

## „Krvemlýnek“ ve střevě klíštěte

Ačkoli klíšťata sají a tráví obrovské množství hostitelské krve, která je jejich jediným zdrojem živin a energie, molekulární podstata těchto jevů nebyla do nedávné doby příliš zřejmá. Teprve komplexní molekulární model trávení hostitelského hemoglobinu u klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*), vypracovaný ve spolupráci Biologického centra a Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, poprvé odhalil analogii zažívání u klíšťat s krevsajícími ploštěnci (*Platyhelminthes*) a hlísticemi (*Nematoda*). Tato znalost představuje zásadní poznatek pro účinný boj s klíšťaty a jimi přenášenými patogeny (o interakci mezi klíštětem a hostitelem blíže také Živa 2007, 6: 247–249 a 2008, 1: 5–6).

Klíšťata přenášejí původce daleko většího počtu nemocí než jakákoli jiná skupina krevsajících členovců, a to včetně komárů (viz např. Živa 2014, 5: 247–249). V našich zeměpisných šířkách bývají klíšťata spojována zejména s přenosem závažných onemocnění jako lymfická borelióza a klíšťová encefalitida (Živa 2001, 4: 150–152). Zatímco první jmenované onemocnění může při zanedbání včasné antibiotické léčby přecházet do chronického stavu, způsobuje dlouhodobé problémy a doposud pro něj není vhodná vakcína, rozvoj klinických projevů druhé nákazy probíhá mnohem rychleji, ohrožuje na životě a přes existenci dostupné komerční vakcíny může především u neočkovaných pacientů starších 50 let končit fatálně. Z globálního pohledu však má problematika klíšťat ještě další rozměry – klíšťata sama o sobě způsobují obrovské škody farmářům chovajícím skot v zemích Latinské Ameriky, Afriky a v Austrálii, kdy zejména druhy s jedním hostitelem, mezi něž se řadí např. *Rhipi-*

*cephalus* (dříve *Boophilus*) *microplus*, sají ve velkých počtech na dobytku a znehodnocují produkci mléka, masa a kůže. Navíc tyto druhy přenášejí patogeny jako vnitrobuněčné bakterie rodu *Anaplasma* nebo výtrusovce rodu *Babesia* a *Theileria*, příbuzné a podobné plazmodiím způsobujícím malárii, které tyto škody dále umocňují. Z evolučního pohledu pak klíšťata zaujímají v systému bezobratlých unikátní postavení – patří totiž mezi klepítkatce (*Chelicerata*) a společně s roztoči tvoří řád Acarina. Vzhledem k násobné (několika- až tisícinásobné) velikosti oproti jiným roztočům představují vhodný modelový organismus pro studium biologie celé této skupiny, zahrnující i další ekonomicky a zdravotně důležité a sledované parazity, jako jsou kleštíky včelí (*Varroa destructor*), čmelík kuří (*Dermanyssus gallinae*) nebo zákožka svrabová (*Sarcoptes scabiei*).

Kromě raritního jihoafrického druhu *Nuttalliella namaqua* náležícího do samostatné čeledi Nuttalliellidae se všech více

než 850 celosvětově se vyskytujících druhů dnes řadí do dvou čeledí – klíšťata (*Ixodidae*, v angličtině se používá označení tvrdá klíšťata) a klíšťáci (*Argasidae*, anglicky měkká klíšťata). Dělení vychází z toho, že samci klíšťat mají tělo kryté chitinizovaným hřbetním štítkem (*scutum*) a u samic dosahuje tento štítek do jedné třetiny těla. Naopak tělo klíšťáků je měkké, kožovité.

