

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Touha po cukru; fyziologické procesy klíštěte *Ixodes ricinus* v závislosti
na hostitelské glukóze**

Magisterská práce

Bc. Barbora Plačková

Školitel: Jan Perner Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Matěj Kučera

České Budějovice 2020

Plačková B., 2020: Touha po cukru; fyziologické procesy klíštěte *Ixodes ricinus* v závislosti na hostitelské glukóze. Sugar cravings in ticks; insight into the tick physiological processes dependent on host glucose. Mgr. Thesis, in Czech] - 45 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: Blood-feeding arthropods, *Ixodes ricinus* acquire and digest vast amounts of the host blood meal, which often exceeds their body volume up to 100 times. It seems to be an only source of energy which they need for the reproduction. I identified homologues of six sugar transporters genes encoding sugar transporters in the *I. ricinus* tick. Transcripts encoding sugar transporters were found in digestive tract of *I. ricinus*. The results of RT-PCR analysis characterised tissue expression profiles of the sugar transporters while fed by blood. The sugar transporters were determined as a drug target by RNAi. In this master thesis, the use of RNAi and available sugar inhibitors did not confirm glucose importance in physiology of ticks. Membrane feeding showed that blood meal with 2-deoxy-D-glucose had a significant impact on the reproduction and viability of the ticks.

Prohlašuji, že svoji magisterskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské práce, a to v nezkrácené podobě ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v českých Budějovicích a na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. Zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Barbora Plačková

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla poděkovat panu Petru Kopáčkovi, který mi umožnil vypracovat svoji magisterskou práci v jeho laboratoři a zároveň tak získat cennou praxi v oboru. Dále bych chtěla poděkovat svému školiteli Honzovi Pernerovi, který mě neustále držel ve střehu. A také svému druhému školiteli Matěji Kučerovi za pomoc se sepsáním výsledků. Děkuji svým rodičům za finanční podporu při studiu a i mé sestře, která mi věřila a držela ve mně vědeckého ducha. Těm všem upřímně děkuji.

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod | 1 |
| 2. Literární přehled | 2 |
| 2.1. Složení lidské krve | 2 |
| 2.2. Transport látek přes buněčnou membránu | 3 |
| 2.2.1. Transport D-glukózy do buňky | 3 |
| 2.2.2. Glukózové přenašeče GLUT u člověka | 4 |
| 2.3. Vnitrobuněčné zpracování D-glukózy | 6 |
| 2.3.1. Hlavní degradační dráha D-glukózy | 6 |
| 2.3.2. Poruchy metabolismu D-glukózy | 7 |
| 2.4. Role D-glukózy u bezobratlých živočichů | 9 |
| 2.4.1. Význam D-glukózy u hematofágních členovců | 10 |
| 2.4.2. Příjem a využití D-glukózy u klíštěte | 10 |
| 2.4.3. Vliv 2-deoxy-D-glukózy na fyziologické procesy klíštěte <i>I. ricinus</i> | 11 |
| 3. Cíle práce | 12 |
| 4. Materiály a metody | 13 |
| 4.1. Bioinformatická analýza | 13 |
| 4.2. Klíšťata a získání tkání | 13 |
| 4.3. Izolace RNA a syntéza cDNA | 13 |
| 4.4. RT-qPCR reakce | 14 |
| 4.5. Příprava dvouvláknové RNA | 14 |
| 4.5.1. PCR reakce, elektroforéza a izolace z gelu | 14 |
| 4.5.2. Klonování, transformace a získávání plazmidové DNA | 16 |
| 4.5.3. Syntéza dvouvláknové RNA | 18 |
| 4.6. RNA interference | 19 |
| 4.7. Membránové sání | 19 |
| 4.7.1. Postup přípravy krmítka | 19 |
| 4.7.2. Příprava krve | 20 |
| 4.7.3. Membránové sání s dostupnými inhibitory | 20 |
| 4.7.4. Membránové sání s využitím 2-deoxy-D-glukózy | 22 |

| | |
|--|----|
| 5. Výsledky | 23 |
| 5.1. Identifikace membránových glukózových přenašečů u klíštěte <i>I. ricinus</i> | 23 |
| 5.2. Zjištění tkáňové exprese glukózových přenašečů | 25 |
| 5.3. Výsledky tkáňových transkripčních profilů pro glukózové přenašeče | 27 |
| 5.4. Příprava dsRNA pro RNAi analýzu | 27 |
| 5.4.1. Výsledky PCR reakce a sekvenace | 27 |
| 5.4.2. Výsledky syntézy dvouvláknové RNA | 28 |
| 5.5. RNAi glukózových přenašečů a její ověření během a po dosátí dospělých samic klíšťat <i>I. ricinus</i> | 29 |
| 5.6. Snížení glukózových přenašečů neovlivňuje fenotyp samic klíšťat <i>I. ricinus</i> po dokončení sání | 33 |
| 5.7. Výsledky membránového sání s dostupnými inhibitory | 35 |
| 5.8. Výsledky membránového sání s 2-deoxy-D-glukózou | 37 |
| 6. Diskuze | 39 |
| 7. Závěr | 41 |
| 8. Seznam použité literatury | 42 |

1. Úvod

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*), se řadí mezi nejnebezpečnější krevsající členovce v Evropě a přenáší nejzávažnější nemoci. Na hostiteli saje krev několik dní (Volf & Horák, 2007). Největším orgánem u klíšťat je střevo a slouží zejména jako zásobárna krve. Dochází zde ke skladování krve (Sonenshine, 1991). Samotné trávení, především trávení proteinové složky krve (hemoglobin a albumin), je soustředěno do střevních buněk klíštěte (Sojka et al., 2013).

Trávení je vysoce energeticky náročný proces. Úloha metabolismu cukrů proto hraje velmi významnou roli pro získání energie v podobě adenosintrifosfátu (ATP), která je zároveň důležitá pro všechny ostatní metabolické děje v organismu (Thorens & Mueckler, 2010).

Glukóza, základní esenciální sacharid, je přijímána v potravě a je nezbytná zejména pro syntézu energie, která je dále uplatněna ve fyziologii a vývoji téměř všech živých organismů (Moraes et al., 2007). Jakým způsobem je glukóza vstřebávána v trávicím traktu klíšťat, však není jasné.

U zástupce krevsajících členovců, klíštěte *I. ricinus*, byly ve střevě identifikovány transkripty kódující šest glukózových přenašečů (GLUT1-6). Cílem této práce bylo provést bioinformatickou a laboratorní analýzu exprese těchto šesti glukózových přenašečů v klíštěcích tkáních pomocí real-time PCR (RT-PCR). Jejich funkce a nezbytnost pro klíštěcí sání a reprodukci byla zkoumána pomocí metody RNAi. Pro ověření úspěšnosti RNAi metody byla provedena zároveň i chemická inhibice. S využitím metody membránového sání byly samičky klíštěte nechány sát na krvi obohacené o komerčně dostupné glukózové inhibitory (quercetin, phloretin a phloridzin dihydrát).

Dále pomocí membránového sání se podařilo vyhodnotit vliv 2-deoxy-D-glukózy, nemetabolizovaný glukózový analog, ve fyziologii samičky klíštěte během příjmu potravy.

2. Literární přehled

2.1. Složení lidské krve

Lidská krevní plazma je z 93% tvořena převážně vodou. Látky, rozpuštěné v krevní plazmě, jsou rozděleny na anorganické (1%) a organické látky (6%) (Kittnar, 2011). Z anorganických látek jsou to menší míře převážně kationty ($-\text{Na}^+$, $-\text{K}^+$, $-\text{Ca}^{2+}$) a anionty ($-\text{Cl}^-$, $-\text{I}^-$). Organickou složku tvoří zejména proteiny (albuminy, globuliny, fibrinogeny), cukry (glukóza), koagulační faktory, hormony, odpadní látky a další (Varchanisa et al., 2018).

Nejrychlejším katabolickým procesem, který vede k získání energie, je zpracování cukrů. Základní monosacharid pro tento proces je glukóza. Hladina glukózy v lidské krvi je udržována v rozmezí 4-6 mmol/l v souvislosti s množstvím přijaté potravy (Alam et al., 2014).

| | |
|--------------------------------|------------------------------------|
| Proteins | Total 6–9 g/dL |
| Albumin | 60% of total protein, 3.2–5.5 g/dL |
| Globulins | 36% of total protein, 2.3–3.5 g/dL |
| Fibrinogen | 4% of total protein, 0.2–0.3 g/dL |
| Nutrients | |
| Glucose (dextrose) | 70–110 mg/dL |
| Amino acids | 33–51 mg/dL |
| Lactate | 6–16 mg/dL |
| Total lipid | 450–850 mg/dL |
| Cholesterol | 120–220 mg/dL |
| Fatty acids | 190–420 mg/dL |
| High-density lipoprotein (HDL) | 30–80 mg/dL |
| Low-density lipoprotein (LDL) | 62–185 mg/dL |
| Triglycerides (neutral fats) | 40–150 mg/dL |
| Phospholipids | 6–12 mg/dL |
| Iron | 50–150 $\mu\text{g/dL}$ |

Obr. 1: Zastoupení jednotlivých organických látek v krevní plazmě (Saladin, 2013).

2.2. Transport látek přes buněčnou membránu

Během dostatečně dlouhé doby přes cytoplazmatickou membránu difunduje většina molekul; doba závisí na velikosti molekuly a na její schopnosti se rozpouštět. Platí tedy, malé nepolární molekuly (O_2 , CO_2) se ochotně rozpouštějí v lipidových vrstvách a proto rychle difundují (Murray et al., 2001).

Z biologického hlediska je dále důležitý příjem jak anorganických (K^+ , Na^+), tak organických látek (cukry, aminokyseliny, lipidy) skrz buněčnou membránu. Tento příjem je zprostředkován pomocí membránových transportních proteinů. Tyto proteiny hrají zásadní roli v základním spektru buněčných funkcí (absorbce živin, uvolňování metabolitů, tvorba a přenos signálů a další) (Yan, 2017). Odhaduje se, že přibližně 20-30% kódujících genů v lidském genomu kóduje právě membránové proteiny (MPs) (Tsirigos et al., 2015).

Zároveň značný počet nemocí souvisí s poruchou funkce těchto transportních proteinů (srdeční a neurologické poruchy, neurodegenerativní choroby) (Hediger et al., 2013).

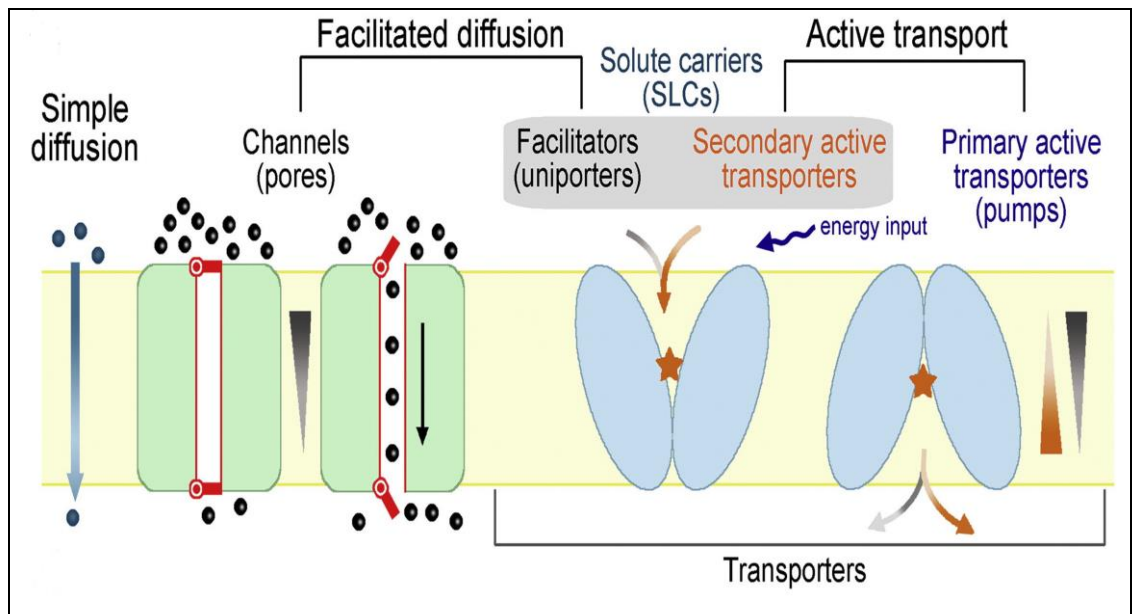
2.2.1. Transport D-glukózy do buňky

Buněčný příjem glukózy je nezbytným fyziologickým procesem a tento děj je uskutečněn pomocí specializovaných bílkovinných přenašečů, které se nacházejí v buněčné membráně (Yan, 2017).

Glukóza může být transportována přes membránu dvěma mechanismy (Obr. 2)-usnadněnou difúzí pomocí specializovaných proteinů, nazývaných glukózové (GLUT) přenašeče (Glucose transporters), které jsou kódované geny SLC2A nebo sekundárně aktivním transportem prostřednictvím sodíko-glukózových (SGLT) transportérů (Sodium-Glucose Linked transporters) (Lacombe, 2014).

V buněčných membránách se vyskytuje celá řada glukózových přenašečů fungujících na principu usnadněné difúze. Jedná se o pasivní proces, při kterém molekuly glukózy přecházejí přes membránu po svém elektrochemickém gradientu pomocí speciálních přenašečů umístěných v membráně, které nejsou závislé na Na^+ (Thorens & Mueckler, 2010).

Transportéry SGLT umožňují vstup glukóze skrz buněčnou membránu proti směru koncentračního gradientu za spotřeby energie (Shi, 2013). Takto je glukóza aktivně transportována z moče spolu se sodnými ionty (jedná se o symport) (Mulukutla et al., 2016).



Obr. 2: Transport glukózy do buňky (Yan, 2017).

2.2.2. Glukózové přenašeče GLUT u člověka

Předpokladem pro to, aby glukóza mohla plnit své biologické vlastnosti, musí nejprve vstoupit do buňky. Hexóza s velmi vysokou rozpustností ve vodě musí tedy nejprve projít skrz hydrofobní lipidovou dvojvrstvu pomocí transportních membránových proteinů (Kubišta, 1998).

U člověka je glukóza primárním zdrojem energie, která je potřebná zejména pro zásobování mozku, který spotřebuje přibližně 20% denní dávky glukózy (tj. přibližně 120 g glukózy na den) (Mergenthaler et al., 2013) (Benarroch, 2014).

V lidském těle je exprimováno celkem 14 GLUT transportních proteinů (Tab. I), které transportují i jiné substráty než pouze glukózu (např.: fruktózu, galaktózu aj.) (Thorens & Mueckler, 2010). Glukózový přenašeč GLUT14 se jeví jako výsledek genové duplikace GLUT3 (Wu & Freeze, 2002).

Všechny glukózové přenašeče jsou exprimovány v odlišných tkáních, vykazují odlišné transportní kapacity a mají specifické vlastnosti (Yan, 2017).

Porucha ve funkci glukózového přenašeče je obvykle spojena se specifickým onemocněním (Mueckler & Thorens, 2013).

Syndrom Fanconiho-Bickela je způsoben mutací v genu pro GLUT2 v játrech a slinivce břišní. Většina pacientů je v této mutaci homozygotně recesivní. Pacienti vykazují malabsorbční syndrom, trpí nefropatií a mají časté problémy s játry. K léčbě přispívá dostatečná hydratace organismu, udržení elektrolytické korekce, alkalizace plazmy, omezení galaktózy a dodržování diabetické stravy. Fruktóza a nevařený

kukuřičný škrob poskytují bezpečně potřebné sacharidy pro většinu metabolických dějů (Pascual et al., 2004) .

Poškozená funkce GLUT může přispívat i k patobiologii neurodegenerativních onemocnění (Alzheimerova choroba) (Midleton, 2000). Snížení metabolismu glukózy v mozku vede ke snížení exprese GLUT1 a GLUT3 v mozkové tkáni, což má za následek její špatné zásobení živinami (Benarroch, 2014).

Tab. I: Klasifikace glukózových přenašečů v lidském těle. (Yan, 2017)

| Klasifikace | Glukózový přenašeč (GLUT) | Specifická tkáň výskytu exprese |
|-------------|---------------------------|---------------------------------|
| 1. třída | GLUT1 | erytrocyty, mozek |
| | GLUT2 | játra, ledviny |
| | GLUT3 | mozek, varlata |
| | GLUT4 | kosterní svaly, srdce |
| | GLUT14 | mozek, varlata |
| 2. třída | GLUT5 | tenké střevo, ledviny |
| | GLUT7 | varlata, prostata |
| | GLUT9 | leukocyty, plíce, placenta |
| | GLUT11 | Srdce |
| 3. třída | GLUT6 | mozek, slezina |
| | GLUT8 | nadledviny, hnědá tuková tkáň |
| | GLUT10 | plíce, játra, kosterní svaly |
| | GLUT12 | kosterní svaly, placenta |
| | GLUT13 | mozek, tuková tkáň |

2.3. Vnitrobuněčné zpracování D-glukózy

2.3.1. Hlavní degradační dráha D-glukózy

Glukóza je metabolizována v procesu zvaný glykolýza, jejíž konečným produktem je pyruvát (sůl kyseliny pyrohroznové). Tento děj může probíhat jak za přítomnosti tak i nepřítomnosti kyslíku a stále dochází k produkci energie v podobě ATP (adenosintrifosfát). To je důvod, proč kosterní svalstvo je schopné vykazovat vysokou výkonnost, i když se aerobní oxidace stává nedostatečnou (Masopust & Průša, 2004).

