. elegans* ve studovaných médiích a počty nalezených přežívajících potomků (L1 larev) jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 8- počty přežívajících potomků *C. elegans* za různých podmínek:

vzorek	skupina	den 1	den 2	den 3	den 4	spolu
wild-type	1	71	143	0	1	215
wild-type	2	108	148	3	0	259
wild-type	3	52	140	1	0	193
wild-type	4	119	89	1	0	209
L-tyrosin	1	67	101	3	0	171
L-tyrosin	2	67	117	3	0	187
L-tyrosin	3	91	0	0	0	91
L-tyrosin	4	92	102	2	0	196
NTBC	1	26	38	3	0	67
NTBC	2	41	78	8	10	137
NTBC	3	43	72	11	0	126
NTBC	4	38	105	0	2	145
L-tyr+ NTBC	1	0	0	0	0	0
L-tyr+ NTBC	2	0	0	0	0	0
L-tyr+ NTBC	3	0	0	0	0	0
L-tyr+ NTBC	4	0	0	0	0	0

Tabulka 8 jasně ukazuje, že inhibice byla v tomto případě potvrzena. Následující boxplot graficky znázorňuje číselné údaje pomocí kvartilů (obrázek 5). Každý box představuje rozptyl daných vzorků, přičemž jejich medián je vyznačen tlustou čarou uvnitř boxu. Malé kroužky uvnitř nebo kolem boxů znázorňují velikost (v tabulce "spolu") konkrétních skupin. Můžeme tedy pozorovat trend normálního přežívání wild-type *C. elegans* ("WT" v grafu) v laboratorních podmínkách a odchylku od tohoto přežívání způsobenou přidáním nitisinonu (NIT), tyrosinu (TYR) nebo jejich kombinací (TYR+NIT). Z grafu je tedy patrné snížené přežívání *C. elegans* již vlivem L-tyrosinu, ještě více snížené přežívání *C. elegans* vlivem nitisinonu a nulové přežívání vlivem obou faktorů - L-tyrosinu i nitisinonu. V tomto případě se tedy potvrdila inhibice předpovězená metodou alignmentu.



Obrázek 5- Boxplot graf testu přežívání a rozmnožování *C. elegans* v médiích obsahujících NTBC a L-tyrosin.

6.2.3 Výsledky prežívání *C. elegans* ve fluorescenčních testech

Cílem tohoto experimentu bylo pozorování krmení se *C. elegans* fluorescenčním konjugátem bakterií druhu *E. coli*, které byly následně prosvíceny pod fluorescenčním mikroskopem. Takto prosvícené bakterie bylo možné pozorovat v trávicím traktu přeživších *C. elegans*, kteří se jimi krmili. Pod fluorescenčním osvětlením však nebyli nalezeni žádní živí jedinci.

Při klasickém přěsvícení bylo spozorováno několik mrtvých jedinců, někteří čerstvě rozložení, jiní více rozložení, takže byli pod mikroskopem špatně viditelní a pravděpodobně tedy mrtví už od začátku přidání L-tyrosinu nebo NTBC.

Použité koncentrace byly 15 μ M NTBC a 1 mg/ml pro L-tyrosin.

6.3 Analýza alignmentu

Podle výsledků zpracování alignmentu sekvencí proteinu hpd-1 u *C. elegans* a zástupců dalších rodů byla zjištěna významná shoda, 61,3 %, na základě shodnosti párů. Shodné aminokyseliny (zastoupené zkratkami) u různých organismů jsou barevně vyznačeny na přiloženém obrázku.



Obrázek 6- Alignment sekvencí proteinu *hpd-1*.