Klíšťata jsou obligátními ektoparazity, jejichž jediným zdrojem živin a energie je krev obratlovčích hostitelů. Trávení a zpracování hostitelské krve jsou tudíž elementárními fyziologickými procesy pro vývoj a rozmnožování klíšťat, a přerušení těchto procesů pomocí chemických látek nebo protilátek z hostitele může mít výrazné uplatnění v lidské i veterinární medicíně. Střevo klíštěte, zaujímající přes 80 % těla dospělých samic, představuje kromě centra metabolismu trávení také vstupní bránu pro všechny patogeny přenášené klíšťaty. Předpokládáme, že podobně jako u hmyzích přenašečů (např. komára *Anopheles gambiae*, přenašeče *Plasmodium falciparum*, resp. malárie) k úspěšnému přenosu patogenů přispívá obcházení nebo vyložené zneužívání fyziologických a molekulárních mechanismů trávení a vrozené imunity klíštěte. Evoluční výhoda, mající zásadní podíl na těchto adaptacích, zřejmě spočívá ve značném rozdílu v délce generačního cyklu přenášených patogenů (hodiny, dny) a klíšťat (roky). Důkladné poznání metabolismu trávení a vrozené imunity klíšťat na molekulární úrovni, kterému se dlouhodobě věnuje naše laboratoř vedená Petrem Kopáčkem v Parazitologickém ústavu BC AV ČR, v. v. i., v Českých Budějovicích, proto znamená nejen možnost racionálního designu nových účinných vakcín proti klíšťatům, ale také základní předpoklad pro eliminaci přenosu patogenů klíšťaty na jejich obratlovčí hostitele.

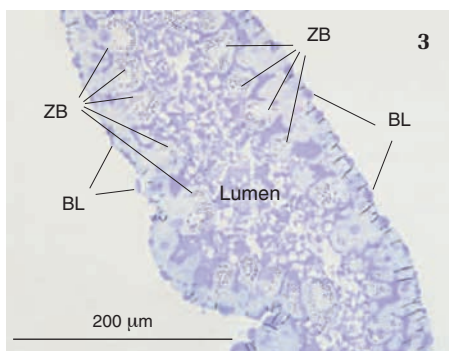
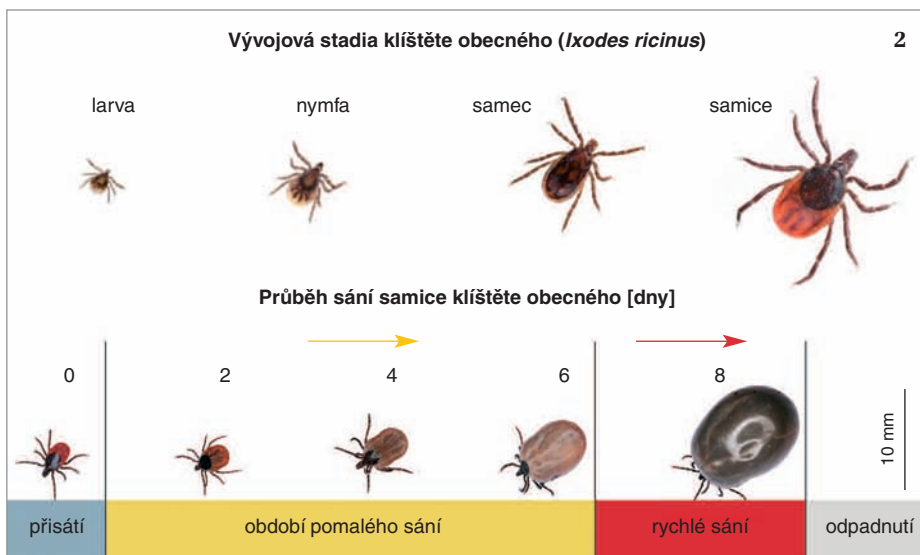
### Sání a trávení hostitelské krve

Strategie sání a zpracování hostitelské krve u klíšťat a klíšťáků se do značné míry liší a existují názory, že se sání krve mohlo u těchto dvou velkých a rozličných skupin vyvinout zcela nezávisle. U klíšťáků nymfy a dospělci obou pohlaví sají na hostiteli poměrně krátkou dobu, řádově hodin. Sání krve a kladení vajec u nich probíhají jako cyklické procesy – během života dospělců se mohou několikrát opakovat. Sání přitom není podmíněno pářením a oplozením vajíček – u některých druhů rodu *Ornithodoros* známe nálezy plně nasátých neoplozených samic, které čekají v jakémsi vegetativním stadiu (např. ve vlhku pod kameny), kdy vylučují jen feromony k nalákání partnera, a to až několik let. Po celou dobu jsou nasáté proteiny z hostitelské krve uskladněny ve vnitřní dutině střeva (*lumen*) klíšťáka a po „odložení“ oplození následně rychle degradovány při tvorbě vajíček.