Za anaerobních podmínek (za nepřístupu O_2) je konečným produktem laktát. Jeho tvorba a hromadění mají za následek okyselení organismu, které vede ke značné bolesti svalů. Za aerobních podmínek (s dostatkem O_2) může být pyruvát dekarboxylován na acetyl-CoA (Klouda, 2013).

Odbourávání glukózy probíhá v cytoplazmě buňky a využívají ji jak živočichové, rostliny tak i mikroorganismy (Murray, 2001).

Glykolýza je jedním z nejrychlejších katabolických dějů pro syntézu ATP. Tato hlavní degradační dráha se skládá z deseti dílčích reakcí, z nichž každá z nich je katalyzována specifickým enzymem (Tab. I). Tyto glykolytické enzymy jsou uloženy v extramitochondriálním cytosolu buňky (Voet & Pratt, 2006).

Obecná rovnice aerobní glykolýzy:



Má-li však dojít k degradaci glukózy, musí být nejprve molekula glukózy aktivována fosforylací na glukózu-6-fosfát za spotřeby energie v podobě 1 molekuly ATP. Tato přeměna je katalyzována enzymem hexokinázou (Masopust & Průša, 2004).

Většina dílčích reakcí během glykolýzy může probíhat v obou směrech. Pouze tři reakce jsou katalyzovány specifickými glykolytickými enzymy (hexokináza, fosfofruktóza a pyruvátkináza). Tyto reakce jsou irreverzibilní, tvoří termodynamickou bariéru (Klip et al., 1994). Během těchto reakcí dochází k uvolnění velkého množství energie v podobě tepla a reakce jsou za standardních fyziologických podmínek nevratné. Regulace je velmi důležitá, protože bez kontrolních mechanismů by mohlo dojít k vyčerpání vstupních reaktantů a další dílčí reakce by už pak neproběhla (Murry et al., 2001).

Konečný výtěžek z jedné molekuly glukózy je 38 molekul ATP (Klouda, 2013).

Glukóza je zapojena i v jiných metabolických drahách. Během glykogeneze je glukóza skladována ve formě zásobního polysacharidu, glykogenu (u člověka játra, svaly, ledviny) (Ledvina et al., 2009). Některé tkáně (játra, tuková tkáň) dovedou přeměnit glukózu na mastné kyseliny (lipogeneze), které jsou skladovány v tukové tkáni jako zásobní triacylglyceroly (Masopust & Průša, 2004). Dále je zdrojem ribosa-5-fosfátu (pentosový cyklus), který tvoří cukernou složku nukleových kyselin (Klouda, 2013).

2.3.2. Poruchy metabolismu D-glukózy

Poruchy degradace glukózy vyvolávají u lidí řadu závažných onemocnění. Normální hladina cukru v krvi je zhruba 4,5 g/5l krve dospělého člověka tj. 2 kostky cukru (Vrtišková Nejezchlebová, 2017). Snížení hladiny glukózy se označuje jako hypoglykémie, naopak zvýšení hladiny glukózy v krvi se označuje jako hyperglykémie.

Hypoglykémie vzniká při nadměrné tělesné námaze nebo při omezení přívodu sacharidů. Při poklesu glukózy (hypoglykémie) v krvi pod 1,5 mmol/l mozek už není dostatečně energeticky zásobený, koncentrace ATP v mozku klesá a funkce mozkové tkáně je narušena. Trvalý pokles může vyvolat až kóma (Masopust & Průša, 2004).

Diabetes mellitus (DM) neboli cukrovka patří k nejčastějším chronickým onemocněním a její prevalence se po celém světě dramaticky zvyšuje (Raffel & Goodarzi, 2014). Při cukrovce není tělo schopno katabolismu sacharidů, což vede ke zvýšené koncentraci glukózy v krvi. Toto onemocnění je charakterizované zejména hyperglykemií v důsledku absolutního nebo relativního deficitu v produkci nebo působení inzulínu. Mezi prvotní příznaky patří únava, žízeň, časté močení, ztráta váhy i přes zvýšenou spotřebu jídla (Alam et al., 2014). Diabetické osoby jsou také vystaveny riziku mozkové mrtvice, přímému poškození centrálního nervového systému a komplikacím spojeným se selháním ledvin. Závažnější zdravotní problémy jsou spojeny zejména s nervovým systémem, primárně se jedná o polyneuropatii, která postihuje až 50 % diabetiků. Diabetická polyneuropatie se zaměřuje zejména na poškození periferních sensorických neuronů, které vede ke smyslovým ztrátám, bolesti až necitlivosti končetin (Zochodne, 2014).

Nicméně DM lze obecně rozdělit na dva základní typy. Diabetes typu 1 (T1DM), který je autoimunitním onemocněním (Zacccone & Hall, 2012), při kterém slinivka břišní není schopna produkovat dostatečné množství inzulínu (Paredes-Juarez et al., 2017) v důsledku selektivní destrukce pankreatických beta buněk (Raffel & Goodarzi, 2014). Většinou se projeví už v dětství nebo raném dospívání (Alam et al., 2014). Tímto typem trpí asi 7 % českých diabetiků (Černohlávek, 2017).

Diabetes typu 2 (T2DM) je onemocnění způsobené výsledkem nerovnováhy mezi produkcí a sníženou citlivostí tkání vlastního těla k účinku inzulínu v metabolismu glukózy. V pankreasu dochází k nadbytku sekrece inzulínu, avšak tělo je proti tomuto stavu rezistent (Paredes-Juarez et al., 2017). Projevuje se v pozdějším věku někdy po 40. roce života a objevuje se především u pacientů s nedostatkem pohybu, nepravidelnou stravou a stresem. Více než 60 % diabetiků s druhým typem je obézních nebo trpí nadváhou (Černohlávek, 2017).

Pacienti s T1DM vyžadují doživotní závislost na exogenní injekční aplikaci inzulínu k udržení euglykémie (Paredes-Juarez et al., 2017). Inzulín je hormon bílkovinné povahy, který umožňuje glukóze obsažené v krvi vstup do buněk (Černohlávek, 2017). U velmi vážně nemocného pacienta by měl být udržován stav glukózy v krvi v rozmezí 140-180 mg/dL (tj. 7,8-10,0 mmol/l) pomocí intravenózní infúze inzulínu (Alam et al., 2014).

2.4. Role D-glukózy u bezobratlých živočichů

Zástupce hemipter, *Nilaparvata lugens*, nejobávanější škůdce rýže v Asii, přijímá glukózu pomocí přenašeče kódovaným genem *Nlst6*. Přenašeč glukózy je exprimovaný ve střevě a transportuje glukózu ze střevních buněk do hemolymfy. Vliv snížení exprese genů glukózových přenašečů na růst, vývoj a reprodukci není zatím přesně znám. Nicméně lze předpokládat, že příjem glukózy pomocí těchto přenašečů bude zásadně ovlivňovat fyziologii a vývoj hmyzu živícího se rostlinnými šťávami. Snížení exprese genu *Nlst6* mělo vliv na snížení tělesné hmotnosti jedince, počet uložených vajíček a výrazné snížení tuku v těle oproti kontrolní skupině. Také exprese vitellogenních proteinů byla značně nižší. Tyto výsledky ukazují vliv genu *Nlst6* na růst a reprodukci jedinců. Tento gen se může jevit jako potenciální kandidát k hubení hmyzích škůdců (Ge et al., 2015).

Mšice, *Acyrtosiphon pisum*, nese ve svém genomu geny kódující přenašeče cukru. Signifikantní exprese genů pro transport cukru byla pozorována zejména u genu *Ap_ST3*, který je výrazně exprimován ve střevní tkáni (Price et al., 2010). Pro mšice je transport cukru velice důležitý a proto pro ně představují hlavní zdroj uhlíku. Jejich zdroj potravy obsahuje vysoký podíl cukru. Snaha udržení osmotického tlaku v hemolymfě by měla za následek pozdější dehydrataci organismu a jeho smrt (Karley et al., 2005). Proto musejí existovat mechanismy, které by mšicím umožnily udržet osmotickou rovnováhu pomocí transportu cukru skrz střevní epitel (Rhodes et al., 1997). Předpokládá se, že tyto přenašeče budou mít společné vlastnosti i s jinými organismy, tudíž jejich exprese bude zásadní v jejich fyziologii.

Transportní systém glukózy u *Drosophila melanogaster* se jeví jako dost podobný glukózovým přenašečům v savčích buňkách z důvodu podobně probíhající chemické inhibice s využitím inhibitoru phloretinu (Wang & Wang, 1993).

2.4.1. Významnost D-glukózy u hematofágních členovců

Hematofágní členovci stejně jako všichni heterotrofní organismy získávají z potravy potřebné živiny, které jsou nezbytné pro metabolické děje vedoucí především k růstu (larvální stádia) nebo k reprodukci (dospělá stádia) (Badisco et al., 2013). K těmto všem fyziologickým dějům je zapotřebí dostatek energie. Většina živých organismů na Zemi dokáže metabolizovat glukózu a získávat z ní energii v podobě ATP (Nelson & Cox, 2017).

S cílem zachovat daný druh, tudíž předat dál genetický materiál, musí být krevsající členovec schopen produkovat životaschopné potomky. Potomci těchto živočichů, se vyvíjejí uvnitř vajíčka mimo tělo samičky. Proto je zásadní, aby vajíčko obsahovalo potřebné živiny (zdroj energie), hormony a další látky potřebné pro embryonální vývoj jedince (Badisco et al., 2013).

Dalším nezbytným orgánem, který slouží především pro uskladnění a uvolnění energetických rezerv je tukové těleso. Soustředí se kolem střev a reprodukčních orgánů (Sonenshine, 1991). Adipocyty tvoří důležitou část tukového tělesa, slouží jako úložiště pro sacharidy, lipidy a bílkoviny. Triacylglyceroly mají však vyšší kalorickou hodnotu než zásobní polysacharid glykogen, proto jsou lipidy hlavním zdrojem uložené energie. Tukové těleso dokáže glukózu přeměnit na mastné kyseliny v procesu zvaný lipogeneze (Badisco et al., 2013).

2.4.2. Příjem a využití D-glukózy u klíštěte

Krevsající členovec, klíště obecné, tráví velké množství živin z nasáté krve hostitele, která je velmi bohatá zejména na bílkoviny (Sojka et al., 2013). Během trávení dochází k velké produkci volných aminokyselin (Sterkel & Oliveira, 2017).

Samotné trávení je vysoce energeticky náročný proces. Úloha metabolismu cukrů proto hraje velmi významnou roli pro syntézu energie, která je zároveň důležitá pro všechny metabolické děje v organismu (Thorens & Mueckler, 2010).

Glukóza, základní esenciální sacharid, je přijímána v potravě a hraje zásadní roli ve fyziologii a vývoji u téměř všech živých organismů. (Moraes et al., 2007).

Klíšťata z čeledě klíšťatovití (Ixodidae) včetně rovněž hematofágního zástupce *Boophilus microplus*, přijímají velké množství krve, která má za následek mnohonásobné zvětšení jejich hmotnost těla, během sání krve (Sonenshine, 1991). Tato krev je jediným zdrojem energie, která je velice podstatná během vývoje klíštěte. Vzhledem k tomu, že tento členovec má intracelulární trávení, velké množství krve je zpracováno a získaná energie je uložena do hnědých vajíček (Moraes et al., 2007).

Protože potomci klíšťat se vyvíjejí zcela bez matky, značná část energie je uložena právě ve vajíčkách v podobě proteinu. Larvy klíštěte *B. microplus* se líhnou z vajíček, které obsahují asi 60% žloutkových proteinů (Logullo et al., 2002).

Metabolismus bílkovin závisí na podstatné aktivitě metabolismu sacharidů. Prekurzorem, pro správný průběh metabolismu sacharidů, je dostatek fosforylované glukózy (glukóza-6-fosfát) za účasti enzymu hexokinázy. Dostatek glukózy-6-fosfátu závisí primárně na množství přijaté glukózy z krve (Thompson & Dahlman, 1999).

Významnost role D-glukózy v hostitelské krvi ve fyziologii klíště *I. ricinus* není přesně známa. Zatímco katabolická dráha glukózy u savců je soustředěna především do jater a ledvin (Masopust & Průša, 2004), u modelového organismu, klíštěte obecného (*I. ricinus*), byly ve střevě detekovány potřebné glukózové přenašeče pro její příjem. Budeme se tedy soustředit zejména na metabolismus glukózy a její roli v souvislosti s fyziologickými procesy u zmíněného organismu, klíštěte obecného.

2.4.3. Vliv 2-deoxy-D-glukózy na fyziologické procesy klíštěte *I. ricinus*

2-deoxy-D-glukóza se liší od D-glukózy výměnou hydroxylové skupiny (-OH) na druhém uhlíku za vodíkový atom (Voet & Pratt, 2006). Tato změna má za následek, že se sloučenina nemůže účastnit glykolýzy a dochází tak ke snížení intracelulárního přenosu glukózy z důvodu, že způsobuje kompetitivní inhibici glukóza-6-fosfátu pomocí hexokinázy. V důsledku těchto účinků lze 2-deoxy-D-glukózu považovat za metabolický blok pro glukózu (Bissonnette et al., 1996).

3. Cíle práce

- 1) Shromáždit a sepsat současnou relevantní literaturu.
- 2) Provést bioinformatickou analýzu glukózových přenašečů ve střevních transkriptech klíštěte *I. ricinus*.
- 3) RT-qPCR analýza glukózových přenašečů v klíštěcích tkáních během sání.
- 4) Zkoumání funkce a nezbytnosti glukózových přenašečů pro klíštěcí sání a reprodukci pomocí RNA interference.
- 5) Provést membránové sání s použitím dostupných glukózových inhibitorů.
- 6) Vyhodnotit vliv D-glukózy a 2-deoxy-D-glukózy během příjmu potravy u membránového sání.

4. Materiály a metody

4.1. Bioinformatická analýza

Kompletní sekvenční genů pro glukózové přenašeče (GLUT 1-6) klíštěte *I. ricinus* byly nalezeny podle anotace v jeho střevním transkriptomu (BioProject 311553, Perner et al., 2016). Identifikované sekvenční glukózových přenašečů z klíštěte *I. ricinus* byly porovnávány v Bioeditu pomocí ClustelW programu.

4.2. Klíšťata a získání tkání

Samice klíšťat *I. ricinus* byly nechány sát na laboratorních morčatech. Na záda morčat byl připevněn pryžový klobouček, který byl posléze uzavřen síťovinou. Po uplynutí předem stanovených časových intervalů byly samice klíšťat odebrány a pod binokulárním stereomikroskopem Stemi DV4 (Zeiss) byly vypitvány jednotlivé tkáně (Tab. II). Tkáně byly důkladně promyty v roztoku PBS s vodou ošetřenou diethyl pyrokarbonátem (DEPC voda), přeneseny do RA1 pufru s beta-merkaptanoethanolem (143 mM, finální koncentrace) z kitu NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) a zhomogenizovány pomocí 29G insulinové stříkačky.

Tab. II: Časové intervaly sání a jednotlivé tkáně. 1D = 1 denní samice klíšťat, 3D = 3 denní samice klíšťat, FF = plně nasáté samice klíšťat, 3AFM = samice klíšťat 3 dny po ukončení sání, 6AFM = samice klíšťat 6 dní po ukončení sání, GUT = střevo, SG = slinné žlázy, OV = ovária, TT = intervaly sání samic klíšťat pro střevo, ovária a slinné žlázy, UF = nenasáté samice, 1D = 1 denní samice, 3D = 3 denní samice, 5D = 5 denní samice, FF = plně nasáté samice, 3AFM = 3 dny po ukončení sání, 6AFM = 6 dní po ukončení sání, 12AFM = 12 dní po ukončení sání.

| Časové intervaly | Klíštěcí tkáně |
|------------------|---------------------------------------|
| 1D | GUT, SG, OV |
| 3D | GUT, SG, OV |
| FF | GUT, SG, OV |
| 3AFM | GUT, SG, OV |
| 6AFM | GUT, SG, OV |
| TT | UF, 1D, 3D, 5D, FF, 3AFM, 6AFM, 12AFM |

4.3. Izolace RNA a syntéza cDNA

Z připravených vzorků (Tab. II) byla izolována totální RNA podle protokolu dodavatele (Macherey-Nagel). Posléze byla syntetizována cDNA z oligo-dT primerů pomocí kitu Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche), jejímž templátem bylo použito 200 ng vyizolované RNA.

4.4. RT-PCR reakce

Kvantitativní real-time PCR (RT-PCR) byla použita pro identifikaci relativního množství mRNA a analýzu exprese všech šesti membránových glukózových přenašečů (GLUT 1-6) v klíčících tkáních (Tab. II). Reakce byly provedeny jak biologických tak i v technických triplicátech. S použitím Master mix FastStart Universal Sybr Green Master (Roche) byly připraveny reakční směsi. Reakce probíhaly vždy v 50 cyklech v přístroji LightCycler 480 (Roche). Výsledné C_t hodnoty byly zaznamenány díky programu LightCycler 480 Software release 1.5.0 SP4 (Roche).