7 Diskuse

7.1 Kolorimetrická esej sledování inhibitoru hpd-1 - nitisinonu u

C. elegans a metoda alignmentu

Výsledky pozorování kolorimetrické eseje nedopadly podle našich očekávání, protože nebyla patrná žádná změna zbarvení roztoků, a tudíž nebyla patrná žádná funkce inhibiční reakce nitisinon × hpd-1 u *C. elegans* na molekulární úrovni. Hypotézou před zahájením experimentu bylo plné fungování inhibice na základě více poznatků, které jsme o této problematice dosud získali. Jednou z nich byla podobnost proteinu hpd-1 u *C. elegans* a dalších cílových organismů, zjištěná metodou alignmentu sekvencí. Na základě těchto podobností a zhody v sekvencích (61,3 % na základě zhodnosti párů) je možné předpokládat, že inhibice účinně funguje i u *C. elegans*, a to na základě skutečnosti, že účinnost inhibice byla vědecky prokázána u zástupců stejných rodů, jako jsou námi porovnávané organismy (*Ixodes scapularis* (*Ixodes*), *Glossina fuscipes* (*Glossina*), *Anopheles maculipalpis* (*Culicoidea*), *Haemonchus contortus* (*Haemonchus*)), případně u samotných zástupitelů (*Drosophila suzukii* (*Drosophila*), *Homo sapiens* (Lindstedt et al. 1992; Sterkel et al. 2021)). Tuto hypotézu se nám však nepodařilo potvrdit.

Příčinou nefunkčnosti naší inhibice však může být i mnoho dalších proměnných faktorů. Experimentu předcházela řada molekulárních *in vitro* ukonů, u nichž díky kontrole sekvencí víme, že příprava rekombinantního proteinu hpd-1 byla úspěšná. Problém tedy mohl nastat v expresním plazmidovém vektoru *E. coli*, kde byl použit pET-22b(+) v hostitelské bakterii pLysS. Odpovědí na úspěšnou inhibici by tedy mohla být změna vektoru na jiný typ vektoru, který by umožnil lepší produkci solubilního proteinu (např. pET SUMO), nebo změna hostitelských expresních bakterií.

Problémem při inhibici mohla být také použitá dávka, a tedy koncentrace L-tyrosinu a NTBC. Do příslušných roztoků v obou zkumavkách bylo přidáno 75 mg L-tyrosinu (finální koncentrace v reakci 0,75 mg/ml) a pouze do jedné ze zkumavek bylo přidáno 237 µl NTBC (finální koncentrace 5 µM). Změna koncentrace těchto důležitých látek by tedy hypoteticky mohla ovlivnit i průběh reakce.

Další teorií je, že nižší aktivita hpd-1 v našem experimentu byla způsobena důsledkem inkluzí, do kterých se tento protein mohl dostat a zůstat tak neaktivní. Svou roli mohly sehrát i další, dosud neprozkoumané faktory.

7.2 Testy přežívání *C. elegans* médiu s nitisinonem a erytrocyty

Při reakci *C. elegans* s nitisinonem byly tentokrát zdrojem tyrosinu erytrocyty. Ty byly použity se záměrem lépe porovnat fungování NTBC u *C. elegans* s organismy, na kterých byl výzkum dosud prováděn - což jsou organismy hematofágní a organismy s krevním oběhem. Podobné podmínky byly tedy nastaveny i pro naše, v přírodě volně žijící, půdní nematody. V žádné fázi jejího vývoje však nebyly zaznamenány změny v přežívání, s výjimkou nižší motility.

První otázkou je, v jakém množství byl tyrosin zastoupen v námi použitých erythrocytech. Je pravděpodobné, že NTBC spolu s tyrosinem v nižších koncentracích nemá na *C. elegans* významný vliv. To také vede k hypotéze, že přítomnost tyrosinu je klíčovým faktorem pro fungování inhibice nitisinonem. Problém však opět mohl být ve finální použité koncentraci NTBC.

V rámci časových možností bakalářské práce se tento test zaměřil pouze na samotné přežívání *C. elegans*. Je možné, že při velkém počtu *C. elegans* zastoupených v Petriho miskách došlo také k úhynu jedinců způsobenému NTBC nebo tyrosinem, případně k různým změnám v jejich chování, které jsme blíže nesledovali. Při opakování testu by bylo možné provést širší testy zahrnující pozorování více fenotypových znaků nebo testy faryngálního pumpování apod.

7.3 Testy přežívání a reprodukce *C. elegans* v médiu s nitisinonem a tyrosinem

První test zaměřený na vývoj embryí *C. elegans* a líhnutí vajíček do larválních stadií L1 byl rovněž neúspěšný. Zlom nastal třetí den, kdy přežili pouze 2 jedinci z 8, jeden na misce obsahující NTBC a jeden na misce s tyrosinem. Pokus byl proto v tento den ukončen. Údaje nebyly dostatečné pro porovnání přežívání s přežíváním jedinců v normálních podmínkách.

