

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

**Studium dráhy pro syntézu mastných
kyselin u klíštěte *Ixodes ricinus***

Bakalářská práce

Aneta Zemanová

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ondřej Hajdušek Ph.D.

České Budějovice 2019

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Ondřeji Hajduškovi, Ph.D. za příležitost vypracovat si svou bakalářskou práci v jeho laboratoři. Děkuji mu za jeho pomoc, ochotu, čas a rady. Dále děkuji RNDr. Radkovi Šimovi, Ph.D. za pomoc a užitečné rady během mé práce.

Ráda bych poděkovala Zuzce Šmejkalové a Gábi Loosové, které semnou vedly veškeré experimenty a trpělivě mne učily všechny techniky. Také děkuji Terce Pospíšilové a Sazzad Mahmood za jejich pomoc, pracovní podporu a přátelství. Chtěla bych také poděkovat Janu Erhartovi za pomoc při sbírání a chovu klíšťat.

Na závěr velké poděkování patří mé rodině, za jejich porozumění, podporu, důvěru a lásku kterou ve mne vkládají. V neposlední řadě děkuju mým skvělým kamarádům za pomoc a podporu.

Bakalářská diplomová práce

Zemanová A., 2019: Studium dráhy pro syntézu mastných kyselin u klíštěte *Ixodes ricinus*. [Study of the fatty acid synthesis pathway in tick *Ixodes ricinus*. Bc. Theses, in Czech] -36 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

Aim of this work was to study fatty acid synthesis pathway in the tick *Ixodes ricinus*. I have characterized tissues and stage expression profiles of three genes; *acc* (acetyl coenzyme A carboxylase), *fas* (fatty acid synthetase) and *fabp* (fatty acid binding protein) by qRT-PCR. Then expression of these genes was silenced by RNA interference and phenotypes observed during and after feeding in nymphs and adults. The pathway seems to be crucial for the ticks.

Key words: *Ixodes ricinus*, tick, *acc*, *fas*, *fabp*, fatty acid synthesis, RNA interference

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

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. V platném znění souhlasím se zveřejnění své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích 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, 17. 4. 2019

.....

Aneta Zemanová

Obsah

1	ÚVOD A CÍLE PRÁCE	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	1
	2.1 SYSTEMATIKA KLÍŠŤAT.....	1
	2.2 MORFOLOGIE	1
	2.3 ŽIVOTNÍ CYKLUS KLÍŠTĚTE	2
	2.4 MASTNÉ KYSELINY	3
	2.4.1 Syntéza mastných kyselin.....	4
	2.4.2 β -oxidace	4
	2.5 FATTY ACID BINDING PROTEIN (<i>FABP</i>)	5
3	MOLEKULÁRNÍ METODY	5
	3.1 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZCOVÁ REAKCE (PCR)	5
	3.2 KVANTITATIVNÍ PCR (qRT PCR)	6
	3.3 RNA INTERFERENCE	6
4	METODY	8
	4.1 NAVRŽENÍ PRIMERŮ.....	8
	4.3 PCR	8
	4.4 KVANTITATIVNÍ POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZCOVÁ REAKCE V REÁLNÉM ČASE (qRT-PCR).....	9
	4.5 RNA INTERFERENCE	10
	4.5.1 Klonování a sekvenování.....	10
	4.4.2 Příprava dvouvláknové RNA	11
	4.4.3 Injikace dsRNA do nymf a dospělých samic klíštěte <i>I. ricinus</i>	13
	4.5 SÁNÍ KLÍŠŤAT NA POKUSNÝCH ZVÍŘATECH	13
	4.6 IZOLACE RNA A PŘÍPRAVA cDNA	13
	4.7 SVLÉKÁNÍ DO DALŠÍHO STÁDIA, KLADENÍ, LÍHNUTÍ.....	14
	4.8 ANALÝZA DAT	14
5	VÝSLEDKY	15
	5.1 IDENTIFIKACE GENU <i>FABP</i>	15
	5.2 EXPRESE <i>ACC</i> , <i>FAS</i> , <i>FABP</i> V JEDNOTLIVÝCH TKÁNÍCH A STÁDIÍCH KLÍŠTĚTE	16
	5.3 UMLČENÍ <i>FABP</i>	18
	5.4 SYNTÉZA dsRNA	19
	5.5 OVĚŘENÍ UMLČENÍ GENU PRO <i>FABP</i> PO RNAI	19
	5.6 VLIV UMLČENÍ <i>ACC</i> , <i>FAS</i> , <i>FABP</i> NA SÁNÍ A VÝVOJ KLÍŠŤAT	20
	5.6.1 Vliv na váhy klíšťat po dosátí	20
	5.6.2 Vliv na délku sání klíšťat	21
	5.6.3 Vliv na vývoj klíšťat	23
6	DISKUZE	24
7	ZÁVĚŘ	26
8	PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY	27
9	PŘÍLOHA.....	30

1 Úvod a cíle práce

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je významný krev-sající parazit, jejichž nebezpečí tkví ve schopnosti přenášet široké spektrum lidských a zvířecích onemocnění, které jsou způsobeny viry, bakteriemi, houbami či prvoky (Jongenaj & Uilenberg 2004). *Ixodes ricinus* je přenašeč klíšťové encefalitidy, Lymeské boreliózy, anaplazmózy a babésiozy (Fuente, 2008). Je dostupná komerční vakcína pro člověka proti klíšťové encefalitidě, ale pro boreliózu bohužel zatím žádná není (Steere et al., 1998). V České Republice se vyskytuje zejména klíště obecné (*I. ricinus*).

Cíle práce

1. Analýza příslušné literatury.
2. Získání sekvence genů syntézy mastných kyselin klíštěte *Ixodes ricinus* a navrhnutí primerů.
3. Charakterizace genů acetyl koenzym A carboxylase (*acc*), fatty acid synthetase (*fas*) a fatty acid binding protein (*fabp*).
4. Příprava dvouvláknové RNA pro *fabp* za účelem umlčení genu.
5. Sledování fenotypů klíšťat.
6. Pochopení mechanismu syntézy mastných kyselin u klíštěte *I. ricinus*.

2 Literární přehled

2.1 Systematika klíšťat

Kmen: členovci (Arthropoda)

Podkmen: klepítkatci (Chelicerata)

Třída: pavoukovci (Arachnida)

Řád: roztoči (Acari)

Podřád: klíšťata (Ixodida)

Čeleď: klíšťákovití (Ixodidae)

Rod a druh: klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

2.2 Morfologie

Na těle klíštěte lze rozlišit dvě části (Sonenshine & Roe 2014). Hlavová část (tzv. capitulum) a samotné tělo neboli idiosoma. Na hlavové části se nachází makadla, klepítka a hypostom. Na hypostomu se nacházejí zpětné háčky, které klíšťatům slouží

k uchycení se v kůži hostitele během sání (Volf & Horák, 2007). Idiosoma nese pohybové končetiny. Dospělci a nymfy mají 4 páry, larvy 3 páry končetin. Díky Hallerovu orgánu, který se nachází na prvním páru nohou, si klíště najde svého hostitele, rozpozná jeho pach a zvýšenou koncentraci CO₂. Hřbetní strana těla dospělého klíšete je chráněna tvrdým chitinovým štítkem (Volf & Votýpka, 2007). Samci mají tento štítek po celé hřbetní části. Dospělé samice, nymf a larvy mají štítek jen do poloviny těla a zbytek tvoří elastická kutikula, která umožňuje mnohonásobné zvětšení objemu těla, ke kterému dochází při sání krve (Roberts & Janovy, 2000).

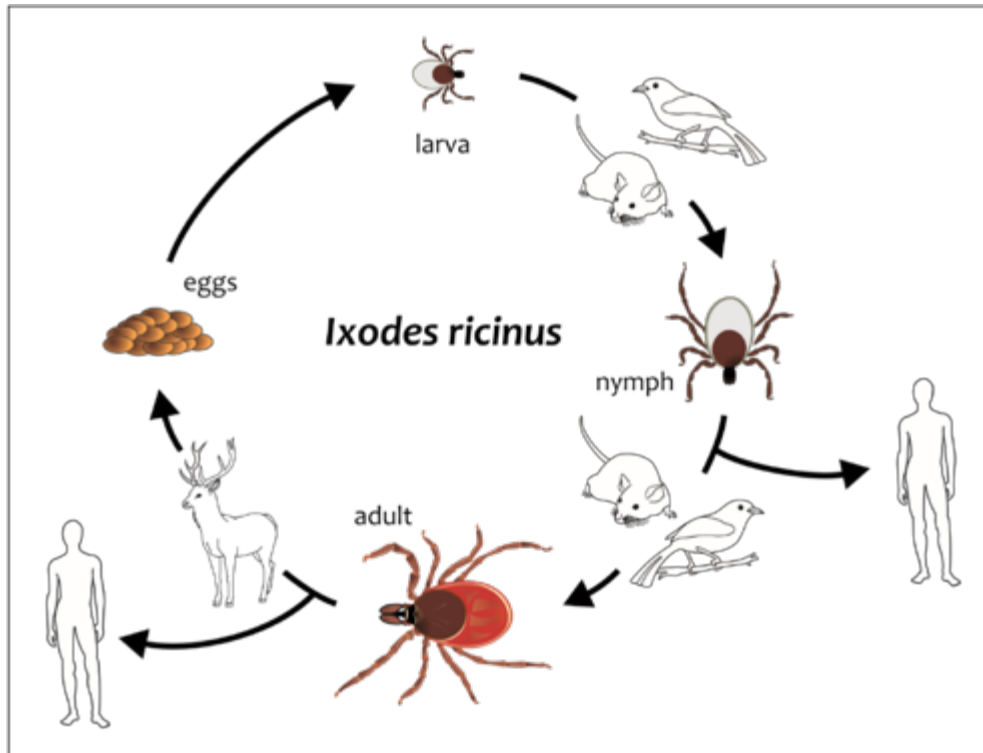
2.3 Životní cyklus klíšete

Vývoj klíšete obecného (*I. ricinus*) prochází čtyřmi vývojovými stádii – vajíčko, larva, nymfa, dospělec, které přehledně popisuje ve své knize např. Bellmann (2003). Životní cyklus nejčastěji trvá jeden až tři roky v závislosti na vnějších podmínkách a druhu (Bowman & Nuttall, 2008).