Získaná data byla vyhodnocena pomocí delta ct metody (Excel, GraphPad Prism6). Relativní hladina u všech glukózových přenašečů byla normalizována relativní hladinou referenčního (tzv. *housekeeping*) genu, *elongačního faktoru* (*ef*).

4.5. Příprava dvouvláknové RNA

Syntéza dvouvláknové RNA (dsRNA) byla provedena následovně:

Z příslušné tkáně samic *I. ricinus*, kde byla zjištěna největší exprese zkoumaného transkriptu (Tab. III). Z cDNA byl pomocí PCR amplifikován fragment genu pro jednotlivé glukózové přenašeče (Tab. III). Navržené primery (Tab. IV) obsahovaly restrikční místa pro restrikční enzymy ApaI a XbaI.

Tab. III: Seznam glukózových přenašečů a jejich velikost amplifikovaného fragmentu pro syntézu dsRNA. 5D GUT = střevo 5 denních samic, FF GUT = střevo plně nasátých samic.

| Glukózový přenašeč (GLUT) | Velikost (bp) | Tkáň s největší expresí |
|---------------------------|---------------|-------------------------|
| GLUT 1 | 292 bp | 5D GUT |
| GLUT 2 | 226 bp | FF GUT |
| GLUT 3 | 300 bp | FF GUT |
| GLUT 4 | 276 bp | FF GUT |
| GLUT 5 | 239 bp | FF GUT |
| GLUT 6 | 400 bp | FF GUT |

4.5.1. PCR reakce, elektroforéza a izolace z gelu

PCR reakce byla prováděna s Taq Purple polymerázou (Top-Bio), s navrženými primery (Tab. VI) a vhodným cDNA templátem v přístroji T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Reakce probíhaly v 50 cyklech. Získané PCR produkty byly separovány pomocí elektroforézy v agarózovém gelu (1% agaróza v 1x Tris-acetát-EDTA pufru (TAE), ethidium bromid 0,5 $\mu\text{g/ml}$) při konstantním napětí 100 V a viditelné produkty byly získány pod UV světlem.

Tab. IV: Seznam použitých primerů. Podtržená restrikční místa pro restrikční enzymy ApaI a XbaI.

| Primery pro qRT-PCR | |
|-----------------------|--|
| GLUT_1_forw_qPCR | 5'CGG ATA GCT GCC GTT TAC TT-3' |
| GLUT_1_rev_qPCR | 5'CCA CCA GCA TCT GGT AGG AC -3' |
| GLUT_2_forw_qPCR | 5'CAG AGC GTG ACC AGT TTC CT-3' |
| GLUT_2_rev_qPCR | 5'GGA TAC GGC AAG GAC GTA GA-3' |
| GLUT_3_forw_qPCR | 5'ACT ACA TTC AGG GCG TCA CC-3' |
| GLUT_3_rev_qPCR | 5'CCC GGC TCA TTA ATA CGT TTC-3' |
| GLUT_4_forw_qPCR | 5'ACC GGC CAA TCA GTA TCA TC-3' |
| GLUT_4_rev_qPCR | 5'GCA CAG AGA CGC CCG TAA-3' |
| GLUT_5_forw_qPCR | 5'AAC CGT TTT GGA AGG AAA GG-3' |
| GLUT_5_rev_qPCR | 5'GCT GAA ACC CAT CAT TGA GC-3' |
| GLUT_6_forw_qPCR | 5'TTT CTC TAC ACG TCC GTG GTC-3' |
| GLUT_6_rev_qPCR | 5'CGC CGG TGA ACA CAA TCT-3' |
| Primery pro RNAi | |
| GLUT_1_forw_RNAi | 5' <u>atg ggc cc</u> G TGG GAA GTT GTA CGA CAC G-3' |
| GLUT_1_rev_RNAi | 5' <u>att cta ga</u> G TGG GAA TCG TGG AGA GGA A-3' |
| GLUT_2_forw_RNAi | 5' <u>atg ggc cc</u> A CCA CCG TTG TCA TCA GTC T-3' |
| GLUT_2_rev_RNAi | 5' <u>att cta ga</u> C CCT GGT CGT CAT TGC AAT C -3' |
| GLUT_3_forw_RNAi | 5' <u>atg ggc cc</u> G CAT GTC CCG CTT TAT CTG G-3' |
| GLUT_3_rev_RNAi | 5' <u>att cta ga</u> C ATT GTC CGT GCC GTT GTA G-3' |
| GLUT_4_forw_RNAi | 5' <u>atg ggc cc</u> C CCC TGT CTT CGC TCT GTA T-3' |
| GLUT_4_rev_RNAi | 5' <u>att cta ga</u> C GAC TTC CCG TTC GTT TCT C-3' |
| GLUT_5_forw_RNAi | 5' <u>atg ggc cc</u> A GCA GCA GGA GTC ATT AGC A-3' |
| GLUT_5_rev_RNAi | 5' <u>att cta ga</u> C AGC CGC ACA GAG TAG TAG A-3' |
| GLUT_6_forw_RNAi | 5' <u>atg ggc cc</u> C TTG CCT ACC TGA TCCCCA A-3' |
| GLUT_6_rev_RNAi | 5' <u>att cta ga</u> C CTC TAT GAG CCC GGA CAA T-3' |
| Primery pro sekvenaci | |
| M13_forw | 5'GTAAAACGACGGCCAG-3' |
| M13_rev | 5'CAGGAAACAGCTATGAC-3' |
| Referenční gen | |
| EF_forw | 5'ACGAGGCTCTGACGGAAG -3' |
| EF_rev | 5'CACGACGCAACTCCTTCAC -3' |

4.5.2. Klonování, transformace a izolace plazmidové DNA

Produkt, získaný pomocí standartní PCR reakce, byl vyříznut z gelu a posléze vyčištěn pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) a eluován do 20 μ l PCR H₂O.

Přečištěný PCR produkt byl ligován do vektoru p110 (Obr. 3). Restrikce samotného plazmidu a získaného PCR produktu pro ligaci byla provedena následovně (Tab. V):

Tab. V: Restrikce plazmidu a PCR produktu.

| Restrikce plazmidu p110 (30 μ l) | |
|--------------------------------------|-------------|
| Buffer TA NGO 10x | 3 μ l |
| Enzym (ApaI, XbaI) | 1+1 μ l |
| DNA | 3 μ l |
| Sterilní H ₂ O | 22 μ l |
| Restrikce PCR produktu (30 μ l) | |
| Buffer TA-NGO 10x | 3 μ l |
| Enzym (ApaI, XbaI) | 1+1 μ l |
| DNA | 20 μ l |
| Sterilní H ₂ O | 5 μ l |

Obě restrikční reakce byly inkubovány ve 37 °C po dobu 2 hodin. Po přečištění restrikčních směsí pomocí kitu NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) byl PCR produkt zaligován do vektoru p110 (Tab. VI).

Tab. VI: Příprava ligační směsi 10 μ l.

| | |
|-----------------------|-----------|
| Buffer 2x | 5 μ l |
| Šťípnutý plazmid p110 | 2 μ l |
| DNA | 2 μ l |
| T4 ligáza | 1 μ l |

Ligační směs byla inkubována hodinu při laboratorní teplotě a následně přes noc ve 4 °C.

Metodou Heat Shock (teplotní šok, 42 °C) byl plazmid zatransformován do 50 µl kompetentních buněk One Shot TOP10 Chemically Competent *Escherichia coli* (Lifetechnologies). K buňkám bylo přidáno 200 µl S.O.C. média a byly inkubovány cca 45 minut ve 37 °C. Po uplynutí časového intervalu byly buňky rozetřeny na agarovou plotnu (1,5% agar v LB médiu, ampicilin 50 µg/ml) a inkubovány přes noc ve 37 °C.

Úspěšnost transformace byla ověřena pomocí PCR z jednotlivých kolonií (použity primery pro RNAi a sekvenaci) (Tab. IV). Jednotlivé kolonie bakterií byly resuspendovány v 10 µl PCR H₂O, přičemž vždy 1 µl byl použit jako templát do 10 µl PCR reakce o 50 cyklech. Pozitivní klony byly posléze přidány do 4ml LB/*amp* média (LB médium: 1% trypton, 0,5% kvasnicový extrakt, 0,5% NaCl, pH 7,0; ampicilin-*amp*: 50 µg/ml) a opět inkubovány přes noc (220 RPM, 37 °C). Plazmidová DNA byla získána pomocí kitu High Pure Plasmid Isolation kit (Roche) a eluována do 50 µl PCR H₂O a poté sekvenována.

Osekvenovaný pozitivní klon byl kultivován ve 100ml LB/*amp* média (LB médium: 1% trypton, 0,5% kvasnicový extrakt, 0,5% NaCl, pH 7,0; ampicilin-*amp*: 50 µg/ml). Plazmid byl izolován pomocí kitu Nucleo Bond Xtra Midi (Macherey-Nagel).

Plazmid, byl linearizován ve dvou oddělených 50 µl restrikčních reakcích (Tab. VII). Obě restrikční reakce byly inkubovány ve 37°C po dobu 2 hodin.

Tab. VII: Reakční směs pro lineární plazmid.

| | |
|---------------------------|----------|
| 10 µg plazmidu | x µl |
| Buffer TA NGO | 5 µl |
| Enzym ApaI | 6 µl |
| Enzym XbaI | 6 µl |
| Sterilní H ₂ O | do 50 µl |

Získaný lineární plazmid byl přečištěn následujícím postupem: K plazmidu bylo přidáno 25 µl proteinázy K (zásobní roztok: 20 µg proteinázy K v 150 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 a 2 mM CaCl₂) a 3,75 µl 10% SDS. Směs byla inkubována v 50 °C po dobu 30 minut. Po přidání 80 µl fenol-chloroformu (Sigma) byla směs pečlivě promíchána pomocí vortexu a centrifugována 5 minut při maximálních otáčkách. K vodní fázi bylo přidáno 80 µl chloroformu (Lach-Ner) a

opět byla směs promíchána a centrifugována při maximálních otáčkách po dobu 5 minut. K odebrané vodní fázi bylo přidáno 56 μl isopropanolu (Lach-Ner) a směs byla inkubována 30 minut v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a posléze centrifugována opět 30 minut (max. otáčky při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). K samotnému peletu bylo přidáno 80 μl 80% ethanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) a směs byla centrifugována po 8 minut při maximálních otáčkách. Viditelný pelet byl vysušen a následně rozpuštěn v 10-20 μl DEPC vodě.

4.5.3. Syntéza dvouvláknové RNA

Přečištěný linearizovaný plazmid sloužil jako templát pro syntézu jednovláknové RNA (ssRNA) (Tab. VIII) pomocí sady MEGAscript T7 High Yield Transcription kit (Ambion).

Tab. VIII: Reakční směs pro syntézu ssRNA.

| | |
|---|--|
| dNTPs | 8 μl (každý po 2) |
| Buffer ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) | 2 μl |
| Lineární plazmid | x μl (1 μg , max = 8 μl) |
| Enzyme mix | 2 μl |
| Sterilní H_2O | do 20 μl |

Reakční směs byla inkubována přes noc ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Získaná jednovláknová RNA byla přečištěna následujícím postupem:

K ssRNA byl přidán 1 μl Turbo DNázy a směs byla inkubována 15 minut ve $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po přidání 115 μl H_2O a 15 μl octanu amonného byla směs zamíchána. Ke směsi bylo přidáno 150 μl fenol-chloroformu (Sigma Life Science) a důkladně vše promícháno na vortexu. Po centrifugaci (5 minut, maximální otáčky) byla odebrána vodní fáze, ke které bylo následně přidáno 150 μl chloroformu (Lach-Ner) a směs byla opět pečlivě promíchána a centrifugována po dobu 5 minut při maximálních otáčkách. K odebrané vodní fázi bylo přidáno 110 μl isopropanolu (Lach-Ner) a směs byla inkubována 30 minut v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně centrifugována 30 minut (max. otáčky při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Vysušený pelet byl rozpuštěn ve 20 μl DEPC vodě.

V odměrném válci s vroucí vodou došlo přes noc k hybridizaci komplementárních vláken RNA (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) v poměru 1:1. Pomocí elektroforézy v 1% agarózovém TAE gelu s použitím nanášejícího pufru Ambion loading dye (Ambion) byla ověřena úspěšnost syntézy. Kvůli zamezení degradace RNA RNázami se pracovalo vždy šetrně v RNA boxu.

4.6. RNA interference

Pomocí mikromanipulátoru (Narishige) bylo injikováno 60 nenasátých samic klíštěte *I. ricinus*. Každá samice byla injikována do haemocoelu přibližně 0,5 μ l (3 μ g/ μ l) dsRNA pro GLUT1-6. Pro kontrolu bylo injikováno stejným množstvím dsRNA pro *gfp* (green fluorescent protein) 30 nenasátých samic *I. ricinus*. Tato dsRNA byla předpřipravená. Po 24 hodinách byly samice společně se samci za účelem plného nasátí (možné jen u oplozených samic) aplikovány na morčata (30 samic na 1 morče).

Během dvou nezávislých experimentů byly samice nechány sát na morčeti a po odpadnutí byly zváženy a uloženy k přeživacímu pokusu. V každém předem stanoveném časovém intervalu (3D, 5D, FF, 3AFM, 6AFM) byla provedena extrakce RNA ze střev, ovárií a slinných žláz u třech náhodně vybraných samic *I. ricinus*.

V průběhu pokusu bylo hlavním cílem pozorování fenotypových projevů u KD (knock-down, utlumení) klíšťat a kontrolních (*gfp*) klíšťat. Zaznamenán byl počet nasátých samic, tělesná hmotnost samic, schopnost vyklást snůšku, hmotnost samotné snůšky a schopnost líhnutí.

4.7. Membránové sání (*In vitro*)

Klíšťata byly sebrány metodou vlajkování z místních lesů tj. z lesů poblíž Českých Budějovic. Na parazitologickém ústavu AV ČR byla takto posbíraná klíšťata uchována při teplotě 17°C a vlhkosti 95 % pro pozdější experiment.

4.7.1. Postup přípravy krmítka

Krmítka byla připravena podle eseje *in vitro* krmení (Körber & Guerin, 2007) s rozdílem, že klasické skleněné krmítka byla nahrazena plastovými. Pro přípravu 8-10 silikonových membrán je zapotřebí 15 g silikonu (Wacker), 5 g silikonového oleje (FLUKA) a 2,9 g 95 % n-hexanu (Lach-Ner).

Vše bylo důkladně promícháno, vzniklá homogenní hmota byla ihned pečlivě rozetřena na čistou rovnou desku a ponechána přes noc uschnout. Tloušťka membrány byla poté změřena mikrometrem a pouze membrány o tloušťce 130 μ m a méně byly použity pro experiment.

Na očištěné okraje krmítka bylo nanášeno malé množství silikonu. Tímto způsobem bylo krmítko přilepeno k silikonové membráně a ponecháno přes noc pečlivě vyschnout. Druhý den byla membrána odstrižena podle tvaru krmítka.

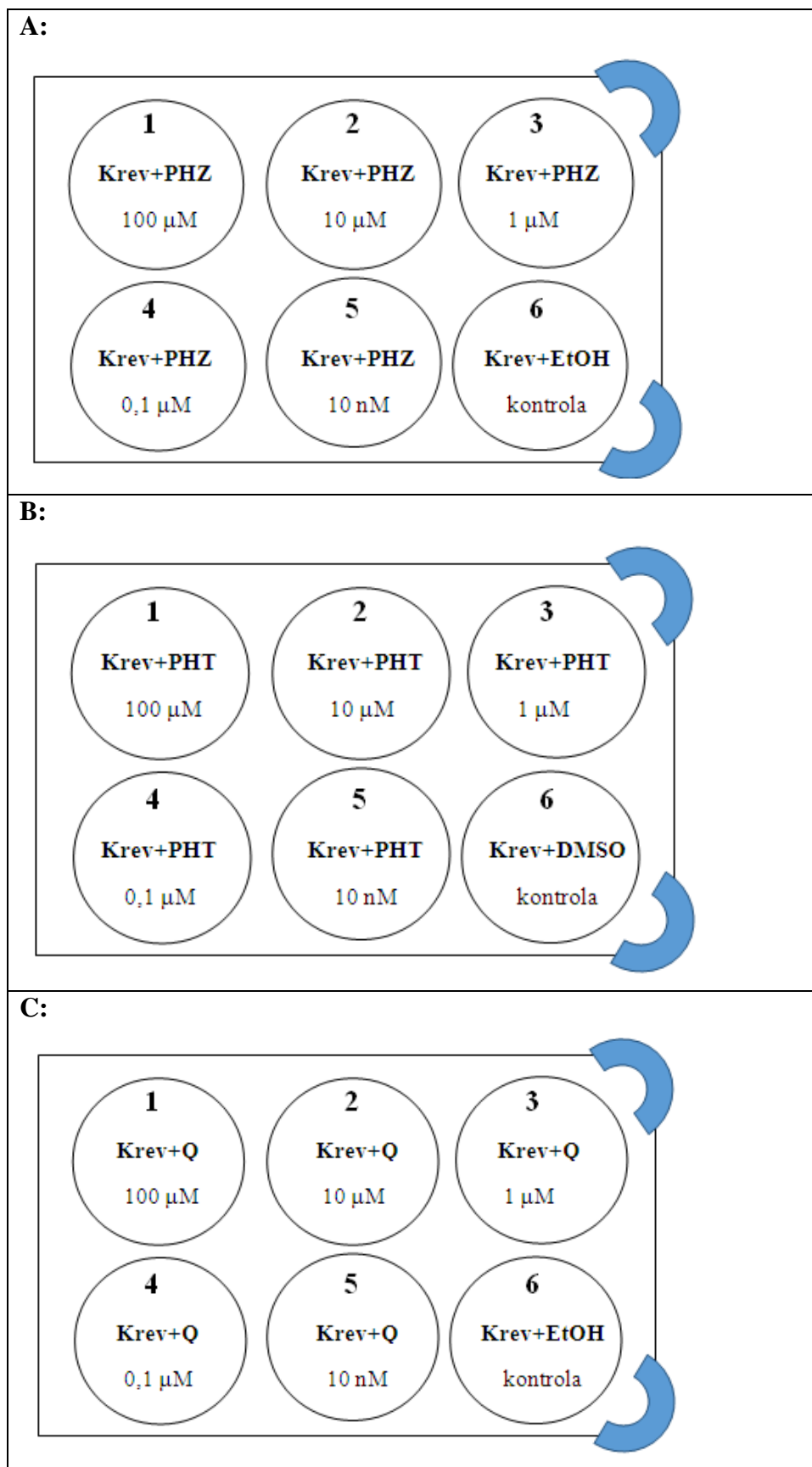
4.7.2. Příprava krve

Hovězí krev byla získána z místních jatek a manuálně defibrinována. V laboratoři pak, do takto připravené krve, byla přidána glukóza (0,2%) a antibiotikum gentamicin (5 μ g/ml). Krev byla uchována při teplotě 4 °C.

