

Jak narušit krevní hostinu klíšťat a čmelíků

Krevsající parazitické roztoči představují významnou hrozbu pro lidské zdraví. Najdeme-li unikátní proteiny esenciálních metabolických drah u klíšťat a čmelíků, můžeme testovat nové inhibitory a sledovat jejich akaricidní účinek. Pokud látky pro ně toxické způsobí roztočům velmi rychlou smrt, mohou zabránit i přenosu jejich patogenů.

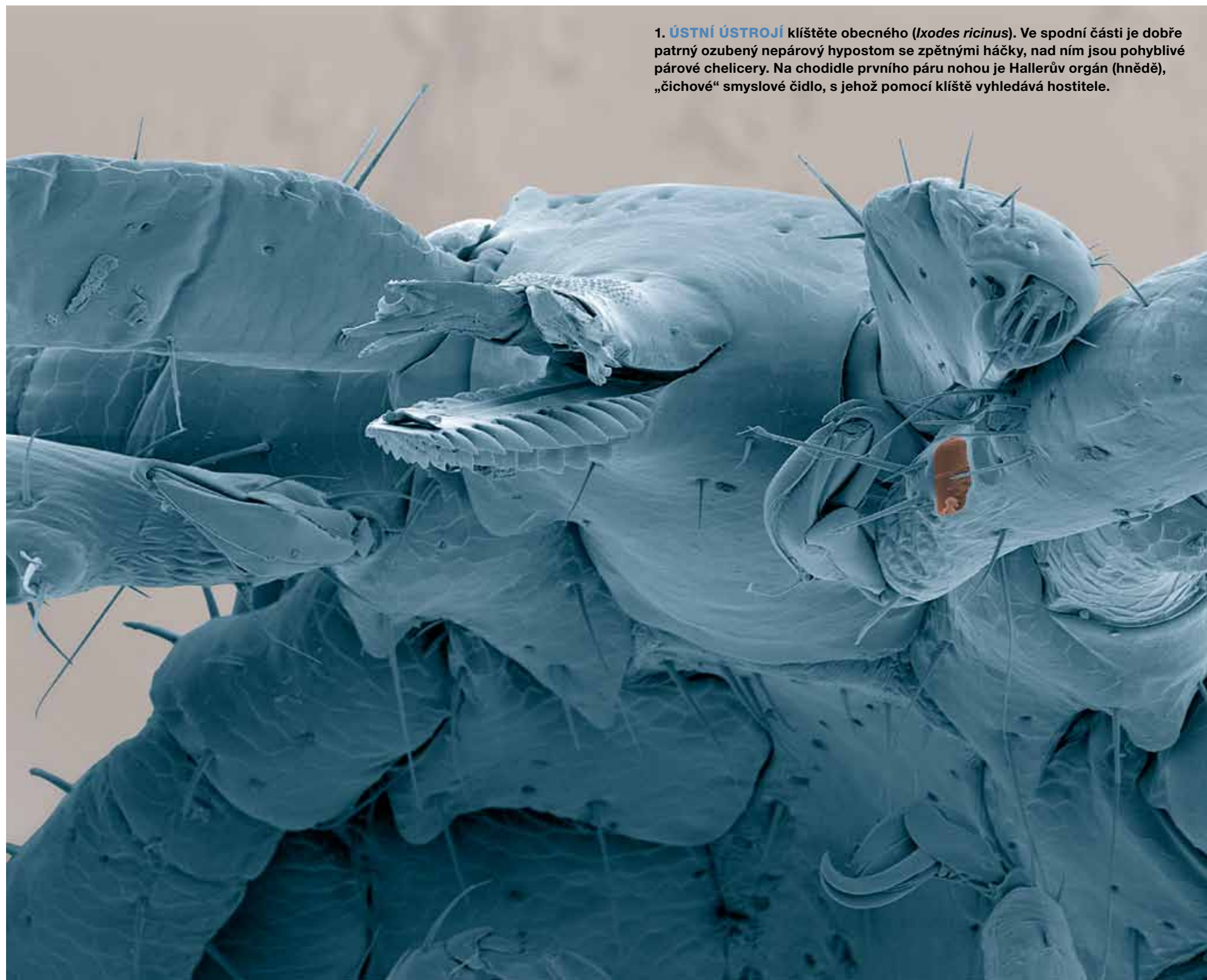
text **MATĚJ KUČERA, JAN PERNER**

PARAZITIČTÍ ROZTOČI, jako jsou klíšťata či čmelíci, se živí výhradně krví hostitelů - plazů, ptáků, ale i hospodářských zvířat či lidí. Z pohledu parazita je krev jako druh potravy velmi dobrá volba, jelikož představuje velmi vydatný zdroj bílkovin, hemu a sérového železa. Samice klíštěte, které jsou navíc schopny během jediného „hltnu“ spořádat až stonásobek své váhy, si tak užívají doslova krevní hostinu. Přisun tak velkého množství stravy bohaté na protein usnadňuje vysokou reprodukci parazitů. Získané živiny využívají dospělé