Oba nematodi však vykazovaly sníženou motilitu a také po prohlédnutí všech misek použitých v pokusu bylo nalezeno spolu pouze několik embryí a larev L1, což je neobvyklý stav.

Přežití bylo významně zhoršeno v obou studovaných verzích - na miskách s NTBC a tyrosinem i na miskách pouze s tyrosinem. Nebylo tedy možné určit, co je vlastně za tento stav zodpovědné. Naši hypotézou pro nefunkčnost pokusu jsou opět neoptimální laboratorní úkony, kdy mohlo dojít k poškození hlístic při přenášení na nové misky, nebo nešťastný výběr slabších jedinců, kterým mohly takto výrazně uškodit námi zvolené koncentrace L-tyrosinu nebo NTBC.

Druhý pokus čtyřdenního testu byl úspěšný a potvrdil inhibici při změněných koncentracích NTBC. Odchyly od normálního přežívání *C. elegans* bylo možné pozorovat již u médií se samotným L-tyrosinem a samotným NTBC, zatímco při kombinaci obou látek bylo přežívání nulové. Potvrdila se tak metoda alignmentu sekvencí hpd-1 u *C. elegans* a jiných organismů, která předpověděla pozitivní fungování inhibice.

7.4 Pozorování přežívání *C. elegans* ve fluorescenčních testech

Ve fluorescenčních testech byl pozorován podobný trend jako v předchozím experimentu, a to v podobě negativního účinku NTBC i tyrosinu. Při fluorescenčním přsvícení nebyly viditelné žádné živé organismy s fluorescenčními bakteriemi v trávicím traktu. Při konvenčním přsvícení bylo nalezeno celkem jen několik mrtvých jedinců (z celkového počtu přibližně 240 jedinců), což naznačuje, že tyrosin i nitisinon začaly působit ihned po přidání do roztoku s *C. elegans* a způsobily jejich smrt. Jejich brzký úhyn a rozklad v médiu komplikoval naše mikroskopické pozorování. Byla použita stejná finální koncentrace tyrosinu

(1 mg/ml), a proto předpokládáme, že byl opět příčinou úhynu jedinců. Opět se potvrdila i inhibiční funkce nitisinonu v kombinaci s tyrosinem.

7.5 Specifika výzkumu

Povaha našeho výzkumu byla specifická v tom, že podle našich znalostí nebyl dosud proveden žádný výzkum nitisinonu na organismu bez krevního oběhu nebo hematofágie (kromě zkoumání využití NTBC na *C. elegans* při léčbě Parkinsonovy choroby, s jiným záměrem a jiným sledovaným proteinem). Experimenty byly tedy obtížněji zacílitelné, protože jsme neměli k dispozici vzor v podobných organismech a spoléhali jsme se na standardizované laboratorní postupy nebo experimenty, které byly dosud provedeny s NTBC na jiných typech organismů.

C. elegans představovalo mnoho výhod jako modelový organismus pro vědu, v našem případě také jako zástupce půdních organismů. Naše práce přinesla očekávané výsledky a posunula tak výzkum interakce hpd-1 a nitisinonu o krok dále. Podle porovnání sekvencí genu hpd-1 u *C. elegans* a jiných organismů bylo předpovězeno fungování inhibice na molekulární úrovni. Provedené experimenty potvrdily inhibici pouze jednou, ale víme předpovědět, kde se v postupech vyskytly chyby a jejich případnou nápravu. Připouštíme také možnost výskytu několika proměnných, které mohou ovlivnit experimenty a přinést negativní výsledky i po námi doporučené úpravě. Mezi výsledky patří také zjištění nižšího přežívání *C. elegans* při vyšších koncentracích tyrosinu a také při samotném NTBC.