Naopak klíšťata, k nimž patří u nás nejrozšířenější klíště obecné, sají pouze jednou v každém životním stadiu (larva, nymfa, dospělá samice – obr. 2 a 4–6) a plně nasá-



1 Smíšený les s travním podrostem – typická lokalita zvýšeného výskytu klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). Branišovský hvozď v Českých Budějovicích



2 Vývojová stadia a dynamický průběh sání samice klíštěte obecného na hostiteli  
 3 Průřez výběžkem (caecum) klíštěcího střeva (zde u samice k. obecného) barvený toluidinovou modří. Lumen – vnitřní prostor střeva s nasátou krví a bílé, neobarvené krystaly hemoglobinu; BL – bazální lamina buněk (tedy vnější okraj barveného preparátu) se svalovými vlákny, ZB – zažívací buňka střeva, která endocytuje a tráví proteiny z hostitelské krve. Foto V. Urbanová  
 4 a 5 Samec (menší, zespodu) a samice (větší, shora) klíštěte obecného při páření (obr. 4) a nymfa tohoto druhu (5)  
 6 Snůška vajec jedné samice klíštěte (patrně afrického druhu rodu *Amblyomma*). Snímky J. Erharta, není-li uvedeno jinak

té samice hynou během několika dní po naklazení snůšky vajíček. Sání přitom může trvat rovněž až několik dní a skládá se z období pomalého sání trvajících 6–9 dnů a následného rychlého sání, k němuž dochází 12–24 hodin před odpadnutím z hostitele. Fáze rychlého sání je podmíněna

předchozím oplozením samic a nasají při ní více než dvě třetiny celkového objemu krve – u samic klíštěte obecného až 1 ml, tedy zhruba 100násobek jejich původní hmotnosti. Zpracování proteinů hostitelské krve, zejména dvou hlavních komponent, hemoglobinu a sérového albuminu, je důležitým předpokladem k vytvoření velké snůšky.

Proces trávení krve klíšťaty se odehrává v největší tkáni – ve střevě, jež tvoří přes 80 % jejich těla. Jeho střední část (mezenteron), odpovědná za trávení, je rozčleněná do jednotlivých výběžků (caeca) kvůli zvětšení povrchu a objemu střevní tkáně. Tato část střeva se u klíšťat výrazně liší od stejného orgánu krevsajících hmyzu, a to nejen anatomicky, ale především funkčně. U krevsajících hmyzu probíhá (až na výjimky) trávení proteinů hostitelské krve rychle a mimo samotné buňky – v lumen střeva. Trávicí enzymy např. u mouchy tse-tse (*Glossina palpalis*) nebo komárů bývají většinou serinové proteázy podobné trypsinu s maximem aktivity v zásadité (alkalické) oblasti pH. Oproti tomu u klíšťat dochází v lumen střeva pouze k enzymatické lyzi (rozkladu) červených krvinek a rozpuštěné krevní proteiny jsou poté transportovány do střevních buněk a tráveny v kyselém prostředí vnitrobuněčných membránových váčků. Tento postupný a neobvyklý způsob trávení velkého množství nasáté hostitelské krve, kdy vnitřek střeva evidentně slouží i jako primární zásobník živin, umožňuje klíšťatům přežívat dlouhé časové intervaly (měsíce až roky) mimo hostitele a zřejmě velmi přispívá k jejich globálnímu rozšíření a úspěšné adaptaci k životu v nejrůznějších podmínkách na Zemi.

Na příčném řezu výběžkem střeva je tkáň tvořena střevním lumen obsahujícím nasátou krev, obklopeném tenkou epiteliální vrstvou histologicky rozlišitelných buněk a tenkou vnější vrstvou svalových vláken (obr. 3). Vnitřní epitel trubice pokrývá peritrofická membrána, která je obdobou chitínové peritrofické matrice hmyzu s proteoglykanovou sítí. Během sání a naplnění střeva se původně bazální buňky střevního epitelu mění na trávicí buňky, které nejprve zmnoží svůj proteosyntetický aparát (zajišťující překlad sekvencí mediátorové neboli messenger, mRNA do aminokyselin proteinů), poté sekretují složky peritrofické matrice na svůj povrch a začínají trávit hemoglobin. Během přípravy na rychlé sání (viz dále) pak buňky naplněné hemem – kondenzovanou neproteinovou složkou krevního barviva – opouštějí vrstvu epitelu a migrují do střevního lumen. Tento jev není patrný u plně nasátých samic, kde dochází k trávení ve všech střevních buňkách.