samice klíšťat pro tvorbu vajec, kterých kladou až tisíc. Kombinace obligatorního (výhradního) parazitického způsobu života a vysoké reprodukční schopnosti dělá z těchto parazitů naše skutečné a mocné nepřátele.

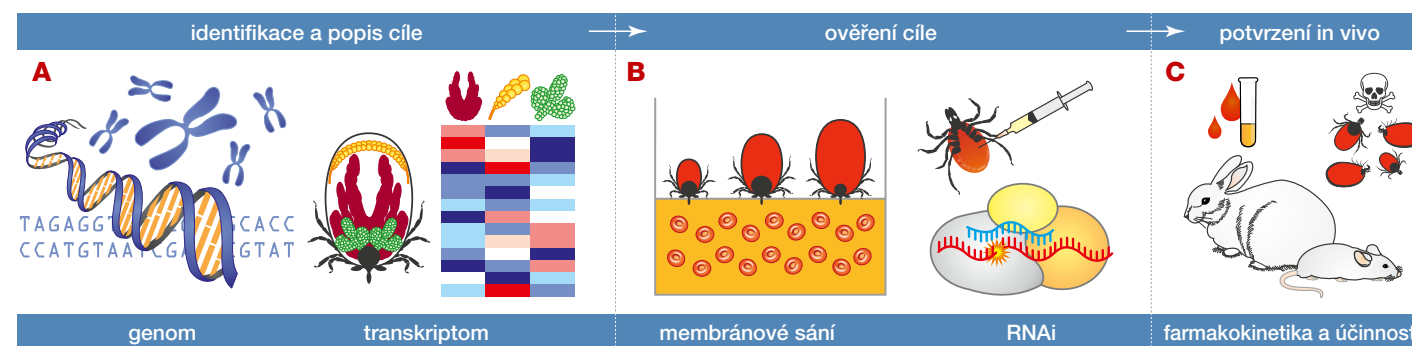
Živení se krví (hematofagie) je spojeno s mnoha evolučními adaptacemi fyziologických a reprodukčních drah. Jaké konkrétní proteiny a jejich metabolické dráhy umožňují parazitickým roztočům samotné nasátí a posléze trávení získaných hostitelských krevních molekul? A které z těchto

drah jsou specifické pouze pro tyto roztoče, takže je nenajdeme u jejich hostitelů? Odpovědi na tyto a další otázky jsou hlavním výzkumným záměrem směřujícím k identifikaci a ověření tzv. molekulárních cílů (obr. 2). Těmi jsou v našem případě proteiny (proteinové receptory či enzymy) citlivé na akaricidní látky - jsou jimi blokovatelné (inhibovatelné). Tato aktivita se projevuje narušením esenciálních metabolických drah a způsobuje smrt roztočů. Pokud akaricid