Další otázkou je účinek nitisinonu na *C. elegans* v jeho přirozeném prostředí - v půdě. Pokud by další laboratorní studie potvrdily inhibici více než jednou, bylo by stále otázkou, zda by obsah nitisinonu v půdě ve formě herbicidů, pesticidů nebo zbytků léčiv měl na *C. elegans* nějaký vliv. Důležitá by byla jeho koncentrace v půdě a podle výsledků našeho výzkumu i přístup tyrosinu v potravě *C. elegans*. Ideální by tedy bylo v dalších výzkumech zjistit hodnotu LD50 pro NTBC u *C. elegans*, podíl tyrosinu v potravě *C. elegans* a množství reziduí v půdě pro výše zmíněné použití NTBC. Dopad na další půdní organismy v rozsahu našeho výzkumu na *C. elegans* tedy zatím nelze potvrdit, i když je velmi pravděpodobný.

Studentům, učitelům, výzkumným pracovníkům a dalším zainteresovaným skupinám se tak otevírá mnoho otázek a možností dalšího výzkumu tohoto tématu.

8 Závěr

Nitisinon je látka syntetizovaná z leptospermonu, která se v minulosti používala jako herbicid a jejíž analogy jsou stále používány jako sulcotrion nebo mesotrion. V současné době se nitisinon používá pod obchodním názvem Orfadin® k léčbě vzácných genetických onemocnění - lidské tyrosinémie typu 1 a alkaptonurie (Lindstedt et al. 1992).

Fungování a úspěšnost nitisinonu je založena na inhibici enzymu HPPD u zvířat i rostlin. V počátcích jeho objevu bylo nutné provést toxikologické studie, zjišťující mechanismus jeho fungování a nežádoucí účinky. Studie u savců potvrdily problémy v podobě očních lézí spojených s tyrosinemií, kdy vznikla potřeba dalšího výzkumu a lepšího pochopení fungování nitisinonu (Lock et al. 1996).

Mnoho studií tak dospělo k závěrům, že by nitisinon mohl být potenciálním kandidátem na léčbu dalších onemocnění, jako je okulokutánní albinismus, Parkinsonova choroba, trypanosomóza, malárie nebo nemoci přenášené klíšťaty. Účinek nitisinonu byl prokázán také u škůdců plodin, much rodu *Drosophila* (Park et al. 2017).

Podle našich nejlepších znalostí však nitisinon dosud nebyl studován u organismů bez krevního oběhu nebo hematofágie. Pro naši práci jsme proto jako modelový organismus zvolili *C. elegans*, který je v praxi často používán.

Podle testu alignmentu sekvencí proteinu hpd-1 u *C. elegans* a dalších organismů, u kterých již byla inhibice potvrzena, jsme přišli na 61,3% shodu na základě shodnosti párů, což naznačuje fungování inhibice i u *C. elegans*. V dalších testech byla inhibice námi skutečně potvrzena, ale pouze jednou. V části diskuse jsme dále rozebírali možné příčiny a souvislosti neúspěšné inhibice v ostatních případech a také možné způsoby nápravy. Nejpravděpodobnějšími faktory mohou být chyby v laboratorních postupech nebo koncentrace L-tyrosinu a nitisinonu použité v pokusech. Výsledky zahrnují také zjištění nižšího přežívání *C. elegans* při vyšších koncentracích tyrosinu, stejně jako při samotném nitisinonu.

Účinek nitisinonu na *C. elegans* je tedy v této fázi prokazatelný. Dokážeme také předpokládat negativní vliv nitisinonu na další půdní organismy, které měl *C. elegans* zastupovat jako modelový organismus v případě reziduí nitisinonu v půdě ve formě léčiv nebo herbicidů, insekticidů. Pro rozšíření těchto poznatků by bylo ideální v dalším výzkumu stanovit hodnotu LD50 pro NTBC u *C. elegans*, podíl tyrosinu v potravě *C. elegans* a hodnoty reziduí v půdě pro výše uvedená použití NTBC.

Výsledky našeho výzkumu a shrnutí širokého spektra využití nitisinonu mohou sloužit jako základ pro další výzkum v této oblasti a přinést důležité informace o mechanismu účinku nitisinonu pro vědu, lidskou a veterinární medicínu nebo efektivnější výrobu herbicidů a pesticidů.