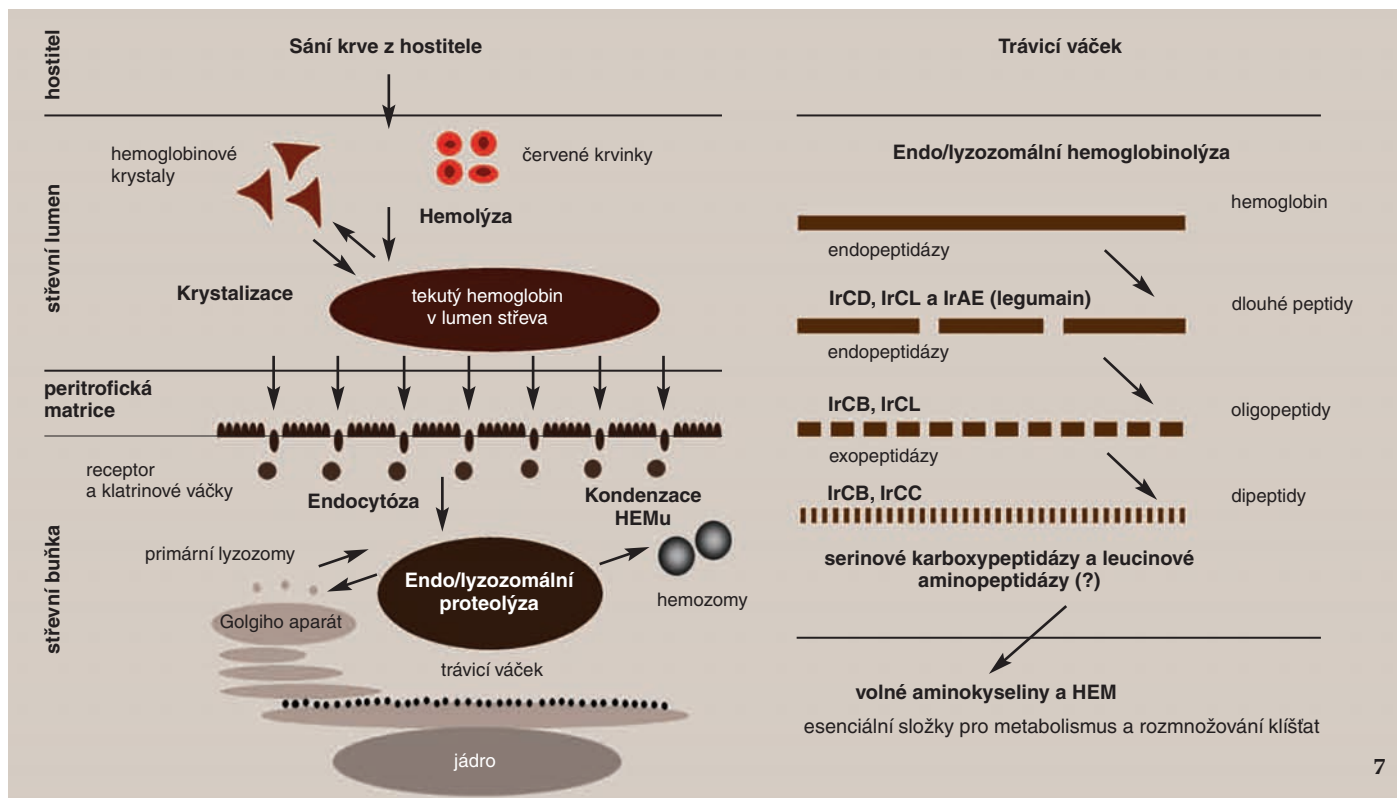
### Trávení hostitelského hemoglobinu

Molekulární „osud“ hemoglobinu ve střevní tkáni samic klíštěte obecného lze popsat chronologickým sledem několika navazujících fyziologických událostí (obr. 7). V první fázi je nasátá krev uskladněna uvnitř střeva, rozpouští se povrch červených krvinek (erytrocytů) a uvolňuje se jejich obsah (hemolýza). Následuje vytváření velkých krystalů hemoglobinu v lumen střeva – to je zřejmě způsobeno postupnou dehydratací a zahušťováním obsahu střeva. Tekutý střevní obsah tvořený především albuminem a rozpuštěným hemoglobinem poté přijímají (endocytóza) a zpracovávají buňky střevního epitelu. Molekuly hemu, uvolněné z tráveného hemoglobinu, kondenzují ve specializovaných organelách střevních trávicích buněk (hemozomech).