2. Vpravo dole: OD GENU K AKARICIDU – schematické znázornění vývoje protiklíštěcích látek. **A.** V genomu klíštěte jsme schopni identifikovat vhodný gen kódující kandidátní protein, molekulární cíl (například podle sekvenční odlišnosti roztočích a homologního hostitelského genu). Poté na základě transkriptomových dat z jednotlivých roztočích tkání zjišťujeme expresní profil tohoto genu (tj. v jakém vývojovém stadiu, v jaké tkáni anebo v jakém čase během sání na hostiteli je přítomna mRNA kódující protein). **B.** Pomocí biochemické inhibice nebo genetické metody RNAi (způsobující snížení hladiny mRNA pro kandidátní protein) ověřujeme esenciálnost zvoleného cíle. **C.** Pokud máme ověřený zvolený molekulární cíl a pro něj vybranou nejúčinnější akaricidní látku, můžeme přistoupit k testování in vivo na hostiteli. Během těchto experimentů testujeme stabilitu látky (tzv. farmakokinetika) a její akaricidní účinnost v živém systému.



1. ÚSTNÍ ÚSTROJÍ klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). Ve spodní části je dobře patrný ozubený nepárový hypostom se zpětnými háčky, nad ním jsou pohyblivé párové chelicery. Na chodidle prvního páru nohou je Hallerův orgán (hnědý), „čichové“ smyslové čidlo, s jehož pomocí klíště vyhledává hostitele.



Návrh schématu Jan Perner, zpracování Martina Hajdušková

Shímek David Hartmann, Jan Perner, za Laboratoř elektronové mikroskopie Biologického centra Jiří Vaněček, Marie Vancová



Acariformes	Parasitiformes
ALAS	ALAS
PBGS	PBGS
HMBS	HMBS
UROS	UROS
UROD	UROD
CPOX	CPOX
PPOX	PPOX
FECH	FECH
HO	HO

T. urticae (byložravec) *M. occidentalis* (predátor) *I. scapularis* (krevsajcíc)

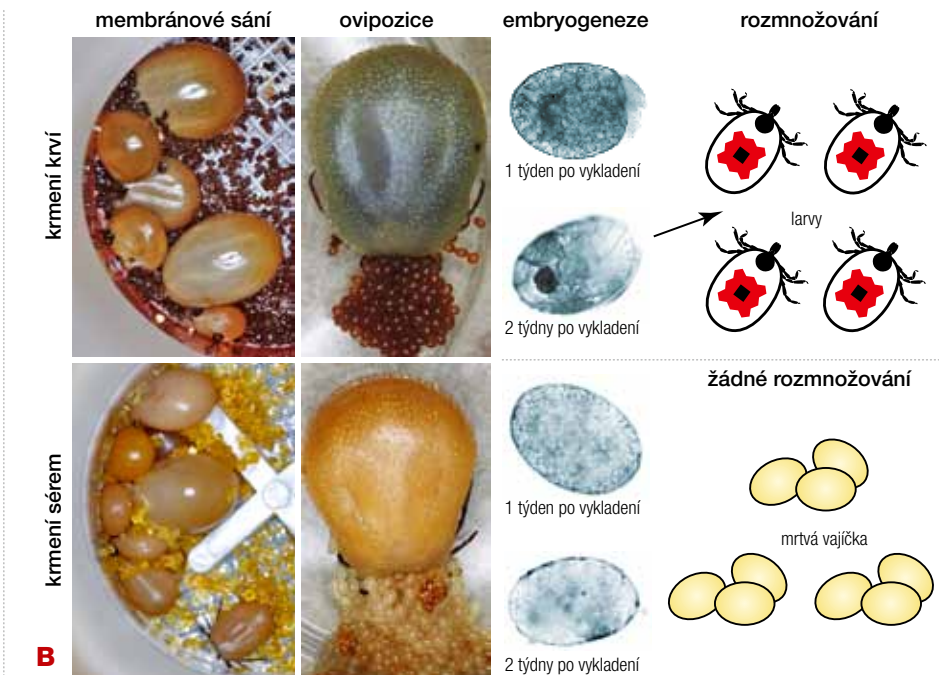
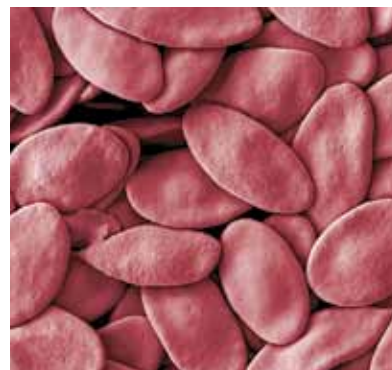
účinkuje velmi rychle, může blokovat i přenos patogenů.