Upravená krevní dieta byla aplikována do šesti-jamkové destičky. Do každé jamky bylo nejprve přidáno 31 μ l ATP (1mM), 3,1 μ l gentamicinu (5 μ g/ml) a nakonec krevní dieta o objemu 3,1 ml. Vše bylo důkladně promícháno. Krevní dieta byla měněna po 12 hodinách po dobu 1 týdne, tzn. do plného nasátí samičky.

4.7.3. Membránové sání s dostupnými inhibitory

Jako dostupné inhibitory proti klíčtčím glukózovým přenašečům byly zvoleny Phloridzin dihydrát (PHZ, Sigma), Phloretin (PHT, Sigma) a Quercetin (Q, Sigma). Krevní diety byly připraveny následovně (Obr. 3):



Obr. 3: Připravená krevní diety s využitím dostupných glukózových inhibitorů. A: PHZ = phloridzin dihydrát, B: PHT = phloretin, C: Q = quercetin, rozpouštědlo: EtOH = etanol nebo DMSO = dimethylsulfoxid.

Ve vhodném rozpouštědle (EtOH = etanol, DMSO = dimethylsulfoxid) byl připraven maximálně koncentrovaný zásobní roztok, který byl následně desítkovým ředěním rozředěn na roztok o výsledných koncentracích (Obr. 3) a přidán tak do krevní diety.

Do kontrolního krmítka bylo přidáno pouze rozpouštědlo (EtOH nebo DMSO) a čistá krev.

4.7.4. Membránové sání s využitím 2-deoxy-D-glukózy

Pro zjištění nezbytnosti glukózy v krvi hostitele byl proveden jednoduchý experiment. Samice klíšťat byly nechány sát na krevní dietě obohacené o 2-deoxy-D-glukózu (0,9 mM, Sigma).

5. Výsledky

5.1. Identifikace glukózových přenašečů v *I. ricinus*

K získání kompletní sekvence z klíštěte *I. ricinus* byl využit transkriptom klíštěte *I. ricinus*. Proteinové sekvence všech šesti glukózových přenašečů byly pro zjednodušení označeny GLUT1-6 a srovnány v sekvenčním alignmentu v BioEdit (Obr. 4, 5), podle kterého byly navrženy specifické oblasti pro RT-PCR a pro syntézu dvouvláknové RNA. Tato RNA byla v práci využita ke zkoumání funkce jednotlivých přenašečů pomocí systemické RNAi v dospělých samicích klíštěte *I. ricinus*.

Z alignmentu je patrná velmi vysoká identita mezi aminokyselinovými sekvencemi glukózového přenašeče GLUT2 a GLUT3 (Obr. 5). Z tohoto důvodu byly navrženy specifické primery na oblasti s nízkou homologií u 3' konce (Obr. 5).

| | | | |
|--------|-----------|---|--|
| GLUT 1 | Ir-115811 | -----MLSKRGLLWLKLGRTLNLDLGCFCMGLVMS----- | -----LTGVALLDLVEIYESDVKTVSHLI |
| GLUT 4 | Ir-4800 | ----- | -----MLLSMGVI |
| GLUT 5 | Ir-119926 | -----EGLTCMLVLAIFASVLGMFQFGYNLGVINAPQKVVEGFIS----- | -----SVYLERTGHEITKNFKDWLWATVAVF |
| GLUT 6 | Ir-110212 | MDVDVQVFRVLVGEIGPQQIILYFLYTSVVGGLFVSGQMLQIVFTGATPEYKWCWNGTEEMKTLCDSDMCRLLPQYTSFTFSIATEWDLICSRAYEVRVQSVF | |
| GLUT 1 | Ir-115811 | TTRCVACLVGSLIGGKLYDTNTQVMSILTMVAFASVLMIPISGNLAIAHFVVFVGVGFCAFDTGGNWIILKWPQNSSPALQVPHLSFGICDVAAP | |
| GLUT 4 | Ir-4800 | VIG-----WICIFAGTVPG----- | -----VLFAGRLITCVTMGLVSIAGPVFVSEVSPKNIIRGLINSLCTMAESIGIIMSY |
| GLUT 5 | Ir-119926 | AICGMVCGISGGMIANRFGRKGGMLINNIGLILGSSMMGFSHASRSIELLIFGRLLIICINCLNTALVPMYLLLEISEVPLRGGIGTVSOQGVTVEMLLSQ | |
| GLUT 6 | Ir-110212 | MACVMSCAFFFGYISDRFRRR---TLLFSSITAMSAFSSFFGGFAPSLAIAAACRFLACMTTASMALVSVFMMTELVGPSSRRALMGLTFPLVFAFCLAMHA | |
| GLUT 1 | Ir-115811 | LLAEFFLSTIPTDDELEADNPFTFNESYFLYPAQTHNSTIPVSESVHYAFIAISGFYLIPIISMIVLYFIDDSDFKPPTKNHLEIALDKEETEDVR | |
| GLUT 4 | Ir-4800 | VLGKWLAY-----DWLAVASIVPAVLTALILPWLAESEPRWLLQIGHR-EAANLALQSYRG----- | FDIDGFEQDMKDNVDNAEEFRLAELKPKSIYRPI |
| GLUT 5 | Ir-119926 | ILGIEVILGTEEGWPIALAIIVPAVLQVLVLPFCPESEPRWLLISKQOESLAREALQKLRCSLVEDDIEEMKTEEQAQQQAEKVTMLOVISTRSLQPLP | |
| GLUT 6 | Ir-110212 | LLAYLIEN-----WRYTYMATSLLAVALFLPLVLLLPESERWLLHGGQAQAKAVLVHIAVKNGTAGCLPRSELQEQKLLHHSRGSNPKVFLNRLIRNQT | |
| GLUT 1 | Ir-115811 | FSRVLLGLLAAYVCVYVALECSSGOMITAVAVKCDLHLAKT----- | TASRIAAVYFLCFAGSRVIAAVIAIKVTSYQMLVGSHELLAVT-----AVVMVM |
| GLUT 4 | Ir-4800 | SIILLVFLVQFTGVSVMFYTODIFAMAGSTLSVADSSII-VCTVPLLSVGVAAVITDRLGRKVLLLMSLITICAVSLAALGTFFYHFKLKGDAFVSESLG | |
| GLUT 5 | Ir-119926 | LIGIFMHLSQLSGIIAVFYISVRLFEAGLPPSTAKFATIGVGVMMVMTLVSIPMLDRAGRRTLHLYLGLGGMFIFSIFITISLLVKFL----- | YQWIT |
| GLUT 6 | Ir-110212 | LVQLEIWLVNGIIT-----VYALTMMASS--LGGDLYLSTALSCLIEVPGYLLSAWLLSTAGRRLSLCGTMVLSAACLALQFASYFVYG----- | ATVEN |
| GLUT 1 | Ir-115811 | WGNSEAVLWACAALLGLGQGEIYGAAVAWTVSYINISNQMMSLIIVTAVGAMAPSLLVGQFLEYNPSVFLYVCFVTVVLCIVVLLAMFLTRKRPMLI | |
| GLUT 4 | Ir-4800 | WLPSSSLCIYFLGFSVGLRPVPLLMGEMLPLRIKGFASCVLMCFFACAVTQOYHPMLMLFCEDGIFWFYASFAV-AGFVLIAAFLRETNGKSLLEEL | |
| GLUT 5 | Ir-119926 | YMSVSTLCFVVFPAICPGTIPWMLMAELFSQGRPAAMSIGVLNWSANFIVSLVFPMPQEAALG-NYTLFPLFTLLG-FFWFTFYKVPETKRNRTFEEI | |
| GLUT 6 | Ir-110212 | ALSLAAKMCISMSIAIY-----LYSABLMPITVRNVMGLASVAARIGCIISFPVSLDDVTPGQFQSVLGLMMLASGLLGLLPELMPETIYDV | |
| GLUT 1 | Ir-115811 | AVKKKCLNEVNGDAVTKD---DKFSL----- | |
| GLUT 4 | Ir-4800 | EELFORKQRETEPVLCGT---S----- | |
| GLUT 5 | Ir-119926 | SALFRDDVTNINGLATQ---RNSLAPGQDVMFEKPECKL----- | |
| GLUT 6 | Ir-110212 | EETVEQDNDKRPILSDSPRRHNESSLHEEQGAAVGSEGEAFADERN | |

Obr. 4: Srovnání aminokyselinové sekvence pro glukóзовé přenašeče GLUT 1 (Ir-115811), GLUT 4 (Ir-4800), GLUT 5 (Ir-119926), GLUT 6 (Ir-110212) z klištěte *Ixodes ricinus*. Červené ohraničení: primery pro dsRNA GLUT 1, modré ohraničení: primery pro dsRNA GLUT 4, zelené ohraničení: primery pro dsRNA GLUT5, oranžové ohraničení: primery pro dsRNA GLUT 6. Alignment byl vytvořen v programu BioEdit se 75% shodou. Černé podbarvení: stejné aminokyseliny, šedé podbarvení: aminokyseliny s podobnými vlastnostmi, bílé podbarvení: zcela odlišné aminokyseliny.

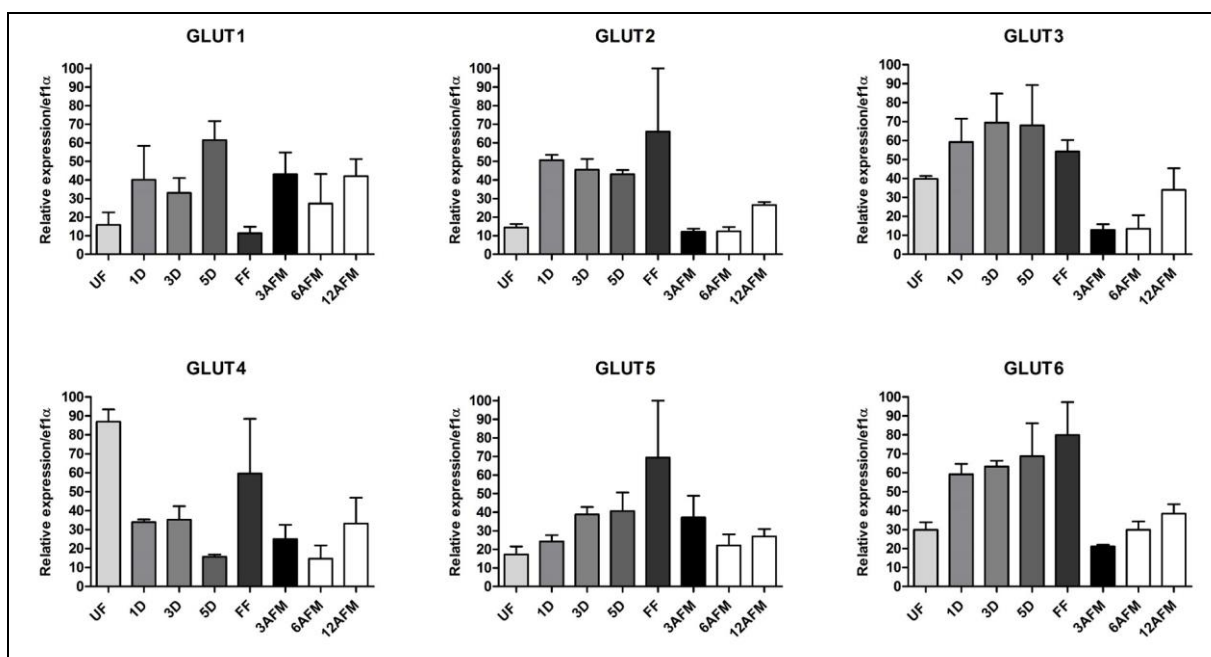
| | | | |
|--------|-----------|--|--|
| GLUT 2 | Ir-108969 | ASVMTEPAAKSGDVFETVNLBAWDIVVVVAYFVAVIAVGVSSWRSSRGSMSGYFLASRSMEHWIPVGASLFASNIGSGHFVGLAGSQAASGIGIAGFELN | |
| GLUT 3 | Ir-99432 | ----TMSAVNSGNAFGKINLEPFDIVVVVAYFVAVIAVGVSSWRSSRGSMSGYFLASRSMEHWIPVGASLFASNIGSGHFVGLAGSQAASGIGIAGFELN | |
| GLUT 2 | Ir-108969 | AVFILLLLGWFFVPVYVAVSGVYTMPEYLKRFRGGQRIYVYLSVLALLLSIFTKISADLFAGAFIFIKQALGWNLYLSVCVLLVLAFLFTVAGGLSAVIWTD | |
| GLUT 3 | Ir-99432 | ALFVLLLLGWFFVPVYVAVSGVYTMPEYLKRFRGGQRIYVYLSVLALLLSIFTKISADLFAGAFIFIKQALGWNLYLSVCALLVLAFLFTVAGGLSAVIWTD | |
| GLUT 2 | Ir-108969 | FVQTHLIVVGAFLMVLISLVEVGGYDNLKMAATAEPTNASYARYTANNESCSRVPDNYNHLLRSPDSELPWTGMVFGTLTSAIWIWCSQDQIVQORALS | |
| GLUT 3 | Ir-99432 | FVQTHLIVVGAFLMVLISLVEVGGYDOLMKATAEPTNASYARYTANNESCSRVPDNYNHLLRSPDSELPWTGMVFGSVVCAIWIWCSQDQIVQORALS | |
| GLUT 2 | Ir-108969 | AKNMVHAKAGCVMAGYLKLLPILYLLVLPMAARVLPDVLVACSSPERCRDVCNDKGCNTNIAYPLLVVKLMPVIGARGMMLSVMLAALMSSLSISIFNSSST | |
| GLUT 3 | Ir-99432 | AKNMVHAKAGCVMAGYLKLLPILYLLVLPMAARVLPDVLVACSSPERCRVCDNENGCTNIAYPLLVVKLMPVIGARGMMLSVMLAALMSSLSISIFNSSST | |
| GLUT 2 | Ir-108969 | IFTIDIWKKFRKNASEVELLIVGRTFVVVLVAVSIVWIPITIEAFPSCQLPHYIQSVTSELAPPVCAVYVLAWSKRINEPGAFWGLMVLVVGMCRFQWE | |
| GLUT 3 | Ir-99432 | IFTIDIWKKFRKNASEVELLIVGRTFVVVLVGVSIILWIPITIEVFPSSQLPHYIQSVTSELAPPVCAVYVLAWSKRINEPGAFWGLMVLVVGMSRFQWE | |
| GLUT 2 | Ir-108969 | ISYSVPGCGSDPDPRAIISVHYLHFVALLLEISVITVVISLTPPIDKOLYRLTYSTFNSTETREDLEKPRKKSVEITAVSGGVENKAFSKSSD | |
| GLUT 3 | Ir-99432 | FSYHVPGCCSDPDPRAIISVHYLHFVALLLEISVITVVISLTPPIDKOLYRLTYATRKSTAREDLDRPRIKSVSQVNGVYNGCTDNVSYTKSSD | |
| GLUT 2 | Ir-108969 | NLTSPEIATMTTGPASPHQAVPSPKESGIIKRAFICCGVTSTHERAEADDANPMPAMSPAEEAHOAAESLQEHFVWGVKVCNVNAILVIVVAVFVGF | |
| GLUT 3 | Ir-99432 | NLS--NDIPMTTLRDSPPHESIRPTHKEVSGIKRVLCICGVTSTQOKAEAEANPLPCLSPAEEAHOAAESLQEHFVWGVKVCNVNAILVIVVAVFVGF | |
| GLUT 2 | Ir-108969 | YA | |
| GLUT 3 | Ir-99432 | YA | |

Obr. 5: Srovnání aminokyselinové sekvence pro glukóзовé přenašeče GLUT 2 (Ir-108969) a GLUT 3 (Ir-99432) z klištěte *Ixodes ricinus*. Červené ohraničení: primery pro dsRNA GLUT 2, modré ohraničení: primery pro dsRNA GLUT 3. Alignment byl vytvořen v programu BioEdit se 100% shodou. Černé podbarvení: stejné aminokyseliny, šedé podbarvení: aminokyseliny s podobnými vlastnostmi, bílé podbarvení: zcela odlišné aminokyseliny.