Když se na jednotlivé etapy podíváme podrobněji, zjistíme, že hemolýza v lumen střeva klíštěte není pouhá osmotická nebo mechanická destrukce červených krvinek, ale že jde zřejmě o komplexní enzymatický proces vedoucí k odstranění povrchových membrán a uvolnění buněčného obsahu. Ovšem přesný molekulární mechanismus hemolýzy doposud není popsán (Miyoshi a kol. 2004).

Po uvolnění z krvinek má hemoglobin některých obratlovců tendenci tvořit poměrně velké proteinové krystaly v lumen střeva. Fyziologický důvod tohoto fascinujícího jevu zůstává nejasný, ale mezi zvažované možnosti patří dlouhodobá konzervace hemoglobinu jako potravy – např. při zmiňovaném až několikaletém čekání samic některých druhů klíšťáků rodu





7

*Ornithodoros* na oplodnění – nebo fyziologická ochrana proti potenciálnímu nebezpečí (viz dále v textu) přebytku uvolněného hemu.

Role polysacharidové peritrofitické matrice (PM) na povrchu buněk střevního epitelu není zcela jasná. Spekuluje se o její funkci při přenosu závažných patogenů, které se dostávají do prostoru mezi střevními buňkami a PM, čímž unikají před aktivními imunitními molekulami z hostitelské krve, jež PM neprojdou. Heterofágie – příjem tekutého obsahu střeva střevními buňkami klíštěte – se skládá nejméně ze dvou paralelních endocytických mechanismů, což elegantně prokázali brazilští kolegové tým, že sledovali vnitrobuněčné osudy fluorescenčně značeného hemoglobinu a albuminu v primárních liniích střevních buněk klíštěte *R. microplus* (Lara a kol. 2005). Albumin je pravděpodobně rozpoznán a transportován do buněk nespecificky pomocí endocytózy tekuté fáze v populaci malých kyselých váčků. Hemoglobin se však zdá být rozpoznán specificky pomocí receptorů na buněčném povrchu a je poté rozdělován do velkých endozomálních váčků – k jeho vnitrobuněčnému transportu a degradaci tedy dochází odděleně. Tento způsob endocytózy hemoglobinu se zřejmě vyvinul jako detoxikační mechanismus. Hemoglobin je totiž jistě cenným zdrojem aminokyselin pro tvorbu snůšky, i když zřejmě nikoli nezbytným, jak ukazují některá dřívější pozorování i naše poslední výzkumy. Představuje však zdroj cenného, ale ve větší koncentraci potenciálně velmi nebezpečného hemu, který se uvolňuje při enzymatickém štěpení hemoglobinu a trávicí buňky se s ním musejí fyziologicky vypořádat.

Rozpoznání a endocytóza hemoglobinu klíštěcími střevními buňkami je založena na molekulárních mechanismech zahrnujících dosud neidentifikovaný receptor na buněčném povrchu a tzv. klatrinové váč-

ky (clathrin coated pits), popisované již v 80. letech 20. stol. v pracích týkajících se střev klíšťat. Po degradaci hemoglobinu v endo/lyzozomálním aparátu trávicích buněk klíštěte se většina uvolněného hemu soustředí a následně kondenzuje uvnitř specializovaných membránových organel pojmenovaných hemozomy (Lara a kol. 2003). Jejich vývoj probíhá současně s odpojováním trávicích buněk ze střevního epitelu během pomalého období krmení (1.–7. den sání, 30 % z celkového objemu nasáté krve; obr. 2), a u klíšťáků jsou partikule kondenzovaného hemu vylučovány zpět do lumen střeva. Po odpadnutí z hostitele jsou v plně nasátých klíštěcích samičkách hemozomy přítomny téměř ve všech buňkách střevního epitelu, což dokládá rychlé zpracovávání hemoglobinu během tvorby vajíček u plně nasátých samic.