Ixodidae (tvrdá klíš'ata) mají typicky sklerotizovaný hřbetní štítek (scutum) a procházejí vícehostitelským životním cyklem; tříhostitelský, dvouhostitelský či jednohostitelský (Sonenshine & Roe, 2014a). U většiny druhů převládá tříhostitelský cyklus. Pro úspěšnou přeměnu do dalšího stádia se klíš'ata potřebují jednou nasát krve, a to v každém stádiu a dále se svlékají do dalšího stádia (Balashov, 1972). Po nasátí velkého množství krve samice nakladou tisíce vajíček. Sání každého stádia trvá několik dní a rozdělujeme je na fáze: přípravná, pomalá a rychlá fáze sání; rychlá fáze je u samic podmíněna předchozím oplozením. Celý životní cyklus trvá až tři roky. Samci většiny druhů nesají krev vůbec nebo pouze v malém množství, které je potřebné pro spermatogenezi. Následně se mohou pářit se samicemi. Oplození samic probíhá pouze jednou a je velice důležité pro úspěšnost dosátí a následné kladení vajíček po opuštění hostitele. Klade několik tisíc vajíček v jedné snůšce a poté umírá. Většina těchto klíš'at žije v lesích a houštinách (Sonenshine, 2014).

Agrasidae (měkká klíš'ata) se vyskytují po celém světě a jejich zástupci obvykle žijí v ptačích hnízdech či v jeskyních netopýrů. (Roberts 1970). Měkkými klíš'aty jsou nazývány kvůli chybějícímu sklerotizovanému hřbetnímu štítku (scutum). Jejich ploché tělo je pokryto kožovitou kutikulou, která kryje capitulum nesoucí ústní ústrojí. Za svůj životní cyklus vystřídají několik hostitelů (Hoogstraal & Aeschlimann, 1982). Sání měkkých klíš'at je rychlé a trvá obvykle v řádech minut či několika hodin (Binnington & Kemp, 1980). Přijímají menší množství krve než tvrdá klíš'ata, ale mohou se nasát vícekrát v jednom vývojovém stádiu (Estrada-Pena, 2015). Samci i samice přijímají

v dospělosti potravu a příliš se od sebe morfologicky neliší (Roberts 1970). V každém stádiu se musí nasát a znovu svléct do dalšího stádia. Samice kladou jen několik stovek vajíček a jsou schopné se během života několikrát znovu nasát a vyklást vajíčka. Celý životní cyklus je poměrně dlouhý. Hostiteli mohou být ektotermní i endotermní živočichové (Sonenshine, 2014).



Obr. 1. Schéma životního cyklus klíštěte *I. ricinus*. Larva saje krev na hostiteli, kterými jsou například ptáci a drobní hlodavci, pouští se a svléká se do dalšího stádia, kterým je nymfa. Následně nenasátá nymfa saje na hosteteli, kterým může být pták, drobný hlodavec nebo i větší obratlovec. Po plném nasátí odpadá z hostitele a svléká se do dalšího stádia a tím je samec nebo samice. Dospělci hledají též hostitele, většinou jsou to větší savci. Pro reprodukci se samice potřebují nasát a spárovat se samcem, poté opouští hostitele následně nakladou tisíce vajíček a umírají (Sonenshine, 2014). Člověk může být náhodným hostitelem ve všech těchto stádiích (Volf & Horák, 2007). Schéma M. Hajdušková (Biographix).

2.4 Mastné kyseliny

Matné kyseliny jsou z biochemického hlediska vyšší monokarboxylové sloučeniny s 4-26 uhlíky, které dělíme podle délky řetězce nebo nasycení. Existují volné mastné kyseliny nebo je nalezneme vázané jako součást biologicky důležitých látek (forma esterů s alkoholy – glycerol, cholesterol, sfingosin) (Tvrzická 2009). U lidí tvoří z 90% zásobní metabolickou formu energie. Mastné kyseliny najdeme v buněčné membráně jako fosfolipidy membrán, glykolipidy v nervové tkáni, eikosanoidy, deriváty eikosa-polyenových mastných kyselin, tedy látky jako leukotrieny, thromboxany nebo

prostaglandiny, jsou to vnitrobuněčné signální molekuly, které ovlivňují svalový stah, bolest, srážení krve nebo například zánět.

2.4.1 Syntéza mastných kyselin

Syntéza mastných kyselin je proces, při němž vznikají mastné kyseliny prodlužováním acetyl koenzymu A. Probíhá jako kondenzace jednotek C_2 , tedy jako obrácená β -oxidace (Voet, Voetová, a Kotyk 1995). Syntéza mastných kyselin probíhá v cytoplasmě. Jelikož acetyl koenzym A není schopen projít z mitochondrie do cytosolu, reaguje s oxalacetátem za vzniku citrátu, který projde do cytosolu. Zde se účinkem lyázy oxiduje na acetyl koenzym A, oxalacetát a malát, který se oxiduje a dekarboxyluje na pyruvát. Dále acetyl koenzym A vstupuje do reakce, kde se karboxyluje na malonyl koenzym A, tato reakce je katalyzována acetyl koenzym A karboxylázou (*acc*). Pro vytvoření řetězce je však potřeba, aby se acetyl koenzym A převedl na acetyl-ACP (acyl carrier protein) pomocí transacylázy na acetyl-ACP. Polypeptid acyl carrier protein obsahuje segmenty fosfopantetinu, který se přesunuje k syntetizujícímu enzymu zvaný syntáza (*fas*). Dále malonyl koenzym A kondenzuje s acetyl-ACP za vzniku acetoacetyl-ACP. Poté se β -oxocyl nejprve hydrogenuje, hydratuje a zase hydrogenuje na acyl kyseliny máselné. Řetězec mastných kyselin se prodlužuje o dva uhlíky z acyl koenzymu A. Aktivovaným donorem dvou uhlíků je malonyl koenzym A, a prodlužování řetězce je poháněno odštěpováním CO_2 . Zdrojem H^+ je $NADPH^+ H^+$, kdy je oxalacetát redukován za účasti $NADH + H^+$ na malát, ten je oxidačně dekarboxylován enzymem $NADP^+$ a vzniká pyruvát, který vstupuje do mitochondrie kde je karboxylován. Přesun mastných kyselin probíhá pomocí proteinu *fabp*, jehož funkci jsem dále studovala u klíštěte *I. ricinus*. Prodlužování řetězce syntézy mastných kyselin končí tvorbou palmitátu (C_{16}) (Voet, Voetová, a Kotyk 1995). Jestliže se má řetězec dále prodlužovat, následují reakce, které probíhají v mitochondriích a v endoplazmatickém retikulu. Syntézu mastných kyselin u obratlovců reguluje citrát, insulin a glukagon. Působí na acetyl koenzym A karboxylázu. Insulin dále ovlivňuje pyruvátdehydrogenázový komplex a tím posiluje přeměnu glukózy na acetyl koenzym A.

2.4.2 β -oxidace

β -oxidace je proces, při kterém dochází k postupné oxidaci mastných kyselin až na acetyl koenzym A, který dále postupuje do Krebsova cyklu (Voet, Voetová, a Kotyk 1995). K oxidaci kyselin dochází na β uhlíku (C_3), proto podle toho vznikl název

β -oxidace. Probíhá v mitochondrii a je zdrojem energie (především pro srdce a játra savců). Proces je zahájen dehydrogenací acetyl koenzymu A za vzniku enoyl koenzymu A s dvojnou vazbou mezi druhým (α) a třetím (β) uhlíkem v pozici trans. Následuje krok hydratace, kdy dochází k adici molekuly vody na dvojnou vazbu enoyl koenzym A za vzniku L-3 hydroxyacyl koenzym A. V další reakci dochází k dehydrogenaci hydroxylové skupiny a β uhlíku na karbonylovou skupinu, za vzniku NADH + H⁺. Vzniká β ketoacyl koenzym A, který je v posledním kroku rozštěpen β – ketoacyl koenzym A thiolázou na acetyl koenzym A a acyl koenzym A kratší o dva uhlíky (Ledvina et al., 2005)

2.5 Fatty acid binding protein (*fabp*)

Fatty acid binding proteins (FABPs) je skupina genů zodpovědná za přenos mastných kyselin a také dalších jiných lipidních látek, jako například retionidy a eikosanoidy. Hlavní úloha všech genů této skupiny je regulace příjmu mastných kyselin a intracelulární transport. Doposud bylo identifikováno 9 různých FABPs s tkáňovou specifickou distribucí; játra, střevo, srdce a svaly, mozek, myelin, varlata, adipocyt (tuková buňka), ileum (kyčelník) (Chmurzyńska 2006). Některé geny z této skupiny jsou též schopny transportovat lipofilní molekuly z vnější buněčné membrány do určitých intracelulárních receptorů. S prvním pokusem přišel Clarke et al., (2004). Byl proveden v savčích tkáních, kde byla nadměrná exprese genu *fabp* a tedy mohla zvýšit transport mastných kyselin.

3 Molekulární metody

Pro studium genů dráhy syntézy mastných kyselin u klíšťat jsem použila tři metody; obecnou PCR, kvantitativní PCR a RNA interferenci. V odstavcích níže jsou metody popsány.

3.1 Polymerázová řetězcová reakce (PCR)

Je to metoda rychlého a snadného namnožení úseku DNA, která je založena na principu replikace nukleových kyselin. Pro správnost namnožení úseku musí být úseky DNA ohraničeny od začátku po konec tzv. primery (krátké oligonukleotidy DNA). Vytvoření mnoha miliónů exaktních kopií DNA umožňuje provést analýzu DNA i z velmi malého vzorku. Pro syntézu nového vlákna se často používá Taq polymeráza a probíhá v přístroji zvaném termocykler. Tento přístroj dokáže během několika sekund změnit teplotu o desítky stupňů Celsia. PCR metoda je složena z několika kroků: 1. Denaturace, při které se DNA po dobu 20-30 sekund zahřívá na 94–98 °C. Dochází při tom k narušení

vodíkových můstků v molekule DNA a rozpletení dvoušroubovice, což v dalším kroku umožní primerům nasednout na jednovláknovou DNA. 2. krok je nasedání primerů, kde se teplota sníží na 50–65 °C a umožní tak nasednutí na specifická místa. 3. krokem je samotná syntéza DNA, v tomto kroku teplota závisí na použité DNA polymeráze. Ve směru od 5' konce ke 3' konci přirůstá vlákno DNA komplementární k původní molekule DNA. Kroky se několikrát cyklicky opakují.