ZISK HEMU Z HOSTITELE

Díky genomickým datům, pořízeným moderními sekvenovacími metodami, začíná být zřejmé, že krevsajcíc roztoči získali během své evoluce hned několik systémových adaptací, jako je například „zefektivnění“ genomu ztrátou nadbytečných anabolických drah nebo naopak nadřazení

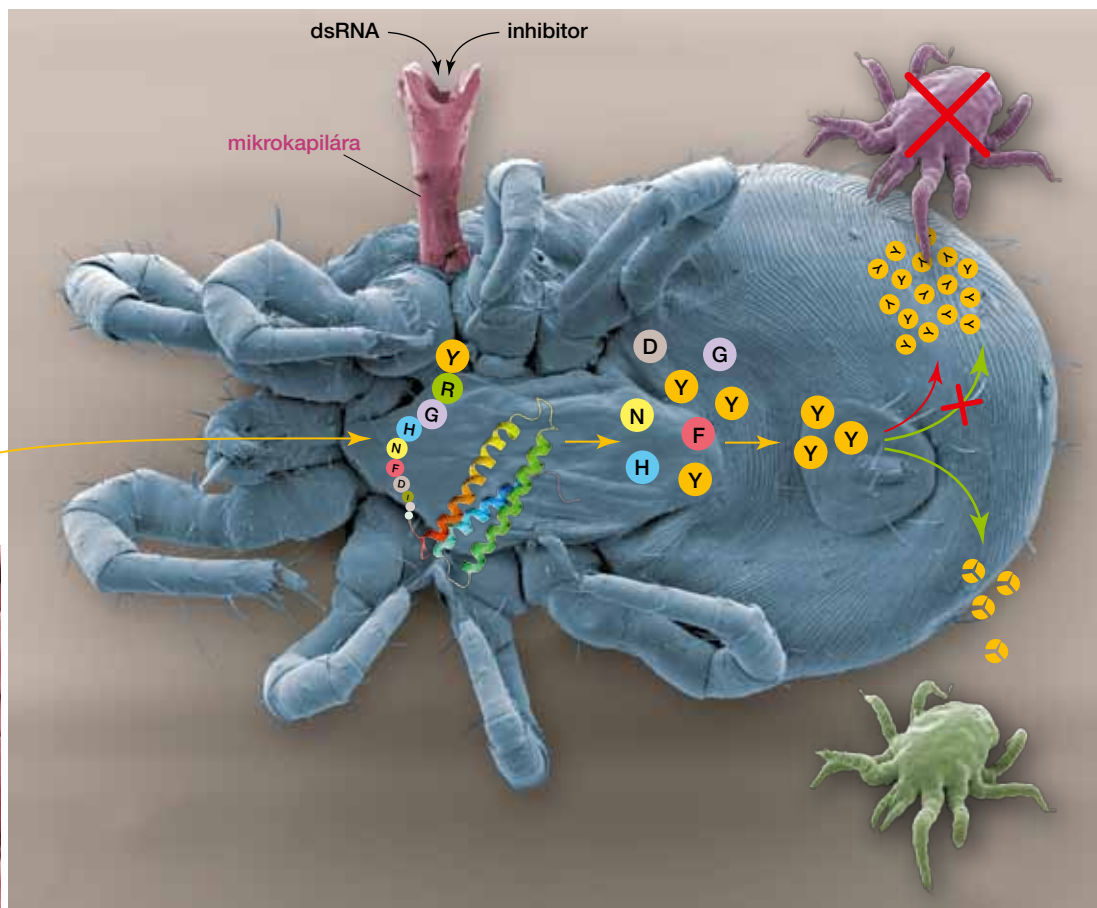
4. HYPERTYROSNÉMIE

u čmelíků indukovaná mikroinjekcí dvouvláknové RNA (dsRNA) nebo inhibitoru. Po aplikaci se zablokuje degradace tyrozinu (Y; zelená šipka). Tyrozinové molekuly pocházející z hostitelských krevních proteinů (např. z hemoglobinu červených krvinek; zde na snímku vlevo ptačí jaderné červené krvinky) se pak hromadí uvnitř čmelíků (červená šipka) až na toxickou úroveň. Čmelíci uhynou do několika dnů.



Návrh schématu Jan Perner, zpracování Martina Hajdušková, snímky Jan Perner

3. CO DĚLÁ KLÍŠTĚ PARAZITEM? Kombinace genomických předpovědí a experimentálního ověření pomocí membránového sání klíšťat na různých krevních frakcích umožňuje nahlédnout do evolučních adaptací klíšťat. **A.** Klíště (*Ixodes scapularis*) ztratilo pět genů kódujících prvních pět enzymů hemové biosyntézy (červené šipky), zatímco u roztočů nesajících krev (*Tetranychus urticae* a *Metaseiulus occidentalis*) jsou tyto geny v jejich genomech zachovány. Ti tedy získávají hem vlastní buněčnou biosyntézou. **B.** Klíšťata experimentálně vystavena nefyziologické situaci – membránovému sání na séru – kladou (ovipozice) hemuprostá vajíčka. V nich kvůli absenci hemu nemohou probíhat základní pochody energetického metabolismu, a nemůže tedy dojít k embryonálnímu vývoji (embryogeneze) a vzniku larvy.