#### Komplex trávicích enzymů ve střevě klíštěte

Důležitým tématem, kterému se věnujeme v naší laboratoři, je vlastní proteolytické zpracování proteinů z krve uvnitř střevních buněk klíšťat a následné využití získaných aminokyselin k tvorbě žlutkových rezerv (vitelogeninů) pro vývoj velkého množství vajíček v rámci jedné snůšky. Na rozdíl od některých zástupců z řad krevsajících hmyzu existovaly o proteolytických enzymech (neboli peptidázách, proteázách) ve střevě klíšťat donedávna jen velmi kusé informace. Přitom jejich úloha – hydrolytické štěpení proteinů z hostitelské krve, zastoupených především hemoglobinem a albuminem, za účelem získání dostatku aminokyselin pro tvorbu vitelogeninu – je základním předpokladem pro rychlé mezigenerační rozmnožení klíšťat. Teprve v polovině 90. let se ukázalo, že tento proces, který probíhá u klíšťat uvnitř střevních buněk, představuje výsledek kombinace aktivit cysteinových (reakce pomocí cysteinu v aktivním místě) a aspartátových

7 Modelové schéma příjmu a trávení hemoglobinu z hostitelské krve u samic klíštěte obecného. Degradaci v trávicím váčku (vpravo) zahajuje činnost endopeptidáz typu katepsin D (IrCD) podporovaných katepsinem L (IrCL) a legumainem (asparaginylovou endopeptidázou/IrAE), odpovídajícím za primární události v štěpení hemoglobinu.

Aktivita katepsinu B (IrCB) se podílí na produkci menších, sekundárních fragmentů. Množina peptidových fragmentů uvolněných těmito endopeptidázami je degradována působením exopeptidáz prostřednictvím dipeptidázové činnosti IrCB a katepsinu C (IrCC). Mono-peptidázy, včetně serinové karboxypeptidázy (SCP) a leuciny-aminopeptidázy (LAP), se zřejmě podílejí na tvorbě volných aminokyselin z dipeptidů, které následně slouží k tvorbě vaječných proteinů a rozmnožování klíšťat. Orig. D. Sojka

(reakce pomocí asparťové kyseliny v aktivním místě) proteáz. Tyto enzymy pracují v jakémsi komplexu nebo kaskádě, vyvinuly se u raných mnohobuněčných organismů a zůstaly rozšířené až po obratlovce, kde fungují např. v makrofázích a v buňkách placenty jako tzv. lyzozomální peptidázy. U parazitů (např. malarická plazmodia, motolice rodů *Schistosoma* a *Fasciola*, hlístice rodů *Ascaris* a *Hemonchus*) jsou tyto enzymy evolučně přizpůsobeny a používány pro trávení krevních proteinů jako cenného zdroje aminokyselin (Sojka a kol. 2013).

Před 10 lety se naše skupina v úzké spolupráci s laboratoří Michaela Mareše (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i., Praha) a prof. Jamese H. McKerrova (v té době Kalifornská univerzita, San Francisco) jako první rozhodla definovat

komplex všech proteolytických enzymů ve střevní tkáni klíštěte, které odpovídají za trávení hemoglobinu. Vzhledem k tehdejšímu pouze kusým a nahodilým informacím jsme se zaměřili na definované stadium jednoho druhu – tzv. polonasáté samice klíštěte obecného (6. den sání, před fází rychlého sání). Biochemické a molekulárněgenetické analýzy nám pomohly definovat úplný soubor proteolytických enzymů – komplex cysteinových a aspartových peptidáz, které se účastní zpracování hemoglobinu uvnitř endo/lyzozomálního systému střevních buněk.

Práce zahrnovala kombinace specifických inhibitorů a substrátů použitých pro detekci jednotlivých typů (klanů) proteolytických enzymů (aka proteáz, peptidáz) z extraktů střevní tkáně klíštěte, které jsou zodpovědné za degradaci hemoglobinu. Pomocí hmotnostní spektrometrie pak byla pro jednotlivé klany určena místa proteolytického štěpení v molekule (hovězího) hemoglobinu a byla sestavena proteolytická mapa jeho štěpení (Horn a kol. 2009). Sestavení této mapy v několika časových intervalech nám umožnilo vypracovat modelové schéma hemoglobinolyzy uvnitř trávicích buněk klíštěte obecného (obr. 7 – detaily modelu trávení hemoglobinu viz popis). Tento model současně podporují publikace popisující biochemické aktivity a jednotlivé geny z jiných druhů klíšťat, jako jsou *R. microplus* a asijský druh *Haemaphysalis longicornis*, a také klíšťáka *Ornithodoros moubata*.