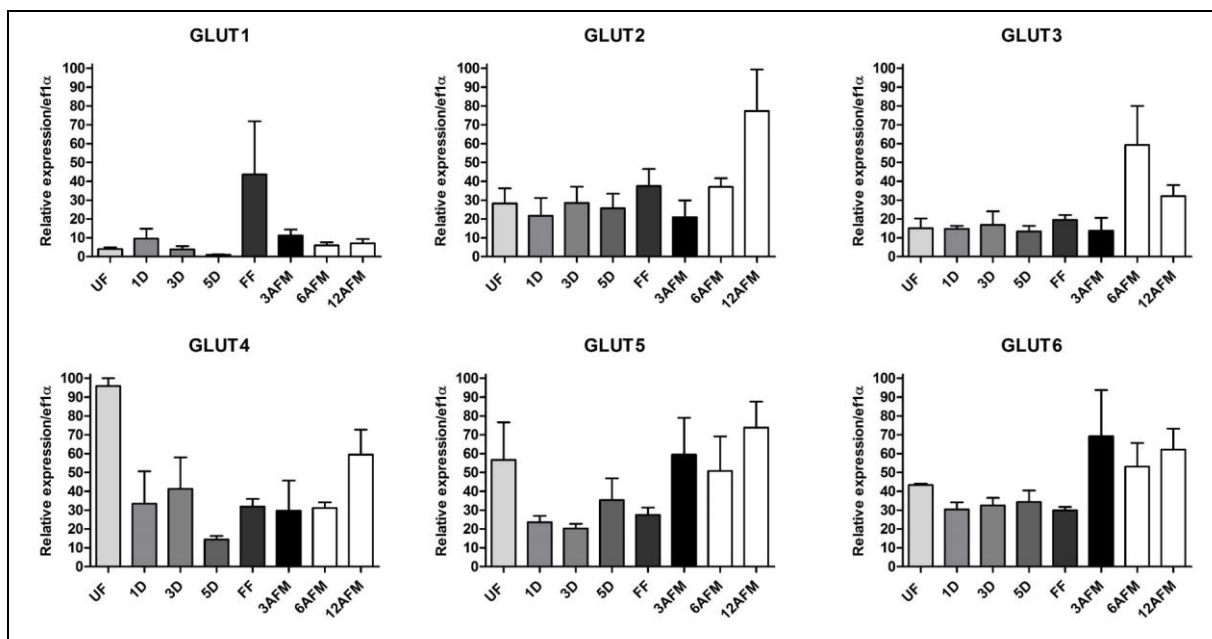
5.2. Zjištění tkáňové exprese glukózových přenašečů

Pro identifikaci relativního množství mRNA a analýzu exprese glukózových přenašečů v klíčcích tkáních (Tab. II) byla použita metoda RT-PCR. Poměrně vysoká hladina exprese ve střevě během sání naznačuje, že právě tato tkáň bude hlavní tkání podílející se na příjmu glukózy (Obr. 9). Také periferní tkáně jako slinné žlázy a ovária jsou zahrnuty v katabolismu glukózy, ale zejména až v pozdějších časových intervalech sání tj. po odpadnutí z hostitele (Obr. 7, 8).

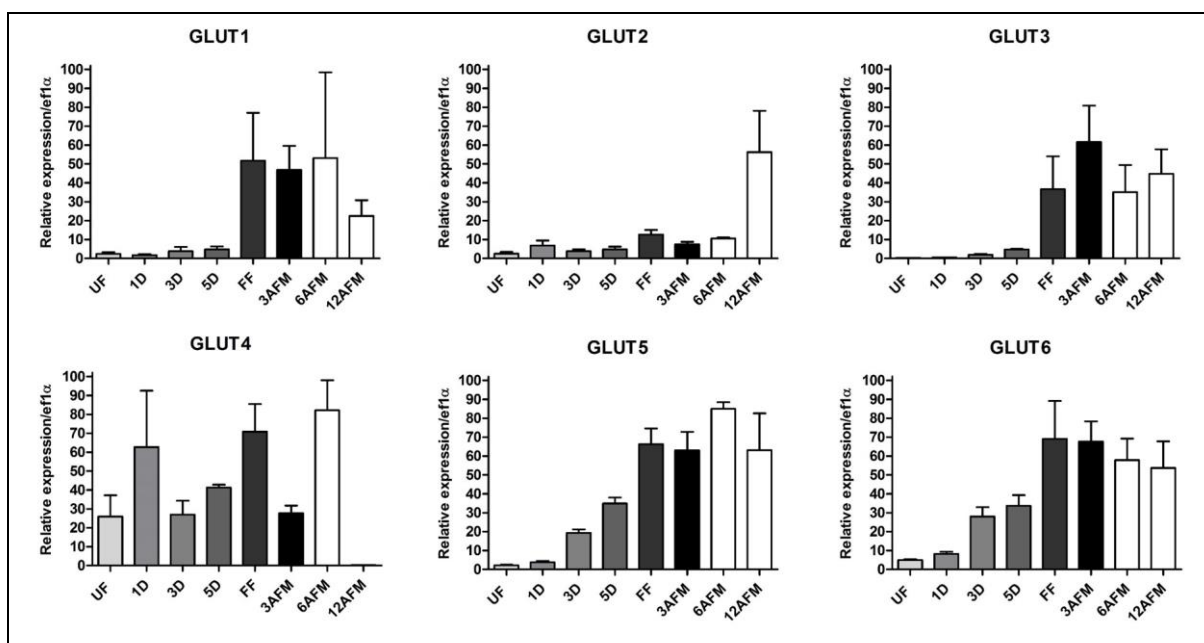
Dále jsme analyzovali, jak je regulována hladina jednotlivých transkriptů ve střevě, slinných žlázách a ováriích klíčtete v průběhu sání a po odpadnutí z hostitele. Zatímco exprese glukózových přenašečů ve střevě se zvyšovala během sání, po dosátí klesala (Obr. 6). Exprese v periferních tkáních (slinné žlázy a ovária) se značně zvyšovala po odpadnutí z hostitele (Obr. 7, 8).



Obr. 6: RT-PCR analýza exprese glukózových přenašečů v klíčcím střevu během a po sání. UF = nenasáté samice, 1D = 1 denní samice, 3D = 3 denní samice, 5D = 5 denní samice, FF = plně nasáté samice, 3AFM = 3 dny po ukončení sání, 6AFM = 6 dní po ukončení sání, 12AFM = 12 dní po ukončení sání. Grafy znázorňují průměr a směrodatnou odchylku, n = 3.



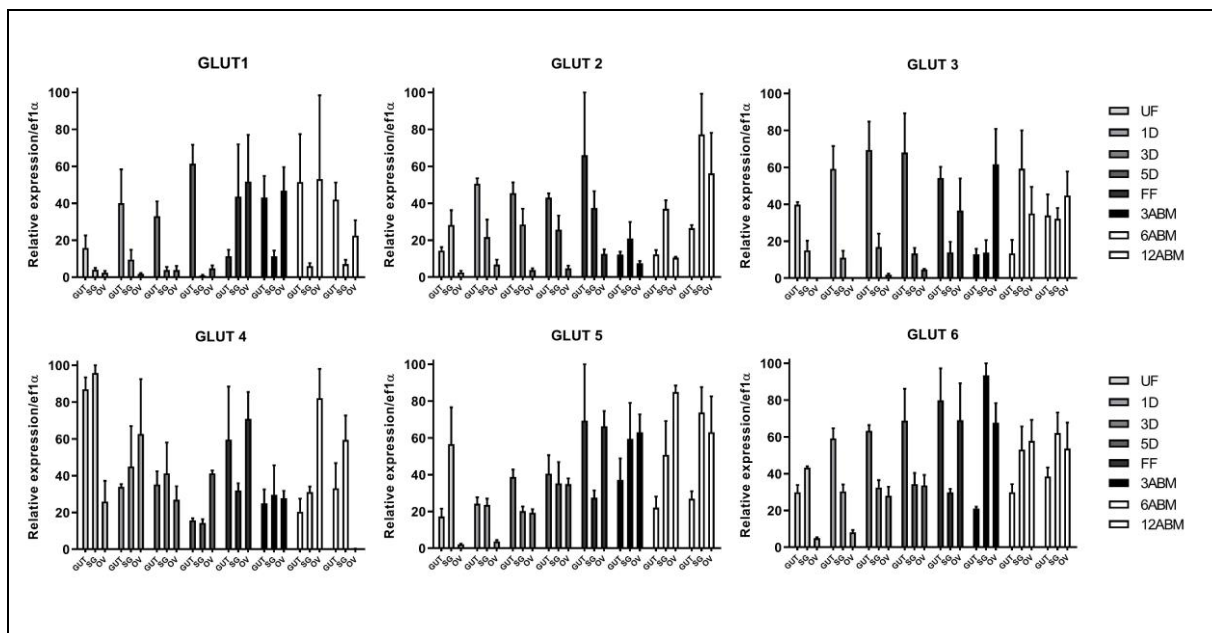
Obr. 7: RT-PCR analýza exprese glukózových přenašečů v klíčcích slinných žláz během a po sání. UF = nenasáté samice, 1D = 1 denní samice, 3D = 3 denní samice, 5D = 5 denní samice, FF = plně nasáté samice, 3AFM = 3 dny po ukončení sání, 6AFM = 6 dní po ukončení sání, 12AFM = 12 dní po ukončení sání. Grafy znázorňují průměr a směrodatnou odchylku, n = 3.



Obr. 8: RT-PCR analýza exprese glukózových přenašečů v klíčcích ováriích během a po sání. UF = nenasáté samice, 1D = 1 denní samice, 3D = 3 denní samice, 5D = 5 denní samice, FF = plně nasáté samice, 3AFM = 3 dny po ukončení sání, 6AFM = 6 dní po ukončení sání, 12AFM = 12 dní po ukončení sání. Grafy znázorňují průměr a směrodatnou odchylku, n = 3.

5.3. Výsledky tkáňových transkripčních profilů pro glukózové přenašeče

Z transkripčního profilu pro tkáň-střevo, slinné žlázy a ovária (GUT, SG, OV) je patrné, že akumulace exprese glukózových přenašečů probíhá především ve střevě během sání v porovnání s periferními tkáněmi (SG, OV). Periferní tkáň zejména ovária ukazují svoji aktivitu v expresi až v pozdějším časovém intervalu tj. po odpadnutí z hostitele (Obr. 9).



Obr. 9: Kombinované zobrazení tkáňové RT-PCR analýza exprese glukózových přenašečů během a po sání. GUT=střevo, SG=slinné žlázy, OV=ovária, UF = nenasáté samice, 1D = 1 denní samice, 3D = 3 denní samice, 5D = 5 denní samice, FF = plně nasáté samice, 3AFM = 3 dny po ukončení sání, 6AFM = 6 dní po ukončení sání, 12AFM = 12 dní po ukončení sání. Grafy znázorňují průměr a směrodatnou odchylku, n = 3.

5.4. Příprava dsRNA glukózových přenašečů pro RNAi analýzu

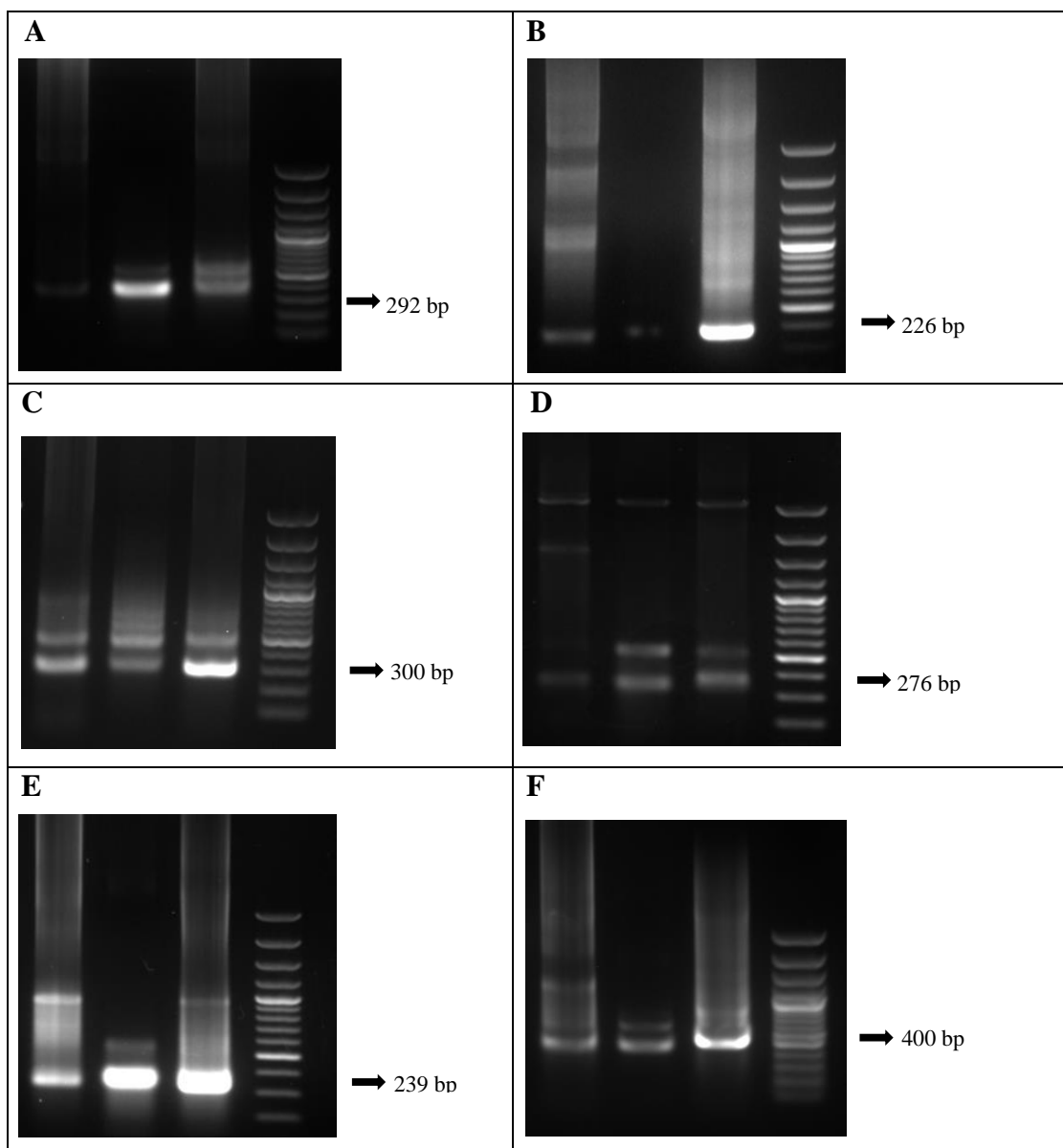
5.4.1. Výsledky PCR reakce a sekvenace

Získané PCR produkty byly separovány pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu. Navržené primery pro zkoumané glukózové přenašeče (Tab. IV) obsahovaly restrikční místa pro ApaI a XbaI. Po extrakci z gelu pak byla DNA danými enzymy vyštípnuta, stejně jako plasmid a zaligována.

Osekvenovaná plazmidová DNA nesla 100% identitu na nukleotidové úrovni v porovnání s výchozí nukleotidovou sekvencí všech zkoumaných glukózových přenašečů.

5.4.2. Výsledky syntézy dvouvláknové RNA

Zaligovaný plasmid poté sloužil k syntéze jednovláknových RNA. Hybridizaci vzniklých komplementárních vláken RNA (3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) došlo přes noc v poměru 1:1. Úspěšnost syntézy dsRNA pro glukózové přenašeče byla ověřena pomocí elektroforézy v 1% agarózovém TAE gelu s použitím nanášejícího pufru (Obr. 10).



Obr. 10: Ověření úspěšnosti syntézy pro dsRNA glukózových přenašečů pomocí elektroforézy v 1% agarózovém TAE gelu. A-F zleva: ssRNA z Apy, ssRNA z Xby, dsRNA, 100 bp DNA marker. A: GLUT1, B: GLUT2, C: GLUT3, D: GLUT4, E: GLUT5, F: GLUT6. Šipka znázorňuje teoretickou hodnotu velikosti dsRNA.