Snímky Matěj Kučera, David Hartmann, Jan Perner, za Laboratoř elektronové mikroskopie Biologického centra Jiří Vaněček, Marie Vancová

Slovníček pojmů

akaricid — malá molekula (často inhibitor), toxická pro roztoče.
transkriptom — soubor RNA transkriptů, který je regulovaný a určující pro danou buňku či tkáň.
fenotypizace — popisování biologických projevů geneticky mutovaných organismů.
mRNA/dsRNA — mRNA je přirozená RNA kódující protein, dsRNA je synteticky připravená RNA, která svojí sekvenční specifitou indukuje degradaci cílové mRNA.
RNAi — RNA interference je vnitrobuněčný mechanismus degradace dvouvláknové RNA (evolučně výhodný zejména jako obrana před virem s genomem RNA). Její biotechnologický či výzkumný potenciál tkví v možnosti sekvenčně specifické degradace mRNA daného genu, a tím utlumení jeho exprese. Vznikají tak dočasně geneticky modulované organismy (v našem případě klíšťata a čmelíci). Podrobněji Vesmír 86, 110, 2007/2 a 91, 668, 2012/11.

metabolických drah souvisejících s degradací (katabolismem) proteinů získaných z hostitele.

Klasickým příkladem „zefektivnění“ parazitického genomu, v tomto případě klíštěcího, je ztráta genetického kódování enzymatické dráhy pro vlastní (endogenní) biosyntézu hemu. U klíšťat je zásobení hemem garantováno přísunem hemoglobinu z červených krvinek hostitele (obligatorní hematofagie). Dráha pro vlastní syntézu hemu se proto stala během evoluce klíšťat nadbytečnou.