3.2 Kvantitativní PCR (qRT PCR)

qRT PCR je metoda založena na principu klasické PCR, která však umožňuje kvantifikaci sledovaného úseku DNA v reálném čase (Higuchi et al., 1998). Je to základní metoda pro studium genové exprese konkrétního genu v buňkách. Je vždy zaznamenáván každý cyklus PCR ve skutečném čase, na rozdíl od klasické PCR, kde se analyzuje amplifikovaná DNA (výsledný produkt) pomocí elektroforézy v agaróze. qRT PCR je metoda založena na principu fluorescence (Cikos & Koppel 2009), při které se používají fluorescenční reportéry, které se váží specificky nebo nespecificky na amplifikované DNA. Pro každý sledovaný vzorek je vytvořena tzv. amplifikační křivka na základě naměřených fluorescenčních intenzit (Rutledge 2004). Následně je na základě dané prahové hodnoty pro každou amplifikační křivku určen bod tzv. Crossing point. Lineární regresí crossing pointu od standardů je sestavena standardní křivka, která představuje závislost počáteční koncentrace vzorků na intenzitě naměřeného fluorescenčního záření.

3.3 RNA interference

RNA interference (RNAi) je evolučně starý mechanismus, který se vyskytuje u řady eukaryotických i prokaryotických organismů (Tijsterman et al., 2002). Slouží jako ochrana před cizorodým genetickým materiálem a to procesem, kdy interferují nekódující molekuly RNA s cílovými úseky mRNA. RNAi byla popsána v roce 1992, studiem modelového organismu *Caenorhabditis elegans*, kterým se zabývali Fire a Mello (Fire et al., 1998). Po injekci dvouvláknové RNA (dsRNA) do vajíček háďátka, zaznamenali významné utlumení exprese genů či biochemických drah v organismech. Další analýza byla provedena u *Drosophily melanogaster*, která výrazně pomohla k porozumění RNAi dráhy (Elbashir et al., 2001). RNAi se stala důležitým standardním nástrojem pro výzkum a pomocí této metody bylo možné studovat funkce genů klíšťat (Hajdusek et al., 2009).

Injekce dsRNA vede k degradaci přirozené mRNA a následné nedostatečné produkci nebo dokonce k úplné eliminaci kódujících proteinů. RNA interference je spuštěna

přítomností cizí dsRNA, která je v buňce štěpena specifickou endonukleázou Dicer-2, na krátké RNA úseky, kterými mohou být siRNA (short-interfering RNA). Dicer-2 zachycuje a navádí siRNA, které jsou dále uspořádány do umlčovacího komplexu, který se nazývá RISC a tam se stanou aktivními (RNA – induced silencing complex; Hammond et al., 2000). RICS komplex váže protein Argonaute2 a následně štěpí cílovou komplementární mRNA (Carmell et al., 2002). Metoda se provádí *in vivo* injekcí do hemolymfy klíštěte.

4 Metody

4.1 Navržení primerů

Na základě homologie s *fabp* z obratlovců a bezobratlých živočichů jsem našla v cDNA databázích (RefSeq) vytvořených předem v naší laboratoři gen pro *fabp* z klíštěte *I. ricinus*. Genově specifické primery byly navrženy ze získaných sekvencí pro gen *fabp*. Primery pro qRT-PCR (IR 1104 + 1105) byly navrženy tak, aby nasedaly na templát při teplotě 60 °C (Primer 3). Primery pro RNAi (IR 1106 + 1107) byly navrženy s obsahem restričních míst pro enzymy ApaI a XbaI (GGGCCC, TCTAGA), teplota pro nasedání byla nastavena na 55 °C. Primery byly vyrobeny a dodány Generi Biotech.

4.3 PCR

Primery genu *fabp* pro qRT – PCR a RNAi byly otestovány pomocí polymerázové řetězcové reakce (PCR). cDNA z plně nasátých nymf byla použita jako templát. Ostatní primery pro *acc*, *fas* byly navrženy a otestovány předem v naší laboratoři (viz. Příloha 1.).

Tab. 1. Složení PCR reakce

PCR	1x
	(μ l)
FastStart PCR Master (2x)	12,50
F (10mM)	1,00
R (10 mM)	1,00
DNA	4,00
H ₂ O	6,50
Celkem	25

PCR reakce byla provedena v celkovém objemu 25 μ l obsahující FastStart PCR Master (Roche), DNA a primery pro *fabp* (viz. Příloha 1.). Celé složení reakce je uvedeno v tabulce 1. Jako negativní kontrola byla použita dH₂O. Vzorky byly amplifikovány za daných PCR podmínek (Tab. 2.).

Tab. 2. Jednotlivé cykly PCR

Fáze	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94 °C	10 min	
Denaturace	94 °C	30 sec	40 x
Hybridizace	60 °C	30 sec	
Elongace	72 °C	40 sec	
Inkubace	72 °C	7 min	

Po doběhnutí reakce byly vzorky analyzovány na 1% agarózovém gelu a pomocí elektroforézy bylo ověřováno, že PCR proběhla správně. Elektroforéza běžela 25 minut 100 V.

4.4 Kvantitativní polymerázová řetězcová reakce v reálném čase (qRT-PCR)

Před samotnou qRT-PCR, byly testovány primery pomocí PCR. Poté byla tato metoda použita pro stanovení genové exprese v různých tkáních samic *I. ricinus*. (střevo, vaječníky, slinné žlázy, tracheje, Malphighiho trubice, zbytek těla) a také ve vývojových stádiích (larvy, nymfy, dospělci). Jako templát byla využita cDNA ze vzorků již získaných v Laboratoři klíšťaty přenášených onemocnění. Analýza larev, nymf a dospělých samic byla provedena po dosátí. Pro celkovou reakci o objemu 10 µl bylo použito 5 µl SYBR Greenu (Roche), 0,5 µl z každého primeru pro *fabp* (IR 1104 + 1105), 2 µl cDNA a objem byl doplněn sterilní vodou do potřebného množství.

qRT-PCR byla také použita pro ověření umlčení genu *fabp* u plně nasátých nymf. Jako templát byla použita cDNA z plně nasátých nymf. Funkčnost umlčení u genů *acc* a *fas* byla předem získána v naší laboratoři. Na reakci 25 µl bylo použito 5 µl cDNA z celých těl nymf. 12,5 µl SYBR Greenu (Roche), 1 µl od každého primeru pro *fabp* (IR 1104 + 1105) a zbývající objem byl doplněn sterilní vodou. Vzorky byly vždy v triplicátech a relativní exprese *fabp* byla stanovena pomocí referenčního „housekeeping“ genu – elongační faktor (viz. Příloha 1.). Na základě amplifikační křivky a křivky tání, proběhla po skončení reakce kontrola správnosti průběhu reakcí. Relativní exprese *fabp* byla vyhodnocena na základě exprese. Úspěšnost umlčení genu byla vyjádřena procentuální poklesem exprese oproti kontrolní skupině *gfp*. Vše bylo provedeno za teplotních podmínek uvedené v tabulce 3. Pro průběh qRT-PCR a analýzy dat byl použit přístroj Light-cycler 480 (Roche).

Tab. 3. Podmínky použité pro kvantifikaci *gfp* při qRT – PCR

	Teplota	Čas	
Zahájení	95 °C	10 min	
Denaturace	95 °C	15 s	50x
Nasednutí primerů + elongace	60 °C	1 min	

4.5 RNA interference

Tato metoda byla použita pro umlčení genů *gfp*, *acc*, *fas*, *fabp* v nymfách a dospělých samicích *I. ricinus*. Celý postup byl proveden pomocí protokolu, který je zaveden v Laboratoři klíšťaty přenášených onemocnění (Hajdusek et al., 2009).

4.5.1 Klonování a sekvenování

Požadovaná sekvence genu *fabp* byla namnožena metodou PCR, při podmínkách 40 cyklů a 55 °C. Bylo postupováno podle přiloženého návodu a pro namnožení byla použita Taq Purple polymeráza (Top Bio). Jako templát pro tento postup byla použita cDNA z plně nasátých nymf s RNAi primery (IR 1106 + 1107) obsahující restrikční místa pro enzymy ApaI a XbaI. Namnožený úsek cDNA byl vyříznut z agarózového gelu a purifikován pomocí NucleoSpin – Gel and PCR clean-up kitu (Macherey – Nagel). PCR produkt a plazmid pll10 byly štěpeny restrikčními enzymy ApaI a XbaI (Thermo Scientific, Fast Digest ApaI / XbaI) po dobu 2 hodin při 37 °C v reakci uvedené v tabulce 4.

Tab. 4. Složení restrikční reakce pro plazmid pll10 a PCR produkt.

Složka	Plazmid (μl)	PCR produkt (μl)
Pufr TANGO (10x)	3	3
ApaI	1	1
XbaI	1	1
DNA	3	20
H ₂ O	22	5

Plazmid a PCR produkt byly dále purifikovány. (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit, Macherey – Nagel). Vyčištěný PCR produkt a plazmid byly ligovány po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě, následně přes noc při 4 °C. Složení ligační reakce je uvedena v tabulce 5.

Tab. 5. Složení ligační reakce.

Komponenta	Množství (μl)
Pufř 2x (pGEM T-easy kit)	2,5
Štěpený plazmid pll10	1,0
Štěpený PCR produkt	1,0
T4 ligáza (pGEM T-easy kit)	0,5

Poté byla provedena transformace plazmidu do bakterií *E. coli*. 50 μl One Shot TOP10 (Invitrogen – Life Technologies) chemokompetentních buněk *E. coli* bylo smícháno s 5 μl plazmidu, který obsahoval vložený gen a směs byla 30 minut na ledu. Dále byl proveden teplotní šok při 42 °C a po 1 minutě byla směs ihned zchlazena na ledu. Transformované bakterie byly vysety na LB-agarové plotny s ampicilinem a kultivovány přes noc (37 °C). Pomocí PCR s genově specifickými primery pro gen *fabp* (IR 1106 + 1107) byl proveden výběr pozitivních klonů, které se dále inkubovaly ve 100ml LB média přes noc. MidiPrep byl připraven z vybrané kolonie a plazmid byl izolován za použití Midiprep kitu (Macherey-Nagel). Přítomnost *fabp* sekvence byla potvrzena sekvenováním (SEQme).