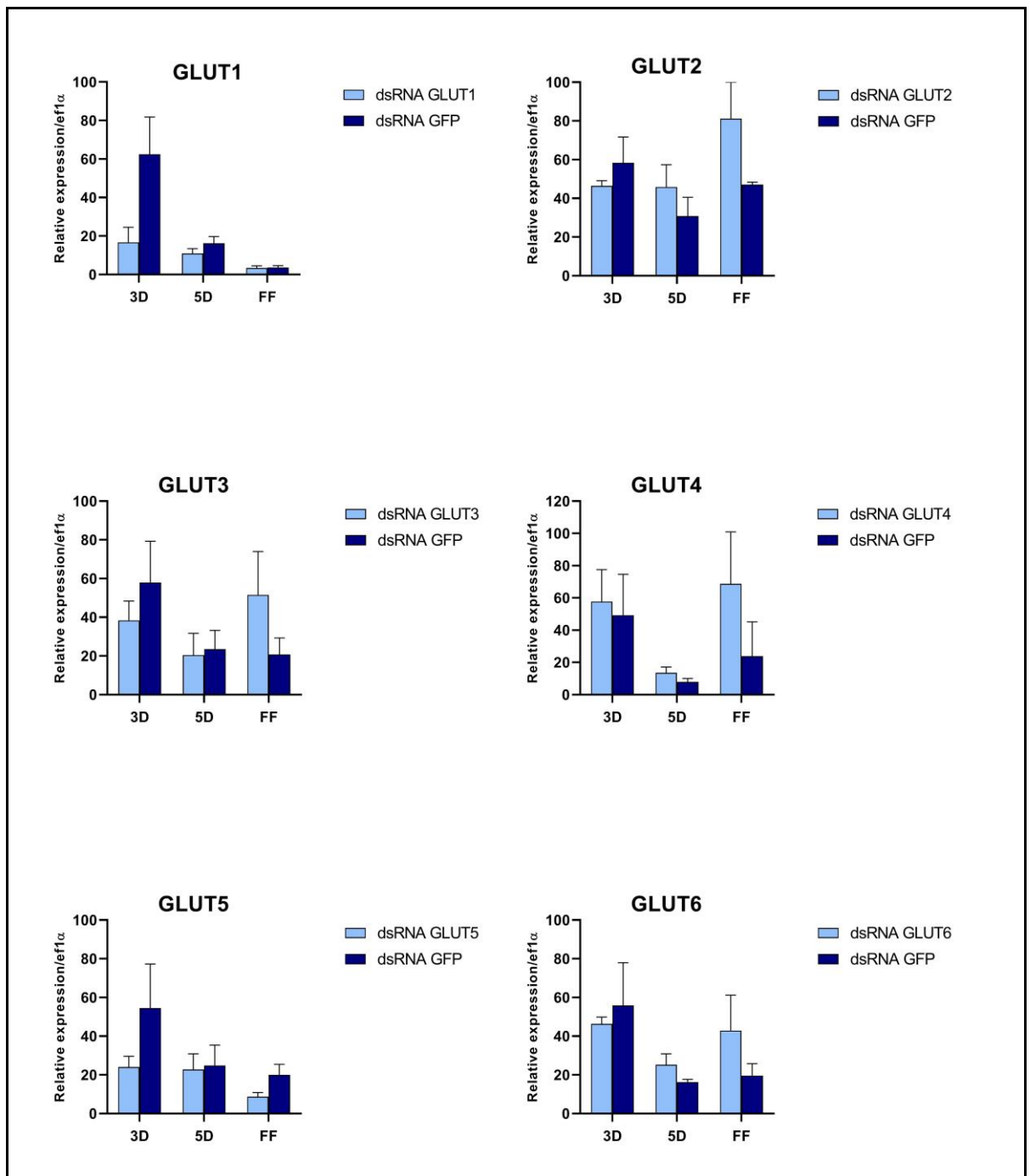
5.5. RNAi glukózových přenašečů a její ověření během a po dosátí dospělých samic klíšťat *I. ricinus*

Pro RNAi pokusy a pozorování fenotypových projevů u KD klíšťat bylo 180 nenasátých samic *I. ricinus* injikováno do haemocoelu přibližně 0,5 μ l (3 μ g/ μ l) dsRNA pro glukózové přenašeče (Obr. 11). Stejně množství dsRNA pro *gfp* bylo injikováno kontrolní skupině. U tohoto experimentu (Tab. IX) byl zaznamenán počet dosátých samic *I. ricinus* a počet samic pro přeživací pokus.

Tab. IX: Průběh experimentu při injikaci 0,5 μ l dsRNA pro glukózové přenašeče (GLUT 1—6) a *gfp* (3 μ g/ μ l). *gfp* = green fluorescent protein, izolace totální RNA střeva, slinných žlaz a ovárií u třech náhodně vybraných samic *I. ricinus* byla provedena dle stanovených časových intervalů během sání klíštěte: 3D = 3 denní samice, 5D = 5 denní samice, FF = plně nasáté samice, 6AFM = 6 dní po ukončení sání.

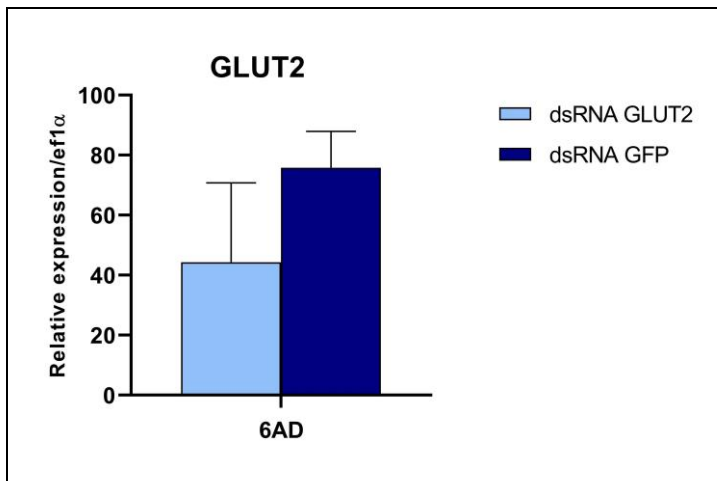
| Experiment | Počet injikovaných samic <i>I. ricinus</i> | Počet přichycených samic na morče | Extrakce RNA pro ověření RNAi | Počet jedinců na přeživací pokus |
|------------------|--|-----------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| dsRNA GLUT 1 | 30 | 26 | 3/3/3 | 14 |
| dsRNA GLUT 2 | 30 | 18 | 3/3/3 | 6 |
| dsRNA GLUT 3 | 30 | 27 | 3/3/3 | 15 |
| dsRNA GLUT 4 | 30 | 18 | 3/3/3 | 6 |
| dsRNA GLUT 5 | 30 | 24 | 3/3/3 | 12 |
| dsRNA GLUT 6 | 30 | 24 | 3/3/3 | 12 |
| dsRNA <i>gfp</i> | 30 | 27 | 3/3/3 | 15 |

Na obrázku 11 jsou ukázány výsledky analýzy RT-PCR. Podle výsledků RT-PCR analýzy se hladinu mRNA ze střev nepodařilo signifikantně snížit oproti dsRNA *gfp* injikované kontrolní skupině (Obr. 11).



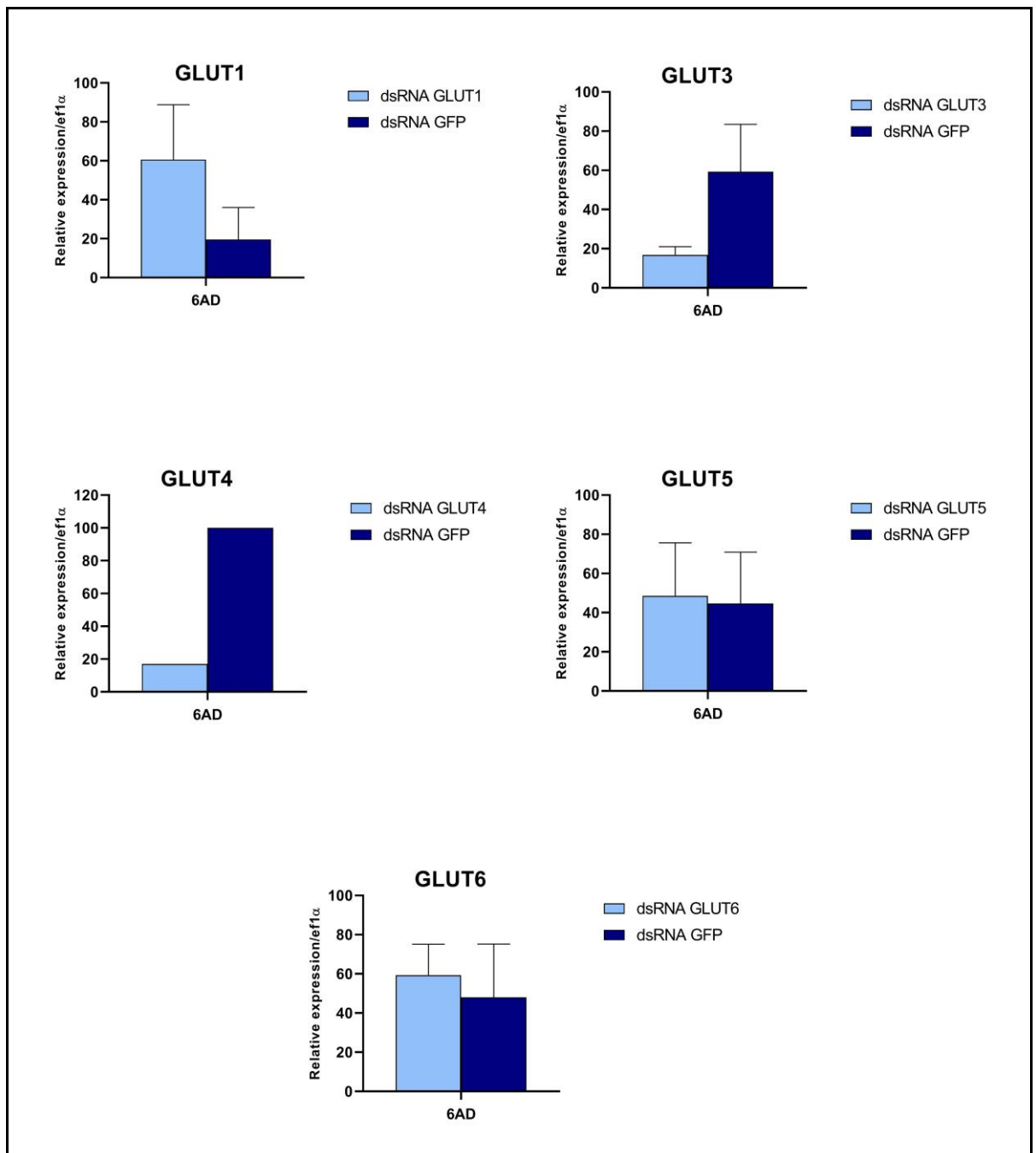
Obr. 11: Ověření RNA interference glukózových přenašečů v klišťacím střevu během sání pomocí RT-PCR analýzy. Expresa glukózových přenašečů v klišťacím střevu u samic *I. ricinus* během sání a po odpadnutí klišťete po injikaci přibližně 0,5 μ l (3 μ g/ μ l) dsRNA GLUT1-6 do haemocelu. Pro kontrolu bylo injikováno stejným množstvím dsRNA pro *gfp* (green fluorescent protein) 30 nenasátých samic *I. ricinus*. Intervaly sání klišťat: 3D = 3 denní samice klišťat, 5D = 5 denní samice klišťat, FF = plně nasáté samice klišťat. Grafy znázorňují průměr a směrodatnou odchylku, n = 3.

Z grafu (Obr. 11) je patrné, že nedošlo ke snížení hladiny exprese u všech glukózových přenašečů v klišťacím střevě během sání, jak se očekávalo. Výraznější snížení exprese se podařilo u glukózového přenašeče GLUT1 a GLUT5.



Obr. 12: Ověření RNA interference glukózového přenašeče v klíštěcích slinných žlázách pomocí RT-PCR analýzy. Expres glukózového přenašeče GLUT2 v klíštěcích slinných žlázách u samic *I. ricinus* po odpadnutí klíštěte z hostitele po injekci přibližně 0,5 μ l (3 μ g/ μ l) dsRNA GLUT2 do haemocelu. Pro kontrolu bylo injikováno stejným množstvím dsRNA pro *gfp* (green fluorescent protein) 30 nenasátých samic *I. ricinus*. Interval sání klíšťat: 6AFM= 6 dní po ukončení sání. Grafy znázorňují průměr a směrodatnou odchylku, n = 3.

Z grafu (Obr. 12) je patrné, že došlo k výraznějšímu snížení hladiny exprese glukózového přenašeče GLUT2 v klíštěcích slinných žlázách v časovém intervalu 6AD tj. 6 dní po odpadnutí z hostitele oproti kontrolní skupině, které byla injikována dsRNA *gfp*. Knock Down (KD) efekt GLUT2 v klíštěcích slinných žlázách dosáhl 50% exprese.

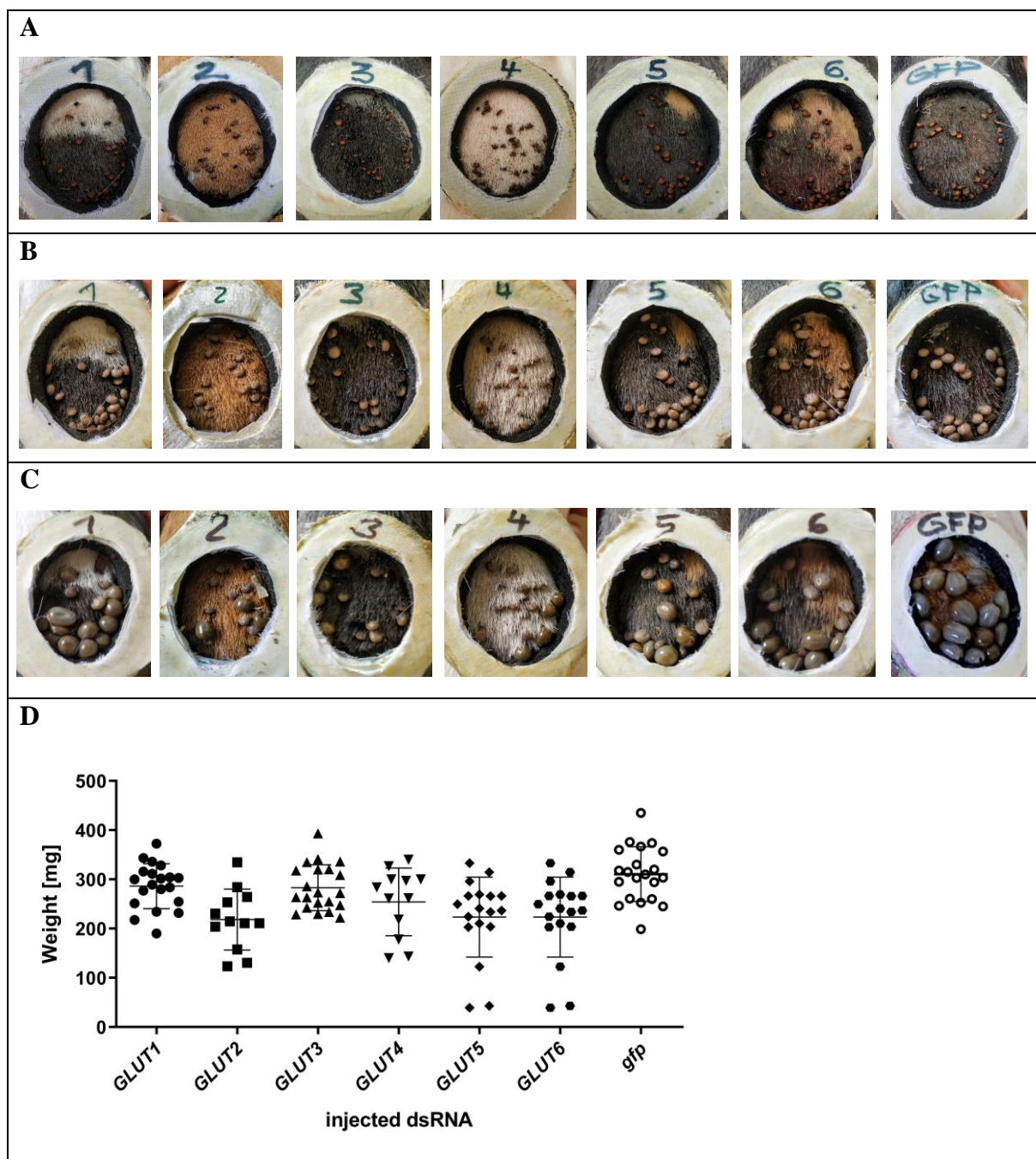


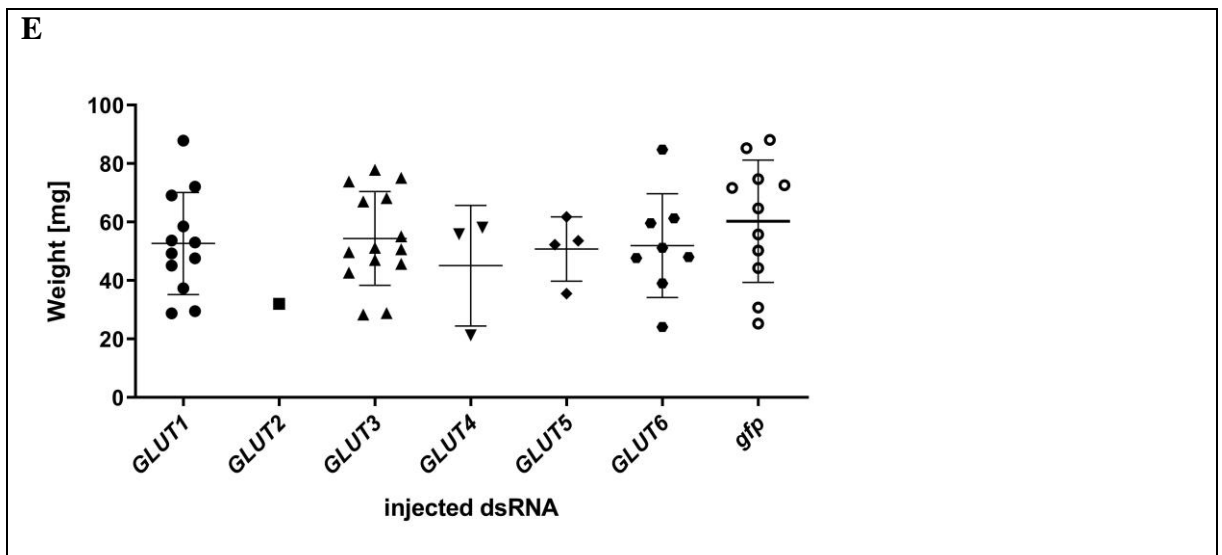
Obr. 13: Ověření RNA interference glukózových přenašečů v klíštěcích ováriích pomocí RT-PCR analýzy. Expresa glukózových přenašečů v klíštěcích ováriích u samic *I. ricinus* po odpadnutí klíštěte z hostitele po injikaci přibližně 0,5 μ l (3 μ g/ μ l) dsRNA GLUT1,3,4,5 a 6 do haemocelu. Pro kontrolu bylo injikováno stejným množstvím dsRNA pro *gfp* (green fluorescent protein) 30 nenasátých samic *I. ricinus*. Intervaly sání klíšťat: 6AFM= 6 dní po ukončení sání. Grafy znázorňují průměr a směrodatnou odchylku, n = 3.