Analýzy dostupných dat z klíštěcích transkriptomů (množin sekvencí všech mRNA v izolovaných tkáních nebo v celém těle) a dat z dosud nedokončeného genomu (chromozomální DNA sekvence) severoamerického klíštěte *Ixodes scapularis* jasně ukazují, že u klíšťat došlo ke zmnožení původních (ancestrálních) peptidázových genů genomu duplikací. Následným odděleným vývojem duplikátů vzniklo hned několik izoform (též paralogů) každého enzymu, které mají např. jinou transkripční regulaci, tedy k jejich proteosyntéze dochází v různých tkáních a čase během vývoje, což dokládá jejich specifickou funkci. Z tohoto důvodu je velmi užitečné sledování transkripce – hladiny mRNA jednotlivých proteázových genů pomocí kvantitativní PCR (qPCR) v průběhu oogeneze klíštěte a u dospělých samic, kde lze oddělit jednotlivé orgány, i v tkáních. Pro studium trávení jsou pak dále vybrány jen izoformy produkované ve střevní tkáni, jejichž exprese se zvyšuje v reakci na sání klíštěte na hostiteli. Funkčně poté můžeme ověřit skutečnou roli každého izoenzymu *in vivo* pomocí specifické RNA interference. Do tělní dutiny klíštěte se vpíchne fragment dvouvláknové RNA (dsRNA, double stranded RNA) odpovídající specifické části mRNA kódující danou peptidázovou izoformu. Klíšťata jsou následně krmena na hostiteli a v průběhu sání dojde specificky k utlumení exprese daného genu a absenci enzymu (RNAi knock-down). Posléze se sledují změny v proteolytických aktivitách a ultrastruktuře střevní tkáně, i celkové fenotypové změny, jako je přežívání, hmotnost klíštěte, velikost snůšky a líhnutí larev. Získané výsledky při vyhodnocení poku-

sů porovnáváme s kontrolními klíšťaty, do nichž byl injikován dsRNA fragment kódující gen, který se určité v genomu klíštěte nevyskytuje (např. zelený fluorescenční protein – GFP). Celkově jsou tyto pokusy velice náročné, protože je vhodné používat klíšťata z volné přírody (omezené sezónou), ve velkých množstvích (řádově stovky), a pokusy musíme provádět nejméně ve třech nezávislých opakováních, aby získaná data byla statisticky průkazná. U klíštěte obecného se takto podařilo odhalit izoformu aspartové peptidázy katepsinu D (IrCD1, Sojka a kol. 2012) a cysteinové peptidázy katepsinu L (IrCL1, Franta a kol. 2011), které mají dominantní úlohu při prvotním trávení hemoglobinu v polonasátých samicích klíštěte obecného.

Neméně podstatnou součástí zjišťování biologické funkce jednotlivých peptidázových izoenzymů je také jejich *in vitro* biochemická charakterizace a použití inhibitorů proti těmto enzymům pro jejich sledování v extraktech či preparátech z buněk a tkání klíštěte pomocí imunoznačení (Western blot) a metod fluorescenční a elektronové imunomikroskopie. Protože chromatografické obohacení a čištění studovaných proteáz přímo z klíštěcí střevní tkáně je vzhledem k množství a povaze materiálu (velký objem hostitelské krve) téměř nemožné, připravujeme tyto enzymy v rychle rostoucích komerčních kulturách prokaryotických (bakteriálních) a eukaryotických (kvasinky, hmyzí aj. buněčné kultury) buněk. Pomocí rekombinace se do těchto buněk vpraví genetická informace – fragment klíštěcí DNA kódující daný enzym, a buňky jsou pak za krátký čas schopny vytvořit tyto klíštěcí enzymy ve velkém množství (tzv. rekombinantní proteiny).