4.4.2 Příprava dvouvláknové RNA

Nejprve byly izolované plazmidy jednotlivě štěpeny enzymy *ApaI* a *XbaI*. Reakce je uvedena v tabulce 6 a probíhala po dobu 2 hodin ve 37 °C.

Tab. 6. Složení restrikční reakce.

Složka	Množství (μl)
30 μl plazmidu	10
pufř TANGO 10x	5
Enzym (<i>ApaI</i> , <i>XbaI</i>)	6
H ₂ O	29

Linearizované plazmidy byly purifikovány následujícím způsobem:

Plazmidy byly inkubovány s proteinázou K (25 μ l) a 10% SDS (3,75 μ l) při teplotě 50 $^{\circ}$ C po dobu 30 minut. Extrakce plazmidů dále proběhla přidáním 80 μ l fenol-chloroformu (Lach – Ner), stočením v centrifuze na maximální otáčky po dobu 5 minut a přidáním 80 μ l chloroformu do odebrané vodné fáze. Dále byla směs opět stočena v centrifuze a poté proběhlo vysrážení plazmidů přidáním 56 μ l izopropanolu do odebrané vodné fáze. Směs byla inkubována 15 minut při -20 $^{\circ}$ C a poté stočena v centrifuze při 4 $^{\circ}$ C po dobu 30 minut. Vysrážený pelet byl promyt etanolem (80%) a rozpuštěn v DEPC vodě (voda ošetřená diethyl pyrokarbonátem).

Syntéza jednovláknových RNA (ssRNA) byla provedena pomocí kitu MEGAscript™ T7 Transcription kit (Ambion) podle příloženého návodu. Reakci znázorňuje tabulka 7. Směs byla inkubována přes noc při 37 $^{\circ}$ C.

Tab. 7. Složení reakce pro syntézu ssRNA

Složka	Množství (μ l)
NTPs	8
Pufr (10x TF Reaction Pufr)	2
linearizovaný plazmid	1
T7 enzym mix	2
H ₂ O	7

ssRNA byly purifikovány následujícím postupem:

Do směsi byl přidán 1 μ l DNAázy (MEGAscript™ T7) a byla poté inkubována 15 minut při 37 $^{\circ}$ C. Dále se přidalo 115 μ l amonium acetátu. Přidáním 150 μ l fenol-chloroformu proběhlo vyčištění a následovalo stočení v centrifuze po dobu 5 minut na maximální otáčky (13 000 RPM). Do vodné fáze bylo přidáno 150 μ l izopropanolu (Lach – Ner) za účelem vysrážení ssRNA. Dále proběhla inkubace směsi po dobu 15 minut v -20 $^{\circ}$ C a poté stočení v centrifuze při 4 $^{\circ}$ C po dobu 30 minut. Vysrážený pelet byl vysušen při pokojové teplotě, dále rozpuštěn v DEPC vodě. Nakonec byly vzorky naředěny na finální koncentraci 3 μ g/ μ l.

Hybridizace odpovídajících komplementárních ssRNA byla provedena v poměru 1:1 přes noc v horké lázni s postupně klesající teplotou (95 $^{\circ}$ C klesající na 20 $^{\circ}$ C). Byla změřena koncentrace a naředěna na finální koncentraci 3 μ g/ μ l. Kvalita a velikost byla kontrolována na 1% agarózovém gelu. Kontrolní gen pro zelený fluorescenční protein (*gfp*), acetyl-koenzym A carboxylase (*acc*) a fatty acid synthetase (*fas*) dsRNA byly

vytvořeny stejnou metodou Laboratoří klíšťaty přenášených onemocnění. dsRNA byly uskladněny v -80 °C.

4.4.3 Injikace dsRNA do nymf a dospělých samic klíštěte *I. ricinus*

Pro umlčení každého genu (*gfp*, *acc*, *fas*, *fabp*) bylo napíchnuto do hemolymfy nenasátých nymf (70/gen) a samic (30/gen) dsRNA o koncentraci 3 µg/µl o množství 32 nl/nymfa a 5x64 nl/samice pomocí mikromanipulátoru se skleněnou mikrokapilárou (Narishige). Následně byla klíšťata skladována v jednotlivých zkumavkách ve vlhkém prostředí při pokojové teplotě po dobu 3 dnů.

4.5 Sání klíšťat na pokusných zvířatech

Pomocí metody vlajkování byly nasbírání v lese u Českých Budějovic dospělé samice a samci klíštěte *I. ricinus*. Nymfy byly získány z chovu Parazitologického ústavu (Biologické centrum, AVČR). Klíšťata injikována dsRNA sála pro účely pokusu na myších/morčatech. Pro sání nymf byly použity myši kmene BALB/c (Velaz). Na vyholenou hřbetní část myši byl umístěn klobouček, do které bylo dáno 20 nymf/myš, které se nechaly nasát do plného nasátí. Pro sání dospělých samic byla použita morčata získaná z chovů Parazitologického ústavu (Biologické centrum, AVČR). Na laboratorních morčatech sály dospělé samice v počtu 25 samic/morče. Klíšťata byla z laboratorních zvířat postupně odebírána v jejich plně nasátém stavu. 3-5 den u myši, u morčat 5-8 den. Následně byla klíšťata jednotlivě vážena a poté uskladněna při pokojové teplotě ve vlhkém prostředí.

4.6 Izolace RNA a příprava cDNA

Izolace RNA z plně nasátých nymf probíhala podle stanoveného protokolu laboratorního kitu NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel). RNA byla ověřena v 1% agarózovém gelu a na spektrofotometru NanoDrop™ 1000 (NanoDrop, USA) byla změřena její koncentrace. Dle instrukcí výrobce byla RNA převedena reverzní transkripcí do cDNA s použitím oligo-dT primerů (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche). cDNA byla nakonec 10x naředěna sterilní vodou a uskladněna při teplotě -20 °C.

4.7 Svlékání do dalšího stádia, kladení, líhnutí

Jednotlivá klíšťata byla dána do zkumavek, skladována ve vlhku a pokojové teplotě po dobu 2 měsíců. Klíšťata odebraná z myši jsme nechali svléknout do dospělce a pozorovali jsme jejich fenotyp. Klíšťata odebraná z morčat jsme nechali jednotlivě ve zkumavkách a pozorovali jejich kladení vajíček a následné líhnutí larev.

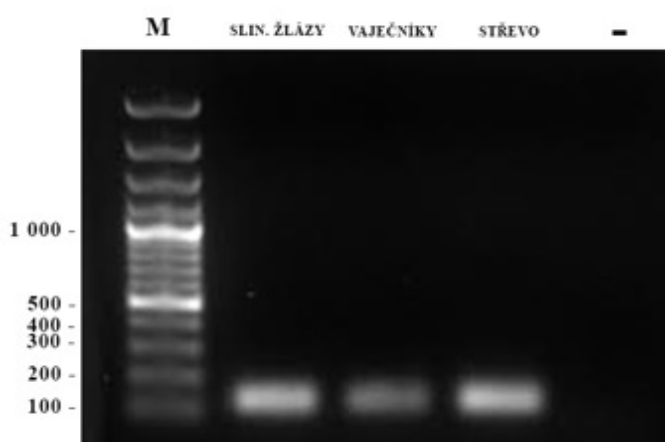
4.8 Analýza dat

Pro statistickou analýzu a tvorbu grafů byl použit program GraphPad Prism 6, ve kterém byla získaná data zpracována. Pro porovnání vzorků byl využit neparametrický test ANOVA, ale za statisticky významnou hodnotu byla považována hodnota $p < 0,05$.

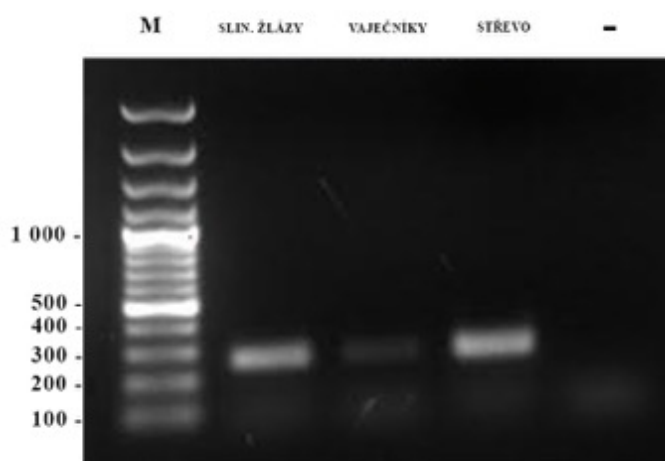
5 Výsledky

5.1 Identifikace genu *fabp*

V našich cDNA databázích (RefSeq) byl nalezen gen *fabp* klíštěte *I. ricinus*. Byly získány kompletní sekvence pro gen *fabp*. cDNA transkript *fabp* obsahuje 1109 bp, délka kódující sekvence (od start kodonu ATG po stop kodon TAG) je 399 bp. Po přepisu genu do proteinové sekvence obsahuje 133 aminokyselin. Sekvence neobsahuje signální peptid a je tudíž predikována lokalizací do cytoplasmy (SignalP). Dále byly navrženy primery pro RNAi a qRT-PCR. Primery po jejich otestování fungovaly (Obr. 2 a 3).