Z grafů (Obr. 13) je patrné, že nedošlo k výraznějšímu snížení hladiny exprese u vybraných glukózových přenašečů v klíštěcích ováriích v časovém intervalu 6AD tj. 6 dní po odpadnutí z hostitele oproti kontrolní skupině, které byla injikována dsRNA *gfp*. Hladinu exprese těchto glukózových přenašečů se nepovedlo signifikantně snížit. Výraznější pokles hladiny exprese byl zaznamenán u glukózového přenašeče GLUT3 a GLUT4 (Obr. 14). KD efekt v klíštěcích ováriích dosáhl 30% exprese u GLUT3 a 20% exprese u GLUT4.

5.6. Snížení glukózových přenašečů neovlivňuje fenotyp samic klíšťat *I. ricinus* po dokončení sání

Účinek RNAi neměl přímý vliv na fenotyp během sání ani po dokončení sání. Letalita a reprodukce samic *I. ricinus* nebyla nijak ovlivněna injekcí dsRNA. Rozdíl v intervalu sání také nebyl pozorován. Samice, injikované dsRNA pro GLUT1-6 sály v průměru po dobu 8-9 dní do plného nasátí. Kontrolní samice, kterým byla injikována dsRNA *gfp* sály rovněž v průměru 8-9 dní. RNA interference neměla přímý vliv ani na váhu plně nasátých samic ani na hmotnost vykladené snůžky (Obr. 14).





Obr. 14: Průběh experimentu s modelovým organismem klíšťě *I. ricinus*. **A:** Interval 3 dny sání (GLUT1-6, *gfp* = Green fluorescent protein). **B:** Interval 5 dnů sání (GLUT1-6, *gfp*). **C:** Interval plné dosátí (GLUT1-6, *gfp*). **D:** Graf kontrolní váhy samic po samovolném odpadnutí (tj. po plném dosátí). **E:** Graf kontrolní váhy nakladených snůžek. Plně nasáté samice (C), foceny 7. den sání, Graf D hodnoty všech plně nasátých samic tzn. 7. -9 den.

Z grafu (Obr. 14) E je patrné, že samice klíšťat, kterým byla injikována dsRNA GLUT2 záhy po dosátí zemřely, nebyly tak schopné reprodukce. Glukózový přenašeč GLUT2 se může jevit jako potenciální kandidát pro pozdější experimenty zaměřené na aktivitu tohoto přenašeče spojenou s životaschopností klíštěte.

5.7. Výsledky membránového sání s využitím dostupných inhibitorů

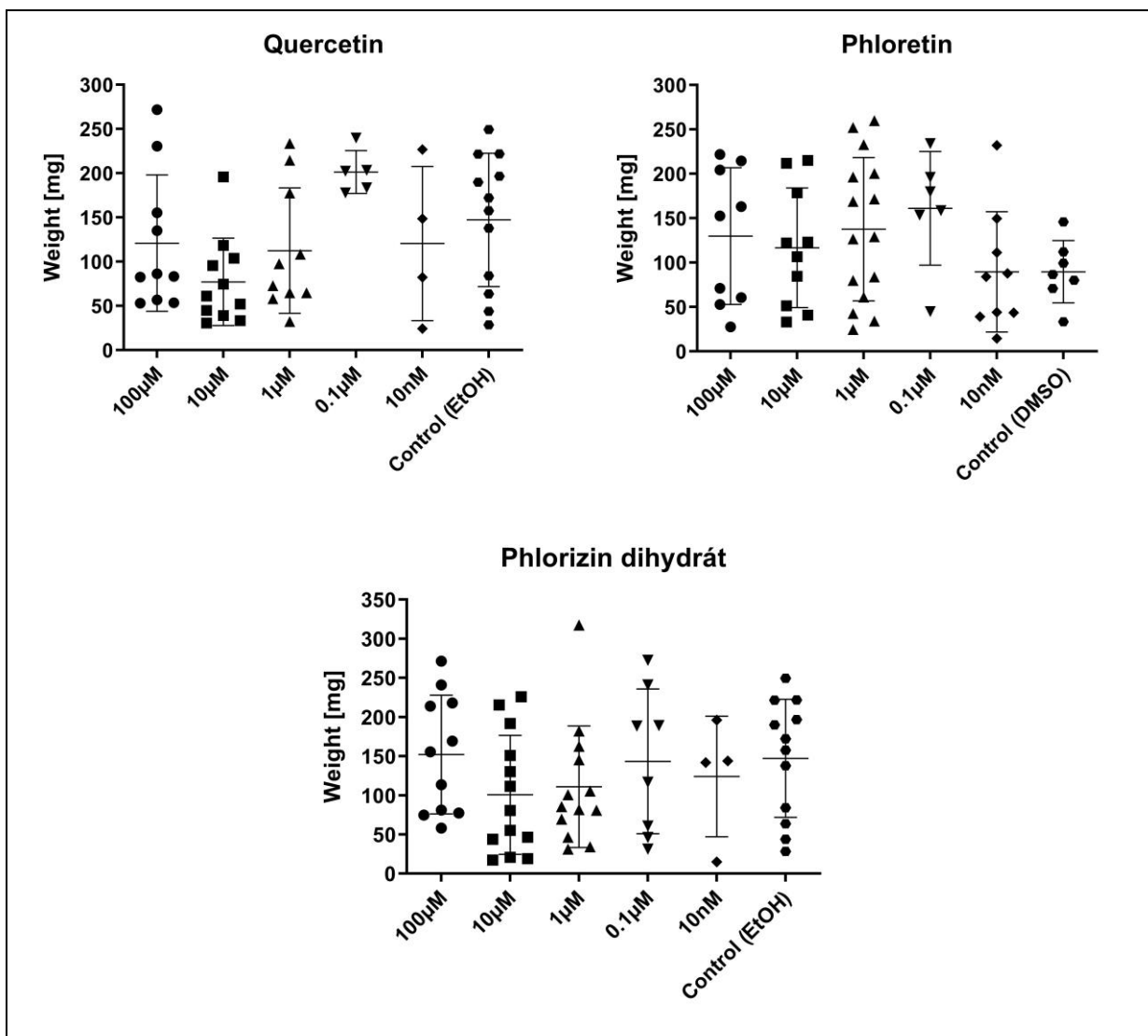
Na základě neúspěšné RNAi analýzy byla provedena chemická inhibice s využitím komerčně dostupných inhibitorů.

Quercetin, nejběžnější flavonoid, je kompetitivním inhibitorem absorpce glukózy. Samotný je transportován do buněk pomocí usnadněné difúze především skrz glukózové přenašeče GLUT1 a GLUT4 (Hamilton et al., 2018).

Phloretin, přirozeně se vyskytující antioxidant, který je obsažen v ovocných stromech (jabloně, hrušně) (Lin et al., 2019) inhibuje aktivní transport glukózy do buněk pomocí glukózových přenašečů (SGLT1 a SGLT2) (Chan & Lotspeich, 1962). Zároveň také ovlivňuje inhibici transportérů močoviny (Fenton et al., 2004).

Phloridzin dihydrát, derivát phloretinu, je kompetitivním inhibitorem SGLT1 a SGLT2, protože soutěží s D-glukózou o vazbu na přenašeč se opět podílí na inhibici aktivního transportu glukózy (Rossetti et al., 1987). Společně s phloretinem pomocí této inhibice se váží na glukózové přenašeče a tím snižují transport glukózy do mozkové tkáně (Betz et al., 1976). Phloridzin byl studován jako potenciální léčba diabetu typu 2, ale prokázal se jako neúčinný lék. Je-li přijat perorálně, je téměř úplně přeměněn hydrolytickými enzymy v tenkém střevě na phloretin (Idris & Donnelly, 2009).

S využitím výše zmíněných glukózových inhibitorů bylo provedeno membránové sání, během kterého lze snadně manipulovat s krmnou dietu bez použití laboratorních zvířat (Obr. 16).



Obr. 15: Kontrolní váhy samic klíštěte *I. ricinus* po ukončení membránového sání s dostupnými inhibitory (quercetin, phloretin a phloridzin dihydrát).

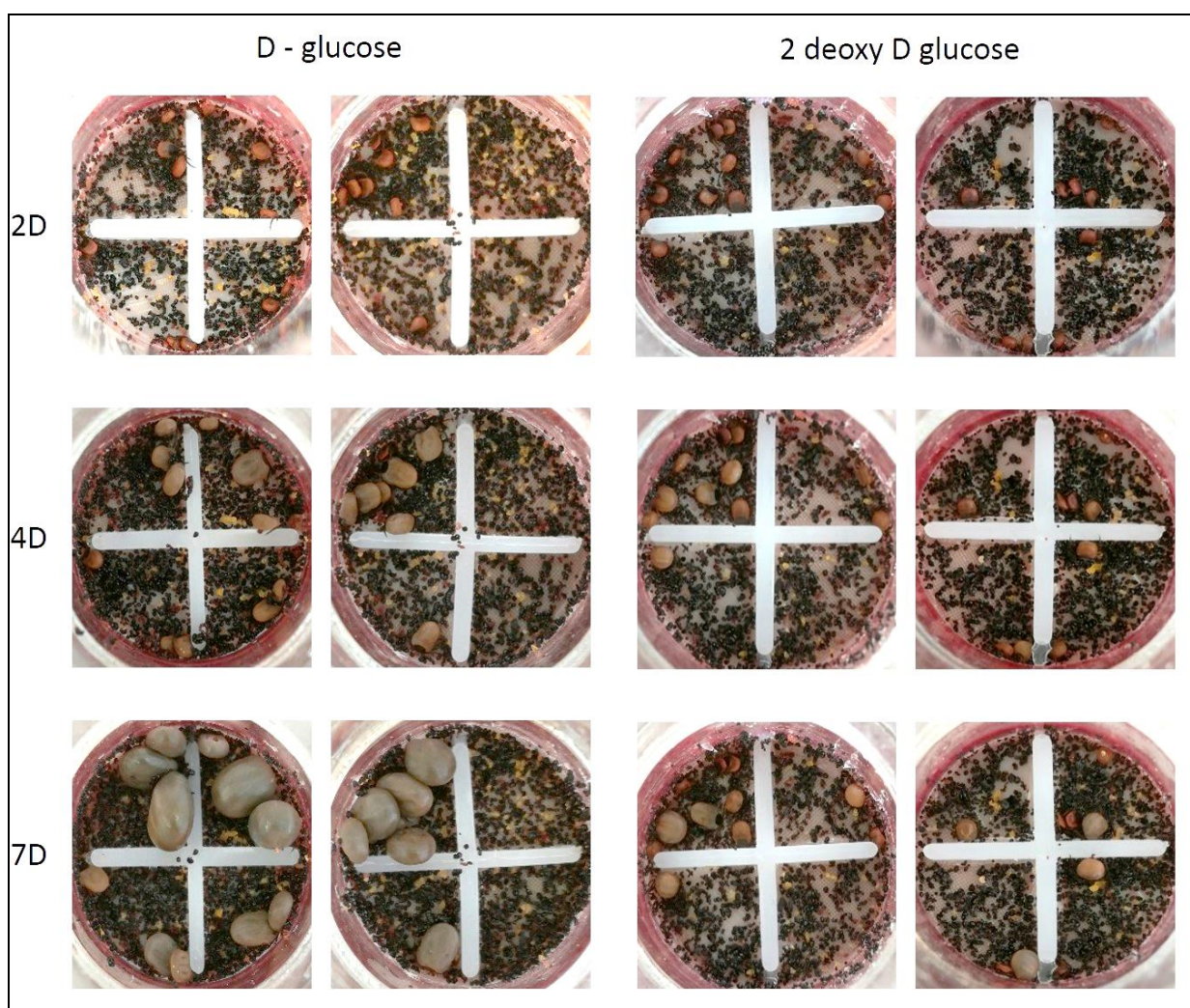
Z grafu (Obr. 15) je zřejmé, že využití samotného glukózového inhibitoru a zároveň jeho různě zvolená koncentrace v krevní dietě nemělo přímý vliv na váhu samic klíštěte *I. ricinus*.

5.8. Výsledky membránového sání s 2-deoxy-D-glukózou

I přes výsledky chemické inhibice glukózových přenašečů, byl proveden pokus membránového sání klíšťat studující závislost klíšťat na glukóze pomocí nebioaktivního glukózového analogu 2-deoxy-D-glukózy.

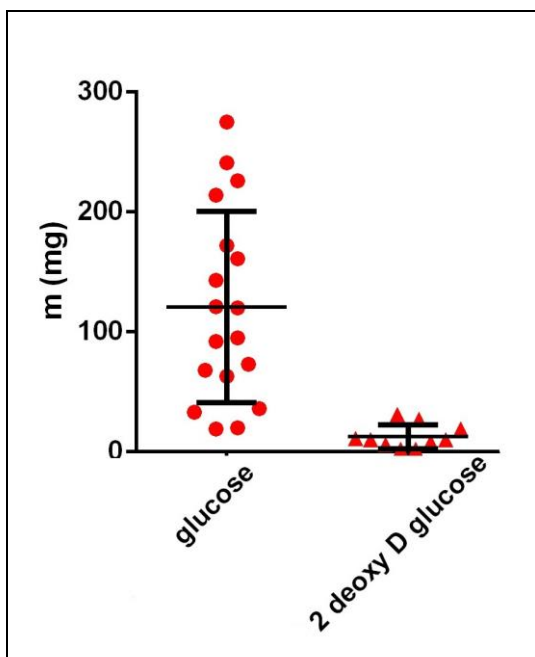
Na obrázku 18 jsou ukázány výsledky nezbytnosti glukózy v hostitelské krvi během membránového sání. Samice klíštěte *I. ricinus*, které byly nechány sát na hostitelské krevní dietě s D-glukózou, sály bez problémů a dosáhly plného nasátí a tak i očekávané standardní hmotnosti (Obr. 16). Samice byly schopné reprodukce.

Naopak samice, které sály na krevní dietě, obohacené o 2-deoxy-D-glukózu, nebyly schopné dosáhnout plného nasátí ani samotné reprodukce.



Obr. 16: Membránové sání s krevní dietou obohacenou o D-glukózu a 2-deoxy-D-glukózu.

2D = 2 denní samice klíšťat, 4D = 4 denní samice klíšťat, 7D = 7 denní samice klíšťat



Obr. 17: Váhy dosátých samic *I. ricinus*. Graf kontrolní váhy samic, které sály na krevní dietě obohacené o D-glukózu a o 2-deoxy-D-glukózu

Z grafu (Obr. 17) je patrné, že samice klíšťat, které sály na krevní dietě s D-glukózou vykazovaly standartní očekávané hmotnosti. Na rozdíl samice klíšťat, sající na krevní dietě obohacené o 2-deoxy-D-glukózu, dosáhly značně velkého rozdílu v dosažené hmotnosti.

Tento výsledek ukazuje, že přítomnost D-glukózy v hostitelské krvi je nepostradatelná a hraje významnou roli jak ve fyziologii tak i vývoji klíštěte.

6. Diskuze

Úloha metabolismu cukrů hraje velmi významnou roli pro syntézu energie v podobě ATP (Thorens & Mueckler, 2010), která je využita ve fyziologii téměř všech živých organismů (Moraes et al., 2007). Základním esenciálním sacharidem, který je součástí potravy, je glukóza. Je přijímána pomocí transportních glukózových přenašečů (Lacombe, 2014).