Podobnou analogii ve ztrátě biosyntetické dráhy můžeme najít například i u lidí a dalších primátů. Dostatečný příjem kyseliny askorbové (vitaminu C) z potravy u našich prapředků vedl k tomu, že jsme překvali ztrátu funkce genu pro finální enzym vlastní biosyntetické dráhy této kyseliny. I přes ztrátu funkčnosti této dráhy askorbátdependentní enzymatické reakce u lidí a primátů přetrvaly a jejich funkčnost je závislá na příjmu askorbátu z potravy, který se tak stal nezbytným vitamínem (viz také *Komu hrozí kurděje*, Vesmír 80,

497, 2001/9). Příkladem látek vyžadujících askorbát jsou např. enzymy posttranslační modifikace kolagenu.

Obdobně jako askorbát také hem reprezentuje kofaktor nezbytných enzymatických reakcí, zejména buněčného dýchání. Většina živočichů si hem vytváří ve svých buňkách z aminokyselinových a karboxylových kyselin a železa. Klíšťata hem získávají jen paraziticky, ze svého hostitele. Vliv nepřítomnosti hemu v potravě na životaschopnost klíšťat jsme experimentálně ověřili pomocí unikátní metody membránového sání. Díky ní jsme schopni klíšťata krmit nejen krví, ale například jen sérem (krevní frakcí bez červených krvinek, tedy bez hemu). Absence hemu v séru dospělá klíšťata (samice) překvapivě během sání neovlivňuje. Nedostatek této molekuly se nicméně projeví kladením života neschopných vajec. Samice nasáté na séru zkrátka nejsou schopny pokrýt hemové nároky svého potomstva (obr. 3).

Ztrátou schopnosti vlastní syntézy hemu je klíště nejen výjimečné mezi ostatními živočichy, ale samo sebe tím nevratně odkázalo právě k parazitickému, krevsajcícimu způsobu života. Klíštěcí proteinový aparát umožňující získání hostitelského hemoglobinu, zdroje hemu, proteinové transportéry dopravující získaný hem do každé tělesné tkáně a buňky proto představují právě ony selektivní akaricidní cíle proti klíšťatům.

Metoda mikroinjikace

MIKROINJIKACÍ dsRNA nebo inhibitoru jsme schopni ovlivňovat metabolické pochody roztočů jak na úrovni genetické, tak i biochemické (viz také Vesmír 87, 670, 2008/10). Mikroinjektor se skládá z dvou hlavních částí – aplikátoru a velmi tenké skleněné mikrokapiláry, jíž je látka dopravena do těla parazita. Nejčastěji se pro místo vpichu volí tenká oblast pod třetím párem končetin klíšťat i čmelíků, vzácné místo na jinak tvrdých, exoskeletem krytých organismech (obr. 3 a 4). Injektivat se dá testovací látka jen před sáním roztočů na hostiteli nebo po něm. Co když se ale aplikace akaricidu časově míjí s přítomností svého proteinového cíle? Co když je cílený enzym exprimován v klíštěti (parazitovi) až během sání, kdy je vpíchnutý inhibitor už v těle klíštěte jen v malém množství?

Metoda membránového sání klíšťat

TOUTO METODOU jsme schopni testovat látky v reálném čase po celou dobu sání, kdy je látka přítomna přímo v krvi, a eliminovat tak nevýhodu předchozí metody. Systém membránového sání klíšťat (obr. 4) je vystaven na silikonové membráně, která svými vlastnostmi připomíná kůži. Aby byl pro klíště rozdíl mezi přírodním a syntetickým kůží ještě zanedbatelnější, extrahujeme ze zvířecích chlupů parfém, který aplikujeme na umělé membrány, jež se stávají pro parazity „neodolatelné k zakousnutí“. Osvojení, přizpůsobení a optimalizace tohoto stále unikátního systému nám umožňují provádět donedávna ještě zcela nemožné experimenty. Nejtatraktivnější výhodou zavedení umělého klíštěcího sání je snižující se závislost na laboratorních zvířatech. Pro představu – testování jediné látky v několika různých koncentracích a v několika opakováních pro získání dostatečné statistické významnosti by v praxi znamenalo desítky laboratorních zvířat. Náročnou optimalizací systému membránového sání se nám podařilo smazat rozdíly mezi umělým a přirozeným sáním klíšťat a výsledky získané na této platformě jsou srovnatelné s výsledky ze systémů postavených na přirozeném sání klíšťat na hostiteli.