9 Literatura

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**:403-410.
- Beaudegnies R, Edmunds AJF, Fraser TEM, Hall RG, Hawkes TR, Mitchell G, Schaezter 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.
- Boulin T, Etchberger JF, Hobert O. 2006. WormBook: The Online Review of *C. elegans* Biology- Reporter gene fusions. Available from www.wormbook.org (accessed February 2023).
- C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* **282**:2012–2018.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. 1994. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science* **263**:802–805.
- Culetto E, Sattelle DB. 2000. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Human Molecular Genetics* **9**:869–877.
- Das A. 2017. Clinical utility of nitisinone for the treatment of hereditary tyrosinemia type-1 (HT-1). *The Application of Clinical Genetics* **10**:43–48.
- Ellis MK, Whitfield AC, Gowans LA, Auton TR, Provan WM, Lock EA, Smith LL. 1995. Inhibition of 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase by 2-(2-Nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione and 2-(2-Chloro-4-methanesulfonylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione. *Toxicology and Applied Pharmacology* **133**:12–19.
- Feinberg EH, VanHoven MK, Bendesky A, Wang G, Fetter RD, Shen K, Bargmann CI. 2008. GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) Defines Cell Contacts and Synapses in Living Nervous Systems. *Neuron* **57**:353–363.
- Green M, Sambrook J. 2020. Total RNA Extraction from *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harbor Protocols* **2020**:pdb.prot101683.
- Hendriks BS. 2010. Functional pathway pharmacology: Chemical tools, pathway knowledge and mechanistic model-based interpretation of experimental data. *Current Opinion in Chemical Biology* **14**:489–497.
- Jackson F, Hoste H. 2010. In Vitro Methods for the Primary Screening of Plant Products for Direct Activity against Ruminant Gastrointestinal Nematodes. Pages 25–45 in Vercoe PE, Makkar HPS, Schlink AC, editors. *In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies*. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Jarrell TA, Wang Y, Bloniarz AE, Brittin CA, Xu M, Thomson JN, Albertson DG, Hall DH, Emmons SW. 2012. The Connectome of a Decision-Making Neural Network. *Science* **337**:437–444.
- Kaletta T, Hengartner MO. 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature Reviews Drug Discovery* **5**:387–399.
- Kibbe WA. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acid Research* **35**:43-46.
- Kimble J, Hirsh D. 1979. The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **70**:396–417.
- Lee DL, Prisbylla MP, Cromartie TH, Dagarin DP, Howard SW, Provan WM, Ellis MK, Fraser T, Mutter LC. 1997. The discovery and structural requirements of inhibitors of p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Weed Science* **45**:601–609.