Tak byly připraveny prekurzory (proenzymy, zymogeny) tří enzymů, IrCD1, IrCL1 a IrAE1, které se účastní primárního štěpení hemoglobinu ve střevních buňkách klíštěte obecného (obr. 7), a po chromatografickém přečištění proběhla jejich biochemická charakterizace – závislost na pH, způsob aktivace, preferovaná proteinová sekvence v místě štěpení (substrátová specifita) a další biochemické hodnoty. Všechny tři enzymy jsou aktivovány autokatalytickým odštěpením N-koncové části v kyselém pH, kde také leží optima jejich aktivity. Toto prostředí odpovídá okyselenému endolyzozomálnímu vakuolu po splynutí s primárními lyzozomy, v nichž jsou acidifikační aktivovány prekurzory peptidáz během transportu z Golgiho aparátu. Změna pH (acidifikace) lyzozomů tudíž hraje v procesu trávení hemoglobinu pravděpodobně zásadní regulační roli a představuje zřejmě Achillovu patu celého systému, která může mít další uplatnění při boji s klíšťaty. Podstatnou informací je též substrátová preference těchto rekombinantních enzymů – sled aminokyselin v substrátu v místě jeho hydrolytického štěpení. Zjišťuje se pomocí speciálních kombinatoriálních knihoven peptidových substrátů a také pomocí sestavených hemoglobinolytických map (blíže viz Sojka a kol. 2013). Imunomikroskopie, ať už za použití konfokálního, nebo transmisního elektronového mikroskopu, odhalila přítomnost peptidáz v endolyzozomálních vakuolách střevních buněk.

Rekombinantní klíštěcí trávicí enzymy (zkráceně rekombinanty) mají také potenciál jako protiklíštěcí vakcíny. Předpokládáme, že při sání na imunizovaném hostiteli (laboratorní zvíře s vytvořenou protilátkovou odpovědí proti rekombinantům) se hostitelské specifické protilátky navážou na trávicí enzym v klíštěti a inhibují jeho aktivitu. V našich pokusech proto necháváme klíšťata sát na laboratorních králících imunizovaných klíštěcími rekombinantními proteázami, pozorujeme fenotypové změny a porovnáváme je s výsledky RNA interference (viz výše v textu). Experimenty s laboratorními králíky a jejich výsledky se dále stávají základem rozvoje aplikovaného výzkumu ve spolupráci s domácími, ale především zahraničními partnerskými institucemi a veterinárně-farmaceutickými firmami.

### Co víme a na co se ještě budeme ptát?

Klíšťata využívají hostitelskou krev jako jediný zdroj živin a energie, přičemž existují významné rozdíly mezi strategiemi sání u klíšťat a klíšťáků. Použitím definovaného stadia jednoho druhu (polonasáté samice klíštěte obecného) se podařilo objasnit, jakým způsobem klíšťata zpracovávají hemoglobin uvnitř svých trávicích buněk. Děje se tak pomocí relativně komplikované kaskády enzymů cysteinových a aspartových proteáz, tedy odlišné od krevsajících hmyzu a naopak obdobné jako u krevsajících helmintů nebo jednobuněčného původce malárie *Plasmodium falciparum*. Na mnoho otázek zatím neexistuje jednoznačná odpověď, a jsou proto předmětem dalšího výzkumu. Zbývá např. objasnit, jestli existuje rozdíl v molekulárních mechanismech zpracování krevních složek u klíšťat a klíšťáků, zda model popsáný u polonasátých samic klíštěte obecného je univerzálně platný i pro ostatní krevsající vývojová stadia (larvy, nymfy, dospělé), a zejména, jakou roli hrají jednotlivé geny a jimi kódované izoenzymy. Lze samozřejmě pokládat i další otázky, např. zda se liší vnitrobuněčný mechanismus trávení dvou hlavních proteinů hostitelské krve – hemoglobinu a sérového albuminu, jak (na molekulární úrovni) probíhá zpracování uvolněných hemových skupin z tráveného hemoglobinu a jakým způsobem klíště jako auxotrofní organismus (neschopný vlastní syntézy hemu) začleňuje tento kritický enzymový kofaktor do vlastního metabolismu. Pro aplikovaný výzkum je zásadní studium trávicích enzymů klíštěte obecného jako cílových molekul pro boj s klíšťaty a jimi přenášenými patogeny, jak se to v minulosti osvědčilo u malárie nebo krevsajících helmintů.

*Tento výzkum je financován z podpory Grantové agentury České republiky – projektů GA ČR 14-336935 a 13-11043S.*

Seznam citované literatury najdete na webové stránce Živy.

### Poznámka redakce:

Daniel Sojka získal v r. 2013 Cenu Akademie věd ČR pro mladé vědecké pracovníky za vynikající výsledky vědecké práce, dosažené za finanční podpory AV ČR do věku 35 let.