Hledání a experimentální ověřování nových molekulárních cílů je nutný krok na cestě k úspěšnému vývoji nových akaricidních látek. Díky našemu komplexnímu experimentálnímu portfoliu a inovativním přístupům jsme součástí vývoje a testování předních látek proti krevsajcícím členovcům a patogenům, které přenášejí.

KATABOLISMUS HOSTITELSKÝCH PROTEINŮ – ČMELÍK A TYROSIN

Další specifickou dráhou, jejíž inhibice má akaricidní účinek, může být dráha degradace hostitelských aminokyselin. Hostitelská krev neslouží jen jako zdroj hemu, ale její proteinová složka představuje pro parazita i velmi vydatný zdroj aminokyselin, základních stavebních kamenů pro syntézu vlastních enzymů a zásobních proteinů. Vysoká koncentrace získaných aminokyselin může ale představovat problém, parazit je schopen využít pouze určité množství. Zbylé a nadbytečné aminokyseliny mohou být pro parazita toxické, a musí být proto postupně degradovány.

Příkladem jsou málo rozpustné aminokyseliny jako fenylalanin a tyrozin, které sdílejí stejnou katabolickou dráhu. Zablokování této dráhy vhodným inhibitorem vede k hromadění obou těchto aminokyselin. Stávají se pro buňky toxické (obr. 4) a zároveň v jiných metabolických drahách ovlivňují hladinu meziproductů odvozených od těchto aminokyselin. Kumulace a disbalance vedou k smrti většiny krevsajcících členovců – nejen roztočů (klíšťat, čmelíků), ale i komárů nebo parazitických ploštěk. V současnosti se tyto inhibitory dostávají do hledáčku společností

mikroinjekce



nymfa



dospělec

membránové sání

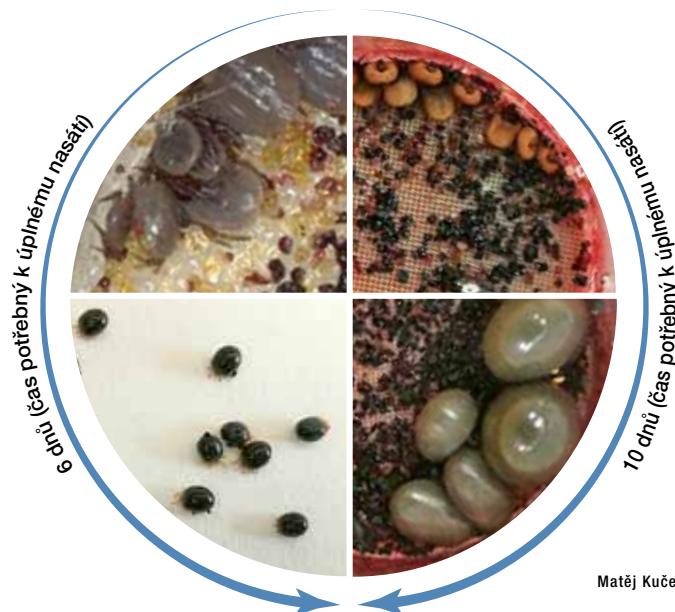


Schéma
Matěj Kučera a Jan Perner

Mgr. MATĚJ KUČERA (*1989) jako student doktorandského studia Jihočeské univerzity vypracovává svoji disertační práci v Parazitologickém ústavu Biologického centra. Vyhodnocuje farmaceutický potenciál inhibitorů

katabolické dráhy tyrosinu proti krevsajícím členovcům: klíšťatům, čmelíkům a komárům. Svůj mikropohled z práce si kompenzuje relaxací makropohledy z dronu nad Českým středohořím.