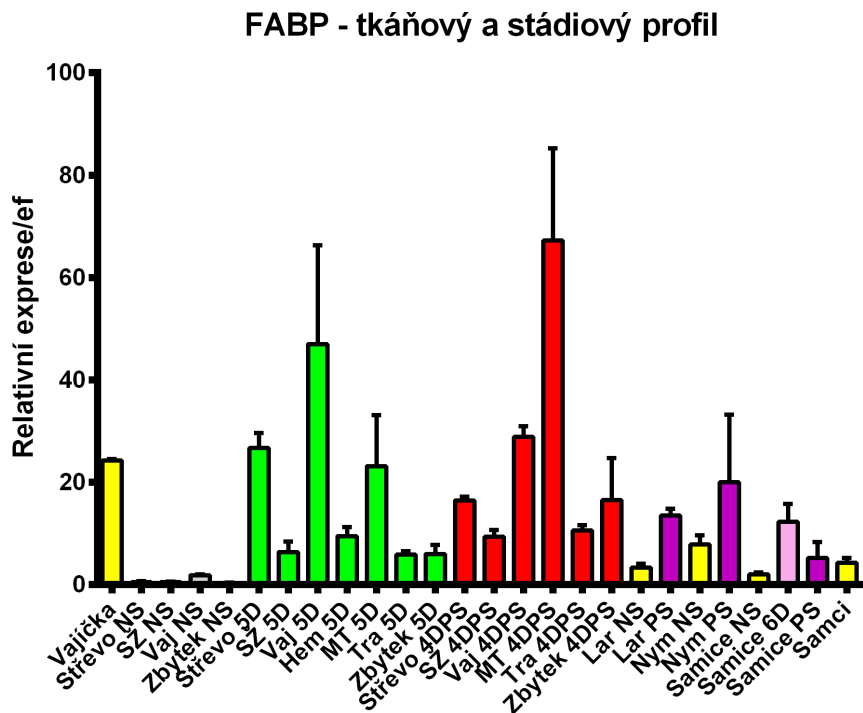
Obr. 2. Testování qRT – PCR primerů pomocí PCR na jednotlivých tkáních. Jako templát byla použita cDNA z plně nasátých nymf. Očekávaná délka produktu byla 126bp. Jako negativní kontrola byla použita dH₂O (-), M = velikostní marker 100bp (Thermo Scientific)



Obr. 3. Testování RNAi primerů pomocí PCR na jednotlivých tkáních. Jako templát byla použita cDNA z plně nasátých nymf. Očekávaná délka produktu byla 242bp. Jako negativní kontrola byla použita dH₂O (-), M = velikostní marker 100bp (Thermo Scientific)

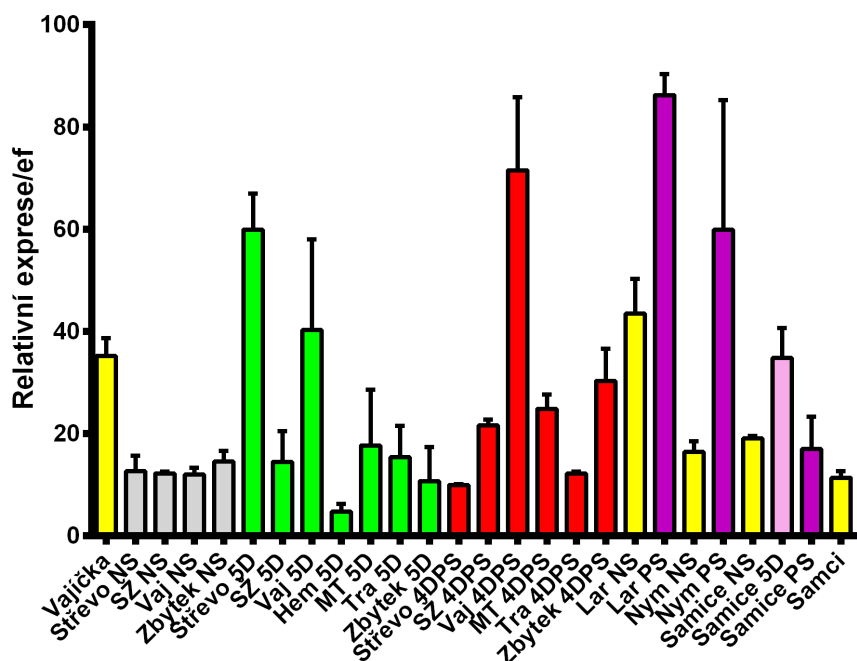
5.2 Expresa *acc*, *fas*, *fabp* v jednotlivých tkáních a stádiích klíštěte

Mezi stádiovými profily a různými tkáněmi byla zaznamenána značná variabilita v expresi genů. Ve všech třech stádiích klíštěte byla regulace genu zvýšena sáním. U nymf je zvýšená regulace ve všech genech až v plně nasátém stavu jak ve střevě, tak ve slinných žlázách. U dospělců je pak exprese detekována hlavně ve střevě a vaječnicích v polo nasátém a v plně nasátém stavu. V ostatních tkáních byla exprese relativně nižší (Obr. 4-6).



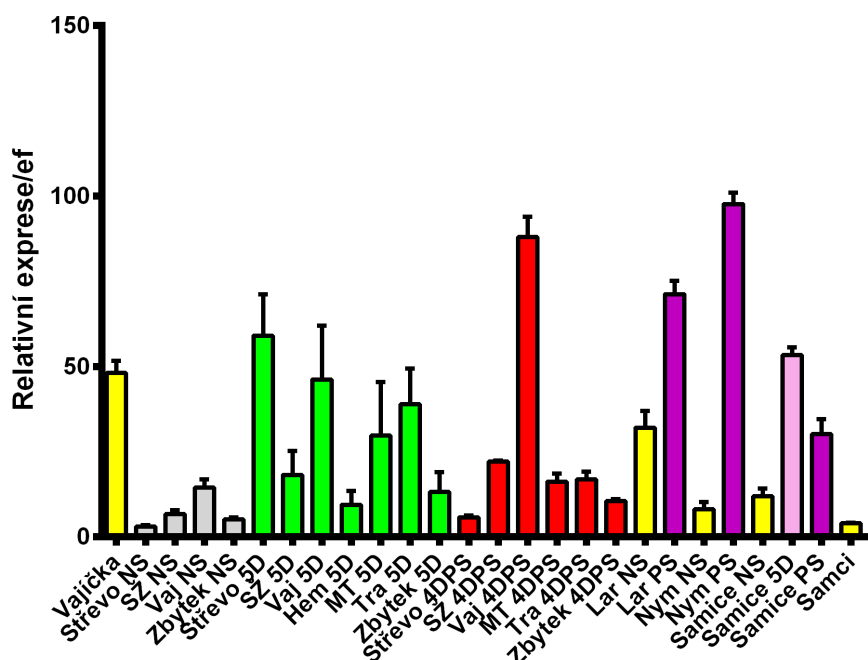
Obr. 4. Relativní exprese *fabp* v jednotlivých klíštěcích tkáních samic a ve stádiových profilech. (SZ = slinné žlázy, Vaj = vaječnice, MT = Malpighiho trubice, Tra = tracheje; 5D = 5 dní sání, 4DPS = 4 dny po plném nasátí, NS = nenasáté, PS = plně nasáté, 6D = polonasáté). Jako 100% byl nastaven vzorek s nejvyšší expresí (relativní exprese).

ACC - tkáňový a stádiový profil



Obr. 5. Relativní exprese *acc* v jednotlivých klíčcích tkáních samic a ve stádiových profilech. (SZ = slinné žlázy, Vaj = vaječníky, MT = Malphigiho trubice, Tra = tracheje; 5D = 5 dní sání, 4DPS = 4 dny po plném nasátí, NS = nenasáté, PS = plně nasáté). Jako 100% byl nastaven vzorek s nejvyšší expresí (relativní exprese).

FAS - tkáňový a stádiový profil

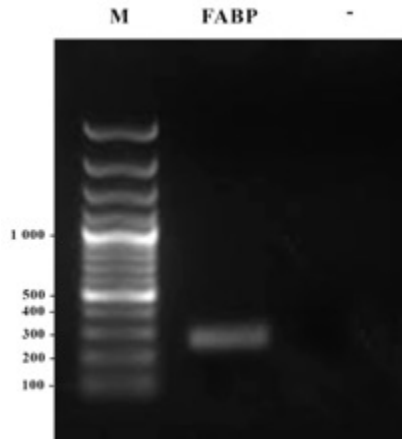


Obr. 6. Relativní exprese *fas* v jednotlivých klíčcích tkáních samic a ve stádiových profilech. (SZ = slinné žlázy, Vaj = vaječníky, MT = Malphigiho trubice, Tra = tracheje; 5D = 5 dní sání, 4DPS = 4 dny po plném nasátí, NS = nenasáté, PS = plně nasáté). Jako 100% byl nastaven vzorek s nejvyšší expresí (relativní exprese).

5.3 Umlčení *fabp*

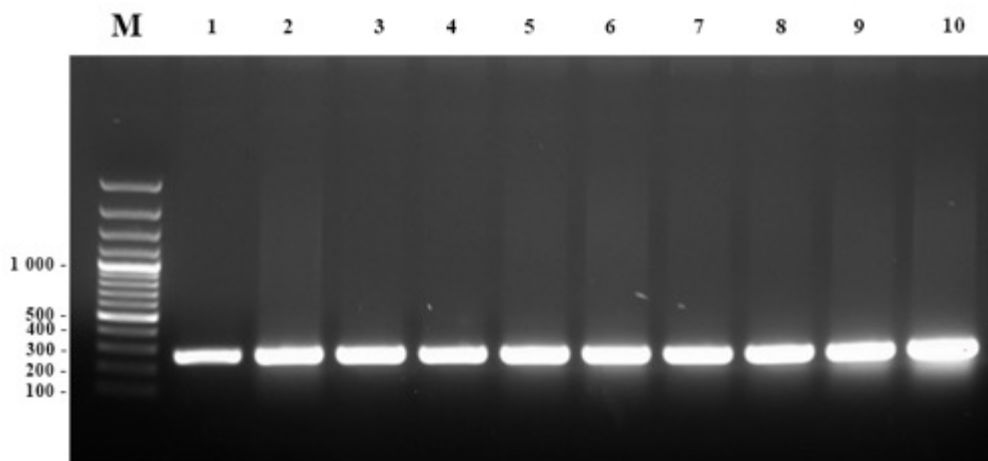
Klonování a sekvenování

Požadovaná část genu *fabp* (délka 242 bp) byla namnožena pomocí PCR a separována v agarózovém gelu (obr. 7.)



Obr. 7. Namnožené úseky *fabp* a jeho separace v agarózovém gelu (M = velikostní marker 100 bp (Thermo Scientific), FABP = experimentální gen *fabp* (242 bp), - = negativní kontrola).

Dále byl úsek DNA vyříznut z agarózového gelu a purifikován pomocí NucleSpin-Gel a PCR clean-up kitu (Macherey-Nagel). PCR produkt a plazmid p110 byly štěpeny restrikcí enzymy *Apa*I a *Xba*I. Dále byl PCR produkt zaligován do rozštěpeného plasmidu a zatransformován do kompetentních buněk.