- Lindstedt S, Holme E, Lock EA, Hjalmarson O, Strandvik B. 1992. Treatment of hereditary tyrosinaemia type I by inhibition of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *The Lancet* **340**:813–817.
- Lints R, Hall DH. 2009. WormAtlas- Reproductive system, egg-laying apparatus. Available from <https://www.wormatlas.org/hermaphrodite/egg-laying%20apparatus/Eggframeset.html> (accessed February 2023).
- Lock EA. 2017. From Weed Killer to Wonder Drug. Pages 175–185 in Tanguay RM, editor. *Hereditary Tyrosinemia: Pathogenesis, Screening and Management*. Springer International Publishing, Cham.
- Lock EA, Gaskin P, Ellis M, Provan WM, Smith LL. 2006. Tyrosinemia produced by 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione (NTBC) in experimental animals and its relationship to corneal injury. *Toxicology and Applied Pharmacology* **215**:9–16.
- Lock EA, Gaskin P, Ellis MK, McLean Provan W, Robinson M, Smith LL. 2000. Tissue distribution of 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-cyclohexane-1,3-dione (NTBC) and its effect on enzymes involved in tyrosine catabolism in the mouse. *Toxicology* **144**:179–187.
- Lock EA, Gaskin P, Ellis MK, Provan WM, Robinson M, Smith LL, Prisbylla MP, Mutter LC. 1996. Tissue Distribution of 2-(2-Nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)cyclohexane-1,3-dione (NTBC): Effect on Enzymes Involved in Tyrosine Catabolism and Relevance to Ocular Toxicity in the Rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* **141**:439–447.
- Lock EA, Smith LL. 2003. The role of mode of action studies in extrapolating to human risks in toxicology. *Toxicology Letters* **140–141**:317–322.
- Mayorandan S et al. 2014. Cross-sectional study of 168 patients with hepatorenal tyrosinaemia and implications for clinical practice. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **9**:107.
- 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.
- O'Brien WM, La Du BN, Bunim JJ. 1963. Biochemical, pathologic and clinical aspects of alcaptonuria, ochronosis and ochronotic arthropathy: Review of world literature (1584–1962). *The American Journal of Medicine* **34**:813–838.
- Onojafe IF et al. 2011. Nitisinone improves eye and skin pigmentation defects in a mouse model of oculocutaneous albinism. *The Journal of Clinical Investigation* **121**:3914–3923.
- Panska L et al. 2023. Uncovering the essential roles of human GCP 2 orthologs in *Caenorhabditis elegans*. Available from <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.02.27.529682v1.full> (accessed April 2023).
- 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.
- Parkhitko AA et al. 2020. Downregulation of the tyrosine degradation pathway extends *Drosophila* lifespan. *eLife* **9**:e58053 DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.58053>.
- Prisbylla MP, Onisko BC, Shribbs JM, Adams DO, Liu Y, Ellis MK, Hawkes TR, Mutter L C. 1993. The novel mechanism of action of the herbicidal triketones. *Brighton Crop Protection Conference-Weeds* **2**: 731-738.
- Raley-Susman KM, Chou E, Lemoine H. 2017. Use of the Model Organism *Caenorhabditis elegans* to Elucidate Neurotoxic and Behavioral Effects of Commercial Fungicides. Pages 37-49 in McDuffie JE, editor. *Neurotoxins*. IntechOpen, Rijeka.

- Sander J, Janzen N, Peter M, Sander S, Steuerwald U, Holtkamp U, Schwahn B, Mayatepek E, Trefz FK, Das AM. 2006. Newborn Screening for Hepatorenal Tyrosinemia: Tandem Mass Spectrometric Quantification of Succinylacetone. *Clinical Chemistry* **52**:482–487.
- Schafer WR. 2005. WormBook: the online review of *C. elegans* biology- Egg laying. Available from <http://www.wormbook.org> (accessed February 2023).
- Shaye DD, Greenwald I. 2011. OrthoList: A compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS One* **6** (e20085) DOI: 10.1371/journal.pone.0020085.
- Sohrabi S, Mor DE, Kaletsky R, Keyes W, Murphy CT. 2020. High-throughput behavioral screen in *C. elegans* reveals novel Parkinson's disease drug candidates. Available from <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.02.20.958751v1> (accessed March 2023).
- Sterkel M et al. 2021. Repurposing the orphan drug nitisinone to control the transmission of African trypanosomiasis. *PLOS Biology* **19** (e3000796) DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000796>.
- Sulston JE, Horvitz HR. 1977. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **56**:110–156.
- Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. 1983. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* **100**:64–119.
- Thimm E, Richter-Werkle R, Kamp G, Molke B, Herebian D, Klee D, Mayatepek E, Spiekerkoetter U. 2012. Neurocognitive outcome in patients with hypertyrosinemia type I after long-term treatment with NTBC. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **35**:263–268.
- Toxicology Letters. 2019. Abstracts of the 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019) TOXICOLOGY SCIENCE PROVIDING SOLUTIONS. *Toxicology Letters* **314**:S1–S309.
- Ugur B, Chen K, Bellen HJ. 2016. Drosophila tools and assays for the study of human diseases. *Disease Models & Mechanisms* **9**:235–244.
- Vergaray Ramirez MA, Sterkel M, Martins AJ, BP Lima J, L Oliveira P. 2022. On the use of inhibitors of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase as a vector-selective insecticide in the control of mosquitoes. *Pest Management Science* **78**:692–702.
- Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acid Research* **31**:3688–3691.
- White JG, Southgate E, Thomson JN, Brenner S. 1986. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **314**:1–340.
- Wiltgen M. 2018. Algorithms for structure comparison and analysis: Homology modelling of proteins. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics* **1–3**:38–61.