JAN PERNER, Ph.D., (*1986) je vědeckým pracovníkem Parazitologického ústavu Biologického centra a spoluškolicitelem Matěje Kučery. U krevsajících členovců se zaměřuje na specifické pochody blíže asociované se sáním krve na hostiteli. V Biologickém centru zavedl systém membránového sání klíšťat a čmelíků, který slouží jako testovací platforma nových antiparazitik, ale i jako

inovativní a informativní platforma základního výzkumu. Paralelu touhy po krmení (klíšťat) si přenesl i do osobního života získkem učňovského titulu kuchař – číšník.



5. EXPERIMENTÁLNÍ APLIKACE pro testování molekulárních cílů u nymf a dospělců klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). Mikroinjekací dsRNA do hemolymfy jsme schopni indukovat systemickou RNAi ve většině klíštěcích tkání. Takto dokážeme aplikovat do těla roztoče i zkoumané akaricidní látky, které mikroinjikujeme jen před sáním na hostiteli nebo po něm. Pomocí metody membránového sání můžeme testovat látky po celou dobu sání v reálném čase, tedy stejným způsobem, jakým by byly testovány na živém zvířeti. Děje se tak v krmítkách z akrylátového skla skrze tenkou silikonovou membránu (zhruba 100 μm).

testujících a vyvíjejících nové akaricidy a insekticidy.

JAK OVĚŘIT MOLEKULÁRNÍ CÍLE

Identifikované molekulární cíle specifické pro krevsající roztoče je potřeba experimentálně ověřit, zejména jejich nezbytnost pro životaschopnost organismu. Zde využíváme dva přístupy: genetický a biochemický.

U krevsajících roztočů jsme zatím schopni jen dočasně genetické modifikace, produkujeme tím dočasně mutované roztoče, kteří postrádají klíčové proteiny či enzymy. Posléze u nich pozorujeme jakékoliv odchylky od nemodifikovaných roztočů a spojujeme je s funkcí zkoumaného proteinu (fenotypizujeme je).

Biochemický přístup využívá interakcí malých inhibičních molekul s proteinovými cíli. Při jeho použití dopravíme testovanou látku do těla klíštěte nebo čmelíka, a tím zablokujeme metabolickou dráhu nebo i několik pochodů naráz. Posléze zkoumáme, jaký dopad má inhibitor na životaschopnost roztočů nebo na jejich schopnost reprodukce.

Možností, jak dopravit testovanou látku do těla parazita, je několik. Pro naše experimenty využíváme zejména mikroinjekci a membránové sání. Každá z těchto metod má své výhody a nevýhody, ne každá může být použita pro daný experiment. Zatímco u klíšťat využíváme zejména metody mikroinjekce a membránového sání, pro experimenty na čmelících kuřích volíme zejména metodu mikroinjekce.

Nalezené molekulární cíle je třeba experimentálně ověřit. To je nutný krok na cestě k úspěšnému hledání, vývoji a testování nových akaricidů a insekticidů, které spolu s klíšťaty a čmelíky zničí i nebezpečné patogeny, způsobující závažná lidská onemocnění. ●

K dalšímu čtení...

- Perner J. et al.: *Elife*, 2016, DOI: 10.7554/eLife.12318.
- Perner J. et al.: *Trends Parasitol.*, 2019, DOI: 10.1016/j.pt.2019.01.001.
- Kopáček P., Perner J.: *Curr. Biol.*, 2016, DOI: 10.1016/j.cub.2016.06.068.
- Kröber T., Guerin P. M.: *Trends Parasitol.*, 2007, DOI: 10.1016/j.pt.2007.07.010.