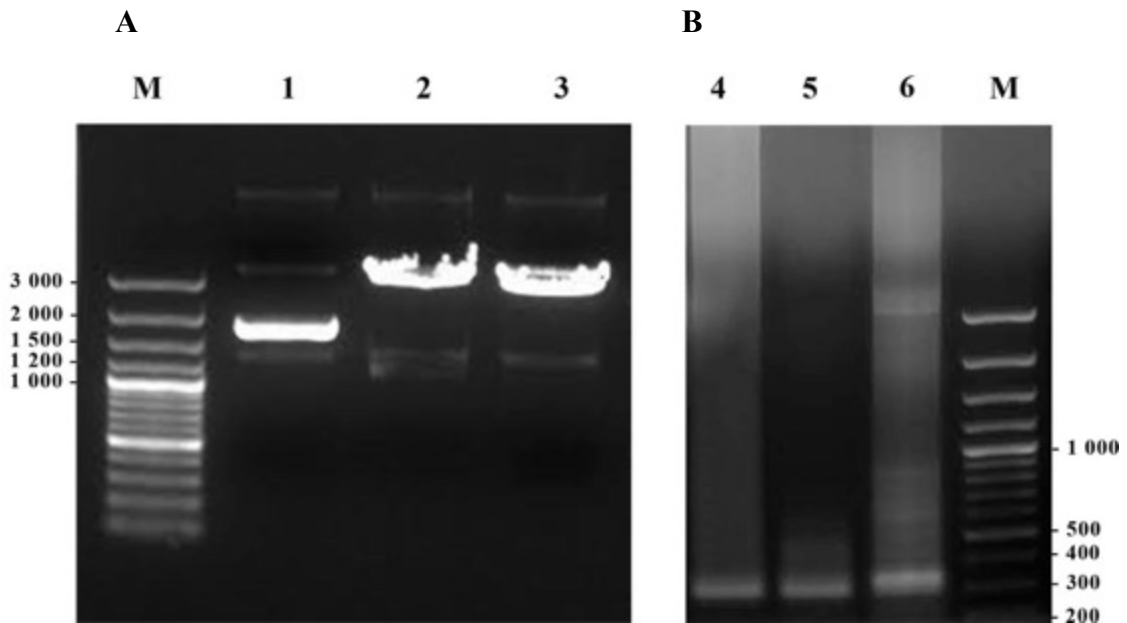


Obr. 8. Elektroforetická separace plasmidové DNA u testovaných kolonií (1-10 = testované kolonie - 242 bp, M = velikostní marker 100 bp (Thermo Scientific)).

5.4 Syntéza dsRNA

Plazmidová DNA pozitivních kolonií (Obr. 8.) byla sekvenována (SEQme) a po ověření správnosti sekvence byl pro syntézu ssRNA použit produkt z kolonie č. 8. s 99% shodou v nukleotidech s cílovou sekvencí.

Jednotlivé ssRNA byly nasyntetizovány a bylo provedeno spojení komplementárních vláken za vzniku dsRNA, výsledek ukazuje obrázek 9.

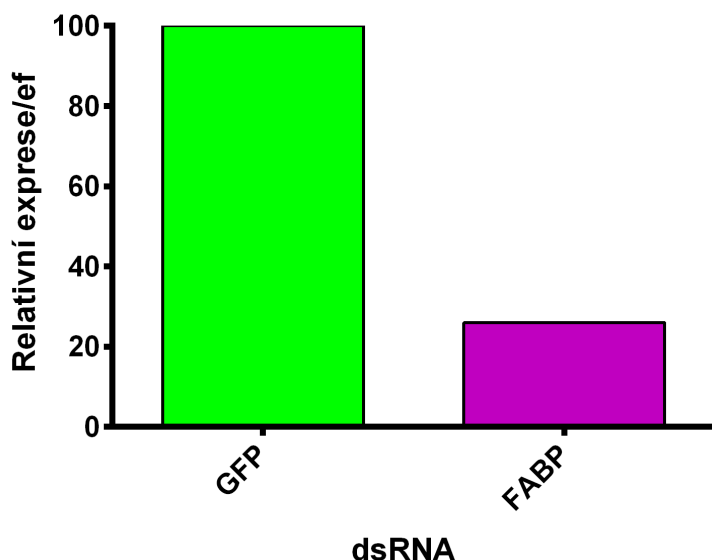


Obr. 9. (A): příprava dsRNA pro umlčení *fabp*: M = velikostní marker 100 bp (Thermo Scientific, 1 – neštěpený (kruhový) plazmid, 2 – plazmid štěpený enzymem Apal, 3 – plazmid štěpený enzymem XbaI. (B): 4 – ssRNA z plazmidu štěpeného enzymem Apal, 5 – ssRNA z plazmidu štěpeného enzymem XbaI, 6 – dsRNA.

5.5 Ověření umlčení genu pro *fabp* po RNAi

Vyizolovaná RNA z plně nasátých nymf byla přepsána do cDNA. Pomocí metody kvantitativní PCR byla zjištěna exprese, která u genu *fabp* v plně nasátých nymfách byla výrazně snížena oproti kontrolnímu genu *gfp* (procentuální pokles oproti kontrole: *fabp* o 74%). Obrázek 10. znázorňuje úspěšné umlčení genu a tedy provedená RNAi fungovala.

Ověření umlčení genu



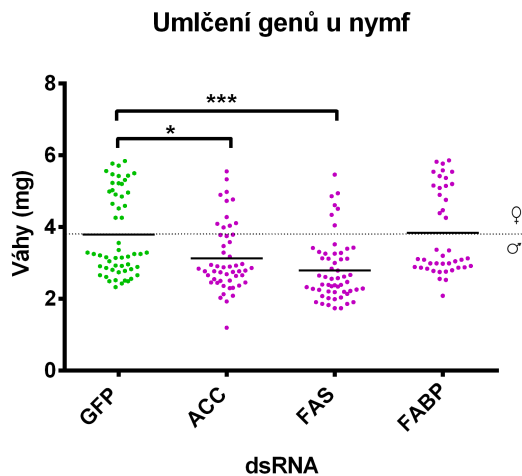
Obr. 10. Ověření umlčení genu *fabp* pomocí metody qRT – PCR. V grafu je znázorněn pokles hladiny exprese *fabp*, který je porovnáván s kontrolním genem *gfp* u plně nasátých nymf. *Ef* = elongační faktor (viz Příloha 1.).

5.6 Vliv umlčení *acc*, *fas*, *fabp* na sání a vývoj klíšťat

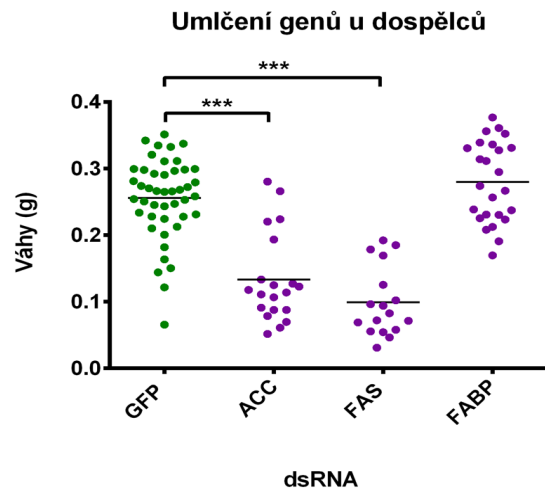
5.6.1 Vliv na váhy klíšťat po dosátí

Byl sledován vliv umlčení genů na váhu po plném nasátí u nymf a dospělých samic *I. ricinus*. Průměrná váha nymf u genu *gfp* dosahovala 3,79 mg; *acc* = 3,18 mg; *fas* = 2,81mg; *fabp* = 3,70 mg. Byl pozorován statisticky významný rozdíl u velikosti vah nymf. *gfp* a *fabp* se pohybovaly v průměru 3,70 mg, kdežto *acc* a *fas* měly váhy signifikantně snížené. RNA interference měla tedy vliv na váhy s umlčenými geny *acc* a *fas*. Průměrná váha pozorovaných skupin u samic byla u genu *gfp* = 0,25 g; *acc* = 0,13 g; *fas* = 0,08 g; *fabp* = 0,28 g. Váhy testovaných samic se statisticky lišily od průměrné váhy kontrolních samic (*gfp*), RNAi tedy měla vliv na váhový pokles plně nasátých samic u genů *acc* a *fas*.

A



B



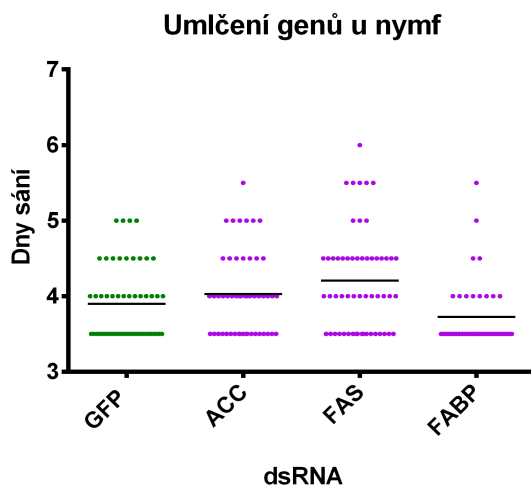
Obr. 11. Vliv umlčení genů pomocí RNAi na váhu nasátých klíšťat. V grafu (A) jsou znázorněny váhy nymf, (B) znázorňuje váhy dospělých samic *I. ricinus* u kontrolní skupiny *gfp* a genů *acc*, *fas*, *fabp*. Vodorovná čára mezi jednotlivými body v grafu (A) znázorňuje průměrnou váhu klíšťat v *gfp* kontrolní skupině a odděluje tak samice od samic. Každý bod znázorňuje jedno klíště. Hvězdičky v grafu znázorňuje statistický rozdíl mezi skupinami.

5.6.2 Vliv na délku sání klíšťat

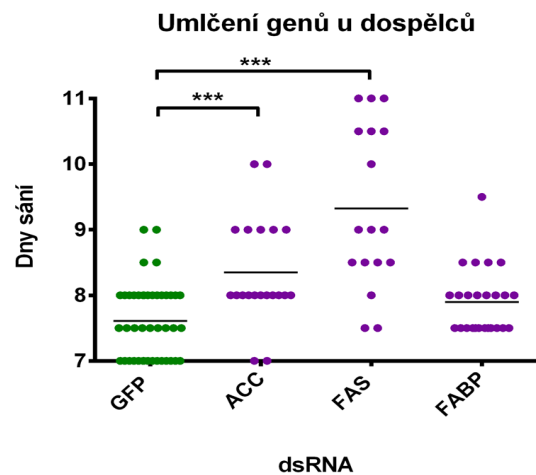
Byl sledován vliv umlčení genů *acc*, *fas*, *fabp* na délku sání jak u nymf, tak dospělých samic *I. ricinus*. Nymfy sály mezi 3-6 dny v kontrolní skupině *gfp*, u ostatních genů u nymf se délka sání taktéž pohybovala mezi 3-6. Průměrná délka sání se nelišila mezi experimentálními a kontrolními skupinami nymf ($p > 0,05$).