U člověka je známo několik onemocnění, které jsou způsobeny buď poruchou metabolismu glukózy (deficitu glukózy nebo naopak její nadměrné akumulaci v krvi) během příjmu potravy) (Masopust & Průša, 2004) nebo ve funkci samotného glukózového přenašeče (syndrom Fanconiho-Bickela) (Mueckler & Thorens, 2013).

Bylo zjištěno, že příjem a zpracování glukózy má značný vliv na fyziologické procesy u bezobratlých živočichů. Zástupce hemipter, *Nilaparvata lugens* přijímá glukózu pomocí glukózový přenašeč Nlst6, který je exprimovaný ve střevě. Snížení exprese genu tohoto glukózového přenašeče mělo vliv na růst, vývoj a reprodukci jedince (Ge et al., 2015).

Lze říci, že u zástupců hmyzu živícího se potravou bohatou na cukr (mšice *Acyrtosiphon pisum*) musejí existovat mechanismy, které umožní transport a zpracování cukru skrz střevní epitel (Rhodes et al., 1997) aniž by to ovlivnilo životaschopnost jedince. Inhibice glukózových přenašečů se může jevit jako potencionální řešení v boji proti nežádoucím škůdcům v zemědělství (Ge et al., 2015).

Předpokládá se, že glukózové přenašeče budou mít společné vlastnosti i s jinými organismy, tudíž jejich exprese bude mít zásadní v jejich fyziologii. U *Drosophila melanogaster* byl prokázán podobný systém glukózových přenašečů jako u savčích buněk (Wang & Wang, 1993).

Hematofágní členovci kvůli přežití a reprodukci tráví velké množství živin z nasáté krve hostitele (Kopáček & Perner, 2016). Samotné trávení je soustředěno do střevních buněk klíštěte (Sojka et al., 2013). Tento proces je vysoce energeticky náročný.

Klíšťata z čeledě klíšťatovití (Ixodidae) včetně hematofágního zástupce *Boophilus microplus*, přijímají velké množství krve (Sonenshine, 1991). Tato krev je pro ně jediným zdrojem energie. Díky intracelulárnímu trávení je velké množství krve zpracováno a získaná energie je uložena především do hnědých vajíček v podobě proteinu (Moraes et al., 2007). Bylo zjištěno, že larvy klíštěte *B. microplus* se líhnou pouze z vajíček, které obsahují asi 60% žloutkových proteinů (Logullo et al., 2002). Metabolismus bílkovin závisí na podstatné aktivitě metabolismu sacharidů (Thompson & Dahlman, 1999).

Jakým způsobem je glukóza vstřebávána v trávicím traktu klíštěte *I. ricinus*, však není přesně jasné. U klíštěte *I. ricinus*, byly ve střevě identifikovány transkripty kódující šest glukózových přenašečů (GLUT1-6).

Pomocí metody RNAi jsme chtěli ukázat nezbytnost aktivity všech jednotlivých glukózových přenašečů u klíštěte *I. ricinus*.

Experiment ukázal, že metoda RNAi nebyla tak úspěšná jak se očekávalo. Injikace dsRNA pro GLUT1-6 nesnížila signifikantně hladinu exprese všech glukózových přenašečů.

Ve studii Joga et al., 2016 se poukazuje na možnost existence bariéry, která má za následek, že RNA interference nemusí vždy úspěšně proběhnout u hmyzu. Toto může být důvod, proč naše RNAi měla odlišnou úspěšnost ve všech zkoumaných klíštěcích tkáních.

Po úspěšném utlumení hladiny exprese glukózových přenašečů nebyl pozorován žádný signifikantní pokles v letalitě samic *I. ricinus*. Domníváme se, že snížení hladiny transkriptu jedné formy glukózového přenašeče, nemusí mít zaručeně vliv na další fyziologické procesy ve vývoji klíštěte z důvodu přítomnosti dalších aktivních forem glukózových přenašečů.

Tyto výsledky dokládají fakt, že snížení exprese jednoho glukózového přenašeče nemá žádný vliv na letalitu a reprodukci samic klíštěte *I. ricinus*.

Fenotypový projev, zprostředkovaný RNAi, byl dále ověřen chemickou inhibicí. S využitím dostupných glukózových inhibitorů (quercetin, phloretin, phloridzin dihydrát) během umělého membránového sání pro dospělá stádia *I. ricinus* nebyl pozorován žádný výrazný fenotyp, který by měl za následek zvýšenou mortalitu samic.

Pomocí membránového sání se podařilo vyhodnotit vliv 2-deoxy-D-glukózy ve fyziologii samičky klíštěte během příjmu potravy. Hostitelská krev, obohacená o 2-deoxy-D-glukózu, má přímý vliv na dosažení plného nasátí samic, jejich váhu a navíc tak přímo ovlivní letalitu samic klíštěte (Obr. 17). Domníváme se, že je to způsobeno nefunkčním fosforylovaným analogem deoxyglukóza-6-fosfát (DG-6-fosfát), který dále nepodléhá standartnímu průběhu glykolýzy. Lze říci, že pro tohoto krevsajícího členovce je přítomnost glukózy v hostitelské krvi nezbytností.

7. Závěr

Pomocí známého transkriptomu klíštěte *I. ricinus* s využitím genomu úzce příbuzného klíštěte *I. scapularis* byly získány kompletní sekvence šesti glukózových přenašečů (GLUT1-6) klíštěte *I. ricinus*. Pomocí metody RT-PCR byla provedena analýza exprese těchto glukózových přenašečů v jednotlivých klíštěcích tkáních během sání (Obr. 7, 8, 9).

Expresse glukózových přenašečů se přímo úměrně zvyšovala ve střevě během sání a po odpadnutí z hostitele (plného nasátí) klesala. Největší exprese ve střevě byla detekována u glukózových přenašečů GLUT3 a GLUT6 (Obr. 7).

Pro periferní tkáň (slinné žlázy, ovária) byla zaznamenána signifikantní exprese glukózových přenašečů u samic zejména v časových intervalech po odpadnutí z hostitele (Obr. 8, 9).

S využitím metody RNA interference se nepodařilo signifikantně potlačit exprese všech šesti glukózových přenašečů ve střevě (Obr. 12). Ve slinných žlázách se podařilo úspěšně snížit hladinu exprese glukózového přenašeče GLUT2 (Obr. 13). Zatímco RNA interference v ováriích nebyla tolik úspěšná. Výraznější pokles hladiny exprese v ováriích byl zaznamenán u glukózového přenašeče GLUT3 a GLUT4 (Obr. 13). Na základě stanovených časových intervalů dle expresního profilu nebyla pozorována výrazná změna fenotypového projevu pomocí injikace dsRNA GLUT1-6 a *gfp* (kontrolní skupina samic). Částečné potlačení exprese glukózových přenašečů nemělo vliv na váhu (Obr. 14), letalitu ani reprodukci samic.

Membránové sání s využitím dostupných glukózových inhibitorů (Phloretin, Phloridzin dihydrát a Quercetin) nijak neovlivnilo váhu, letalitu a schopnost reprodukce samic klíštěte (Obr. 15).

Významnost D-glukózy v hostitelské krvi byla stanovena díky membránovému sání na krvi obohacené o 2-deoxy-D-glukózu, nemetabolizovaný glukózový analog. Krevní dieta obohacená o 2-deoxy-D-glukózu měla přímý vliv na váhu samic (Obr. 17), reprodukci a letalitu. Samičky klíštěte nebyly schopné dosáhnout plného dosátí. Přítomnost D-glukózy v krvi hostitele se jeví jako nezbytnost pro přežití samičky klíštěte *Ixodes ricinus*.

8. Seznam použité literatury

- Alam, U., Asghar, O., Azmi, S., Malik, R. A. (2014).** General aspects of diabetes mellitus. *Diabetes and the Nervous System, Handbook of Clinical Neurology*, 126, 211–222.
- Badisco, L., Van Wielendaele, P., Vanden Broeck, J. (2013).** Eat to reproduce: a key role for the insulin signaling pathway in adult insects. *Frontiers in Physiology*, 4, 202.
- Benarroch, E. E. (2014).** Brain glucose transporters: implications for neurologic disease. *Neurology*, 82 (15), 1374–1379.
- Betz, A., L., Drewes, L. R., Gilboe, D. D. (1975).** Inhibition of glucose transport into brain by phloridzin phloretin and glucose analogues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 406 (4), 505–515.
- Bissonnette, P., Gagné, H., Blais, A., Berteloot, A. (1996).** 2-Deoxyglucose transport and metabolism in Caco-2 cells. *Am J Physiol*, 270 (1), 153-162.
- Černohlávek, L. (2017).** IKEM: Revoluce v léčbě cukrovky. *TÉMA* 22, 17-20.
- Fenton, R. A., Chou, C.-L., Stewart, G. S., Smith, C. P., Knepper, M. A. (2004).** Urinary concentrating defect in mice with selective deletion of phloretin-sensitive urea transporters in the renal collecting duct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (19), 7469–7474.
- Ge, L., Jiang, Y., Xia, T., Song, Q., Stanley, D., Kuai, P., Lu, X., Yang, G., Wu, J. (2015).** Silencing a sugar transporter gene reduces growth and fecundity in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera:Delphacidae). *Scientific reports*, (5) 12194.
- Hamilton, K. E., Rekman, J. F., Gunnink, L. K., Busscher, B. M., Scott, J. L., Tidball, A. M., Louters, L. L. (2018).** Biochimie Quercetin inhibits glucose transport by binding to an exofacial site on. *Biochimie*, 151, 107–114.
- Hediger, M. A., Clemençon, B., Burrier, R. E., & Bruford, E. A. (2013).** The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Molecular Aspects of Medicine*, 34 (2–3), 95–107.
- Chan, S. S., Lotspeich, W. D. (1962).** Comparative effects of phlorizin and phloretin on glucose transport in the cat kidney. *The American Journal of Physiology*, 203, 975–979.
- Idris, I., Donnelly, R. (2009).** Sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors : an emerging new class of oral antidiabetic drug. *Diabetes, obesity and metabolism*, 11 (2), 79–88.
- Joga, M. R., Zotti, M. J., Smaghe, G., Christiaens, O. (2016).** RNAi Efficiency, Systemic Properties, and Novel Delivery Methods for Pest Insect Control: What We Know So Far. *Front Physiol*, 7:553.
- Karley, A. J., Ashford, D. A., Minto, L. M., Pritchard, J., Douglas, A. E. (2005).** The significance of gut sucrase activity for osmoregulation in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol* 51: 1313– 1319.
- Kittnar, O. (2011).** *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing.

Klip, A., Tsakiridis, T., Marette, A., Ortiz, P. A. (1994). Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8 (1), 43–53.

Klouda, P. (2013). *Základy biochemie* (3. vyd.). Ostrava: Pavko.

Kopáček, P., & Perner, J. (2016). Vector Biology: Tyrosine Degradation Protects Blood Feeders from Death via La Grande Bouffe. *Current Biology*, 26 (16), R763–R765.

Kröber, T., Guerin, P. M. (2007). In vitro feeding assays for hard ticks., *Trends Parasitol.*, 23 (9), 445-9.

Kubišta, V. (1998). *Buněčné základy životních dějů*. Praha: Scientia.

Lacombe, V. A. (2014). Expression and regulation of facilitative glucose transporters in equine insulin-sensitive tissue: from physiology to pathology. *ISRN Veterinary Science*, 2014, 409547.

Ledvina, M. Stoklasová, A., Cerman, J. (2009). *Biochemie pro studující medicíny. I. díl: (kapitoly1-13)* (2. vyd.). Praha: Karolinum.

Lin, S., Chen, M., Liu, S., Callahan, V. M., Bracci, N. R., Lehman, C. W., Kehn-hall, K. (2019). International Journal of Antimicrobial Agents Phloretin inhibits Zika virus infection by interfering with cellular glucose utilisation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 54 (1), 80–84.

Logullo, C., Moraes, J., Dansa-Petretski, M., Vaz Jr., I. S., Masuda, A., Sorgine, M. H. F., Braz, G. R., Masuda, H., Oliveira, P. L. (2002). Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1805–1811.

Masopust, J., Průša, R. (2004). *Patobiochemie metabolických drah* (2. vyd.). Praha: Univerzita Karlova.

Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G. A., Meisel, A. (2013). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in Neurosciences*, 36 (10), 587–597.

Middleton, E. J., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52 (4), 673–751.

Moraes, J., Galina, A., Alvarenga, P. H., Lazzaro, G., Masuda, A., Vaz, S., Logullo, C. (2007). Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. 146, 528–533.

Mueckler, M., & Thorens, B. (2013). The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34 (2–3), 121–138.

- Mulukutla, B. C., Yongky, A., Le, T., Mashek, D. G., Hu, W.-S. (2016).** Regulation of Glucose Metabolism - A Perspective From Cell Bioprocessing. *Trends in Biotechnology*. 34 (8), 638–651.
- Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. (2001).** Harperova biochemie (3. vyd.). Praha: Lange medical book.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. (2017).** Lehninger Principles of biochemistry. (7. vyd.), W. H. Freeman and Company, New York.
- Paredes-Juarez, G. A., de Vos, P., Bulte, J. W. M. (2017).** Recent progress in the use and tracking of transplanted islets as a personalized treatment for type 1 diabetes. *Expert Review of Precision Medicine and Drug Development*, 2 (1), 57–67.
- Pascual, J. M., Wang, D., Lecumberri, B., Yang, H., Mao, X., Yang, R., De Vivo, D. C. (2004).** GLUT1 deficiency and other glucose transporter diseases. *European Journal of Endocrinology*, 150 (5), 627–633.
- Perner, J., Provaznik, J., Schrenkova, J., Urbanova, V., Ribeiro, J. M. C., Kopacek, P. (2016).** RNA-seq analyses of the midgut from blood- and serum-fed *Ixodes ricinus* ticks. *Scientific Reports*, 6, 36695.
- Price, D. R. G., Karley, A. J., Ashford, D. A., Isaacs, H. V., Pownall, M. E., Wilkinson, H. S. et al. (2007).** Molecular characterization of a candidate gut sucrose in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 307– 317.
- Rhodes, J. D., Croghan, P. C. and Dixon, A. F. G. (1997).** Dietary sucrose and oligosaccharide synthesis in relation to osmoregulation in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Physiol Entomol* 22: 373– 379.
- Rossetti, L., Smith, D., Shulman, G., Papachristou, D., Defronzo, R. A. (1987).** Correction of Hyperglycemia with Phlorizin Normalizes Tissue Sensitivity to Insulin in Diabetic Rats. *J Clin Invest.*, 79 (5), 1510–1515.
- Saladin, K. (2013).** Human Anatomy: Fourth Edition. McGraw-Hill Higher Education.
- Shi, Y. (2013).** Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annual Review of Biophysics*, 42, 51–72.
- Sojka, D., Franta, Z., Horn, M., Hajdušek, O., Caffrey, C. R., Mareš, M., Kopáček, P. (2008).** Profiling of proteolytic enzymes in the gut of the tick *Ixodes ricinus* reveals an evolutionarily conserved network of aspartic and cysteine peptidases. *Parasites & Vectors*, 1, 7.
- Sonenshine, D. E. (1991).** Biology of Ticks, vol. 1. Oxford university Press, New York.
- Sterkel, M., Perdomo, H. D., Guizzo, M. G., Barletta, A. B. F., Nunes, R. D., Dias, F. A., Oliveira, P. L. (2017).** Tyrosine Detoxification Is an Essential Trait in the Life History of Blood-Feeding Arthropods. *Current Biology*, 26 (16), 2188–2193.
- Thorens, B., Mueckler, M. (2010).** Glucose transporters in the 21st Century. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 298 (2), 141-150.

- Thompson, S. N., Dahlman, D. L. (1999).** Blood sugar formation due to abnormal elevated gluconeogenesis: aberrant regulation in a parasitized insect, *Manduca sexta* Linnaeus. *Biochim. Biophys. Acta* 1454, 133–142.
- Tsirigos, K. D., Peters, C., Shu, N., Kall, L., Elofsson, A. (2015).** The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Research*, 43 (1), W401-7.
- Varchanisa, S., Dimakopoulos, Y., Wagner, C., Tsamopoulos, J. (2018).** How viscoelastic is human blood plasma?. *Soft Matter*, 14 (21), 4238-4251.
- Voet, D., Voet, J. G., Pratt, C. W. (2006).** *Fundamentals of biochemistry* (2nd ed.). Hoboken, NJ: Wiley.
- Volf, P., Horák, P. (2007).** *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton.
- Vrtišková Nejezchlebová, L. (2017).** Nová šance pro léčbu cukrovky. *TÉMA* 43, 16-22.
- Wang, M., Wang, C. (1993).** Characterization of glucose transport system in *Drosophila* Kc Cells. *FEBS*, 317 (3), 241-243.
- Wu, X., Freeze, H. H. (2002).** GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics*, 80 (6), 553–557.
- Yan, N. (2017).** A Glimpse of Membrane Transport Through Structures-Advances in the Structural Biology of the GLUT Glucose Transporters. *Journal of Molecular Biology*, 429 (17), 2710-2725.
- Zaccone, P., Hall, S. W. (2012).** Helminth Infection and Type 1 Diabetes. *The Review of Diabetic Studies*, 9 (4), 272–286.
- Zochodne, D. W. (2014).** *Diabetes Mellitus BT-Encyclopedia of the Neurological Sciences* (2nd Edition) (992–994). Oxford: Academic Press.