Kdežto statisticky významný rozdíl byl pozorován u dospělých samic v délce sání. Délka sání dospělých samic se pohybovala mezi 7-10 dny, ale dospělé samice s umlčeným genem *acc* a *fas* sály v průměru od 1 až 2 dny déle než kontrolní skupina (*gfp*), ($p < 0,05$). Dospělé samice s umlčeným *fabp* se od kontrolních klíšťat nelišila ($p > 0,05$). Tedy RNA interference měla vliv na délku sání samic s umlčenými geny *acc* a *fas*.

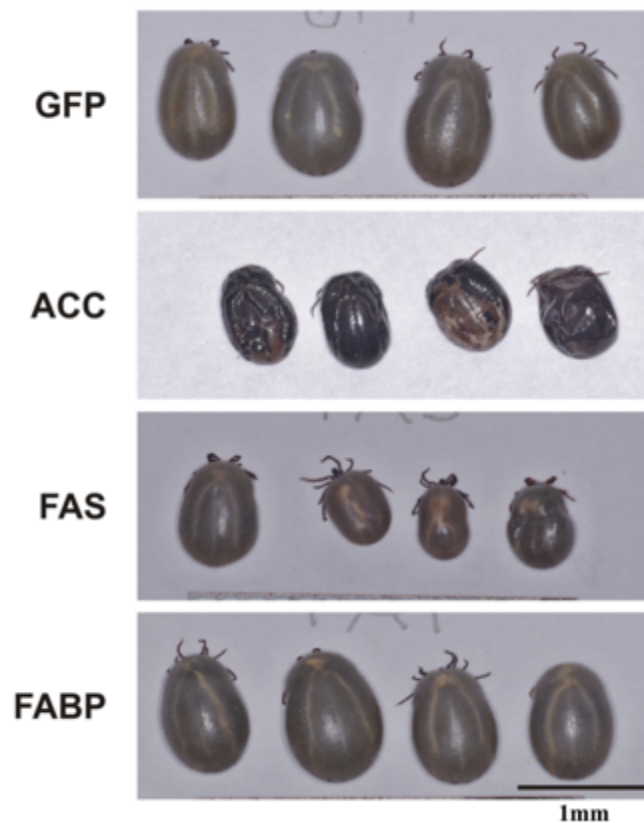
A



B



Obr. 12. Vliv umlčení genů pomocí RNAi na délku sání nasátých klíšťat. V grafu (A) jsou znázorněny dny sání, (B) znázorňuje dny sání dospělých samic *I. ricinus* u kontrolní skupiny *gfp* a genů *acc*, *fas*, *fabp*. Každý bod znázorňuje jedno klíště. Hvězdičky v grafu znázorňují statistický rozdíl mezi skupinami.



Obr. 13. Fenotypy plně nasátých samic po umlčení studovaných genů pomocí RNAi. Fenotyp klíšťat u genu kontrolního genu *gfp* je téměř stejný jako experimentální gen *fabp*. V případě umlčeného genu *acc* došlo ke svrštění kutikuly a váhovému úbytku. *fas* měl snížené váhy po dosátí.

5.6.3 Vliv na vývoj klíšťat

Nymfy se začaly svlékat čtvrtý týden po plném nasátí do dalšího stádia a to dospělce (tzv. ekdyse). V *gfp* (kontrolní skupina) se úspěšně svlékly téměř všechny nymfy viz. Tab. 8. A, nejmenší úspěšnost svlékání do dospělého stádia ukázaly geny *acc* a *fas*.

U dospělých samic byl sledován vliv genů na kladení snůšek vajíček. Samice s umlčeným *acc* a *fas* vykladly minimální nebo žádné množství snůšek vajíček. Samice s umlčeným *fabp* vykladla téměř stejné množství jako kontrolní samice (*gfp*) (Tab. 8. B)

Tab. 8. Úspěšnost svlékání nymf (A) a kladení samic (B) u kontrolní skupiny (*gfp*) a experimentálních genů (*acc*, *fas*, *fabp*).

A

Gen	<i>gfp</i>	<i>acc</i>	<i>fas</i>	<i>fabp</i>
počet/celkem	35/55	0/51	19/56	42/28
úspěšnost (%)	64	0	34	67

B

Gen	<i>gfp</i>	<i>acc</i>	<i>fas</i>	<i>fabp</i>
počet/celkem	18/22	1/20	3/23	18/24
úspěšnost (%)	82	5	13	75

6 Diskuze

Ixodes ricinus je nejčastěji se vyskytujícím druhem klíštěte v České republice a přenašečem důležitých lidských a zvířecích onemocnění. V mé práci jsem studovala funkci a důležitost pro sání a vývoj klíštěte několika genů zúčastněných v syntéze mastných kyselin. Po umlčení několika genů v této dráze jsem pozorovala značný fenotyp na sání a vývoj klíšťat. Ukázalo se, že tato dráha je pro sající klíšťata klíčová a její inhibice by teoreticky mohla být v budoucnu využita pro vývoj vakcín nebo inhibitorů blokujících vlastní sání klíštěte, také jeho přežívání, množení a v neposlední řadě taky přenos patogenů.

Pro vývoj těchto aplikací je důležité podrobné zmapování členů této dráhy a jejich exprese v jednotlivých tkáních a stádiích klíštěte. Z mé studie, která byla provedena na třech genech dráhy syntézy mastných kyselin vyplývá, že exprese prvních dvou studovaných genů, *acc* a *fas*, je téměř totožná. Geny jsou nejvíce exprimovány ve střevě, vaječnicích a v plně nasátém stavu larev a nymf. Naopak, exprese nového kandidáta této dráhy (*fabp*), který jak jsme doufali, by se mohl účastnit přenosu a sekreci nově vytvořených aminokyselin z buňky, byla trochu odlišná. Tento gen se exprimoval hlavně ve střevě a vaječnicích v nymfálním stádiu.

Na základě těchto pochybností jsme se rozhodli otestovat fenotypy klíšťat po umlčení všech tří genů pomocí metody RNAi. Tato metoda je v naší laboratoři již dobře zavedená. Funguje na principu injekce dsRNA do hemolymfy klíštěte pomocí mikroinjektoru a skleněné kapiláry. Jak je patrné z obrázku 10., který znázorňuje míru exprese umlčeného vs. kontrolního (*gfp*) genu (umlčení *fas* a *acc* bylo ověřeno předem v člene naší laboratoře a dosahovalo úrovně *fas* = 14%, *acc* = 42%), tato metoda je pro studium genů této dráhy plně využitelná. Po umlčení genu pro *acc* a *fas* jsem pozorovala váhu a délku sání klíšťat. Dále svlékání nymf do dospělců a u dospělých samic kladení vajíček s postupným líhnutím viz. Tabulka 8. Fenotypy se značně lišily od kontrolního genu *gfp*, klíšťata hůře sála, nesvlékala se do dalšího stádia, umírala a nekladla vajíčka. Navíc u genu *acc* došlo ke zvráštění kutikuly a následnému usychání klíšťat. Myslím si, že by to mohlo být způsobeno nedostatečnou tukovou vrstvou v kutikule. Jedinci s umlčeným genem *fas* dosahovaly menších vah než kontrolní gen *gfp*. Naopak, obdobně jako u expresních profilů, také zde se fenotyp *fabp* genu lišil od ostatních genů. Jeho umlčení nezpůsobovalo tak značný fenotyp jako u ostatních genů. Klíšťata neměla problém se svlékání ani sáním. Dospělé samice pak bez problému vykladla vajíčka, ze kterých se vylíhly larvy. Jeho fenotyp byl téměř srovnatelný s kontrolním genem *gfp*.

Parvy et al., 2012 studovali *acc* u *Drosophily melanogaster* v tukové tkáni a oenocytech. Nejprve studie provedená na myším *acc*, enzymu ovlivňujícím syntézu tuků, upozornila na hemostatickou úlohu *acc* v játrech a tukové tkáni. Dále využili *Drosophilu melanogaster* pro studium *acc* v tukové tkáni a oenocytech. Hlavní úlohou tukové tkáně *Drosophily melanogaster* je zásobní funkce, zatímco oenocyty jsou navrženy k produkci kutikulárních lipidů. Po RNA interferenci bylo zjištěno, že umlčení *acc* nemá vliv na životaschopnost *Drosophily melanogaster*, ale má vliv na redukci skladování triglyceridu a současně se zvyšuje hromadění glykogenu v těle. Umlčení *acc* v oenocytech způsobuje letalitu. Překvapivě, je tato letalita spojena se selháním vodotěsnosti spirakul.

U *Aedes aegypti* byl studován efekt genů *acc* a *fas* na tvorbu vajíček a trávení krve. Alabaster et al., 2011 ve svém výzkumu nejprve kvantifikovali *acc* a *fas* v krvi, kterou sáli komáři. Dále použili metodu RNA interference za účelem umlčení genů *acc* a *fas*. S použitím aminokyselin, zjistili že po umlčení těchto genů dochází k signifikantní redukci obou genů, což potvrzuje, že tyto geny jsou důležité během sání. Dále zjistili, že redukce *acc* způsobuje špatnou produkci oenocytů, což je spojeno s narušením vrstvy vajíček a *fas* způsoboval zpožděné trávení krve, to naznačuje, že tento mechanismus by mohl koordinovat syntézu mastných kyselin a trávení ve střevě během sání.

Závěrem mé práce lze shrnout, že mnou charakterizovaný gen kódující pravděpodobný protein dráhy pro syntézu tuků, transportér mastných kyselin v cytoplasmě, se značně liší od dobře známých členů této dráhy expresním profilem a fenotypy po jejich umlčení. Lze tedy předpokládat, že tento gen do této dráhy nepatří, popřípadě je zastoupen jinými sekvenčně příbuznými homology. Je také možné, že obrat („turnover“) těchto proteinů v buňce je tak pomalý, že ikdyž pozorujeme pokles exprese tohoto genu po RNA interferenci, protein může být v buňce stále přítomen. Abychom tyto tvrzení vyvrátili, v další práci bychom chtěli nalézt a podobně analyzovat další homology tohoto genu a potvrdit vymizení proteinu po RNAi pomocí western blotu. Věřím, že studium této dráhy u klíštěte *Ixodes ricinus* má velký potenciál a chtěla bych se tomuto tématu i v budoucnu dopodrobna věnovat.

7 Závěř

Byl nalezen gen *fabp* v klířtětí *Ixodes ricinus* a byla zjiřtěna jeho sekvence. Podařilo se připravit dsRNA pro *fabp* za účelem umlčení genu metodou RNA interference. Dále v rámci této práce byla stanovena exprese v tkáních a jednotlivých stádiích klířtěte *I. ricinus* u všech třech genů. Genová exprese byla ve všech skupinách zvýřena sáním. Také se sledoval fenotyp klířtětat po umlčení všech genů, kde značně odlišný byl gen *acc* a *fas* oproti kontrolnímu *gfp*. Ukázalo se, že tato dráha je pro klířtětata klíčová a v budoucnu by se její inhibice mohla využít při vývoji protiklířtětčích přípravků.

8 Přehled použité literatury

1. Alabaster, Amy, Jun Isoe, Guoli Zhou, Ada Lee, Ashleigh Murphy, W. Anthony Day, and Roger. 2011. “Deficiencies In Acetyl-Coa Carboxylase And Fatty Acid Synthase 1 Differentially Affect Eggshell Formation And Blood Meal Digestion In *Aedes Aegypti*”. *Insect Biochemistry And Molecular Biology*. doi: 10.1016/j.ibmb.2011.09.004.
2. Aljamali, M. N., Sauer, J. R., Essenberg, R. C. (2002). RNA interference: Applicability in tick research. *Experimental and Applied Acarology*, 89–96.
3. Balashov, Y. S. (1972). Bloodsucking ticks (Ixodoidea) – vectors of diseases of man and animals. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 8, 161–376.
4. Binnington, K. C., and Kemp, D. H., 1980. Role of tick salivary glands in feeding and disease transmission. *Adv. Parasitol.*, 18, 315–339.
5. Bowman, A.S. & Nuttall P., 2008. *Ticks: Biology, Disease and Control*, Cambridge University Press; 506.
6. Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q., Hannon, G. J. (2002). The Argonaute family: Tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* 16, 2733–2742.
7. Cikos S, Koppel J (2009) Transformation of real-time pcr fluorescence data to target gene quantity. *Analytical Biochemistry* 384: 1–10.
8. Elbashir S.M. et al., 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15(2):188-200.
9. Estrada-Pena, A., 2015. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 34(1), 53–65.
10. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998). „Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*“. *Nature* 391: 806-11
11. Fuente, J. de la., 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience, Volume*(13), 6938.
12. Hajdusek, O., Sojka, D., Kopacek, P., Buresova, V., Franta, Z., Sauman, I. (2009). Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 1033–1038.
13. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293–296.

14. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993) Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio-Technology* 11: 1026–1030.
15. Hoogstraal, H., Aeschlimann, A. (1982). Tick-Host Specificity. *Bull. la Société Entomol. Suisse* 55, 5–32.
16. Chmurzyńska, Agata. 2006. “The Multigene Family Of Fatty Acid-Binding Proteins (Fabps): Function, Structure And Polymorphism”. *Journal Of Applied Genetics*, no. 47: 10.
17. Jongejan, F., Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology* 129, 3–14.
18. Kaufman, W.R., 1989. Tick-host interaction: A synthesis of current concepts. *Parasitology Today*, 5(2), pp.47–56.
19. Koolman, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
20. Ledvina, Miroslav, et al., *Biochemie pro studující medicíny. I. díl. 2. vydání*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 978-80-246-1416-8.
21. Levashina, E. A., Moita, L. F., Blandin, S., Vriend, G., Lagueux, M., Kafatos, F. C. (2001). Conserved role of a complement-like protein in phagocytosis revealed by dsRNA knockout in cultured cells of the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Cell* 104, 709–718.
22. Matouš, Bohuslav, et al. *Základy lékařské chemie a biochemie*. 2010. vydání. Praha: Galen, 2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
23. Meister, G., Tuschli, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
24. Parvy, Jean Philippe, Laura Napal, Thomas Rubin, Mickael Poidevin, Laurent Perrin, Claude Wicker-Thomas, and Jacques Montagne. 2012. “Drosophila Melanogaster Acetyl-Coa-Carboxylase Sustains A Fatty Acid-Dependent Remote Signal To Waterproof The Respiratory System”. *Plos Genetics*, no. 8. doi: 10.1371/journal.pgen.1002925. RNA. *Nature* 431, 343–349.
25. Roberts, L., Janovy, J. (2000). *Foundation of parasitology*, 8th ed. McGraw-Hill, New York.
26. Rutledge RG (2004) Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time pcr with the prospective of developing automated high-throughput applications. *Nucleic Acids Research* 32: e178.
27. Sonenshine, D. (2014). *Biology of ticks*. Oxford University Press, New York.
28. Sonenshine, D.E., Roe, R.M., 2014a. *Biology of Tick, Volume 1*, OUP USA.
29. Sonenshine, D.E., Roe, R.M., 2014b. *Biology of Tick, Volume 2*, OUP USA.

30. Steere, a C., Sikand, V. K., Meurice, F., Parenti, D. L., Fikrig, E., Schoen, R. T., et al. (1998). Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lipoprotein A with adjuvant. Lyme Disease Vaccine Study Group. *N. Engl. J. Med.* 339, 209–215.
31. Tijsterman, M., Ketting, R. F., Plasterk, R. H. A. (2002). The Genetics of RNA Silencing. *Annu. Rev. Genet.* 36, 489–519.
32. Tvrzická, Eva. Mastné kyseliny: 1. Výskyt a biologický význam. *Časopis lékařů českých.* 2009, 148(1), 16-24.
33. Voet, D., Voetová, J. G. (1995). *Biochemie*. 1st ed. John Wiley & Sons, Inc., Praha.
34. Volf, P., Horák, P. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. Triton, Praha/Kroměříž, 306.
35. Waterhouse, P. M., Wang, M. B., Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834–842.

9 Příloha

Příloha 1. Použité primery pro qRT-PCR a RNAi

Název	Popis (ID)	Sekvence	velikost produktu (bp)
<i>fabp</i> - qRT-PCR - F	IR1104	GGTGACAAGCTGGTTCAGAAG	126
<i>fabp</i> - qRT-PCR - R	IR1105	TCGCTGGTACTTGCGAATAG	
<i>fabp</i> - RNAi - F	IR1106	ATGGGCCCCGTCTTCTCGGCAAGTGGAAGC	242
<i>fabp</i> - RNAi - R	IR1107	ATTCTAGACAGCGACTTGACATTGACACC	
<i>fas</i> - qRT-PCR - F	IR1006	AGCGCCTTCTACGACTTCC	139
<i>fas</i> - qRT-PCR - R	IR1007	ACTCGGAGAGGCCGTAGTC	
<i>fas</i> - RNAi - F	IR1008	ATGGGCCCCATCCTAGGTGTGAAGGACC	540
<i>fas</i> - RNAi - R	IR1009	ATTCTAGACCTGCAGCTGCACCGCCAGC	
<i>acc</i> - qRT-PCR - F	IR564	ACCTGTGGGAGAATGACCTG	133
<i>acc</i> - qRT-PCR - R	IR565	AGGCTCTTGATGTGCGAGAT	
<i>acc</i> - RNAi - F	IR566	ATGGGCCCCGCATCCCCGTCGGGGTAGTG	467
<i>acc</i> - RNAi - R	IR567	ATTCTAGACTTCACCAGGTCCTTCTTGC	
<i>elongační faktor</i>	IR524	ACGAGGCTCTGACGGAAG	81
<i>elongační faktor</i>	IR525	CACGACGCAACTCCTTCAC	

Příloha 2. Nukleotidová sekvence *fabp*. Start a stop kodon jsou označeny zeleně, primery pro RNAi jsou označeny žlutě a primery pro qRT-PCR jsou označeny fialově.

```
CGCCATTAAATTGCAAACGCTCTCCAGGTTTTGAGTTGCTCCCACCCTCACT
AGAGCCTCACTAGAGCTTCATAGGATCTTTAGCAGAGCAGAGCCGTATCTC
TACGAGCTTCCGGCGACGACGGCGGATAGCAGCGGCGCGCGCGTTCGACGC
AAAGGGAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAGAAAACGAAAAAGGGAG
CACTTGCCGGCGTCTCCCTCCATTACGCGCCTCGCTCAGTCGTCGTGTTC
CTTCGTTCTTCGCACTACCACCACCCCGAACCACCACCATGGCCTCCGGTC
TTCTCGGCAAGTGGAAGCTCACCGAAAGCGAGAACTTCGACGATTCCTCA
AGGAACTCGGTGTGGGCCTGACGTGGCGGAAGCTGGCCCAGACGTCCAAG
CCCTCGGTGGAGCTCAAGTGCGACGGCGACAAGTGGTCCATCAAGACGTC
GACGCTGCTCAAGACATCGGACGTCTCCTTCACCTTGGGCCAGGAGTTCGA
GGAGGGCAGGATCGACGGTGTCAATGTCAAGTCGCTGTGTACCCTGGACG
GTGACAAGCTGGTTCAGAAGCAGTTTGGTGACAAGGAAGTCACCATTGTC
CGCGAGTTGGACAACGGACAGCTCAAAGTGACTTGCAAGTTGAACGACGT
GGTGGCTATTCGCAAGTACCAGCGAGATGAATAGGCCCCTTCTAGAGAA
GTCTGCATCAAGTCAAGGGAACCCGTCCCTAGGACGCCTTCTGTTCTCTGC
GTGGAGGGGTAGGGTAGGTTGGGGTGGGGGCGCCAAGAGCAGGCGTGGC
CACAAAGGCAACGGCCACAGTGACTCCACTGTTCGGTTCCACATTCATTC
TTAATCTAAAAATAAAAAAAAAAATGTAAAAAATCTTAATCTGCTTTTTTTTT
TCCCAATTTTTGTTTATTTTGTATGTGGGACTTGGACATCTGTGTAGCCCC
ATCCGTGGTTCGTACCTCGTCTTCCCTGCATATTGCCTGCCGTTATTCTTCC
AGTATCTGCGGATAAAGTTTGAACTTTATTTTTATCCTACTGATCCAATAA
AGTTTATATTTTGATACTGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```