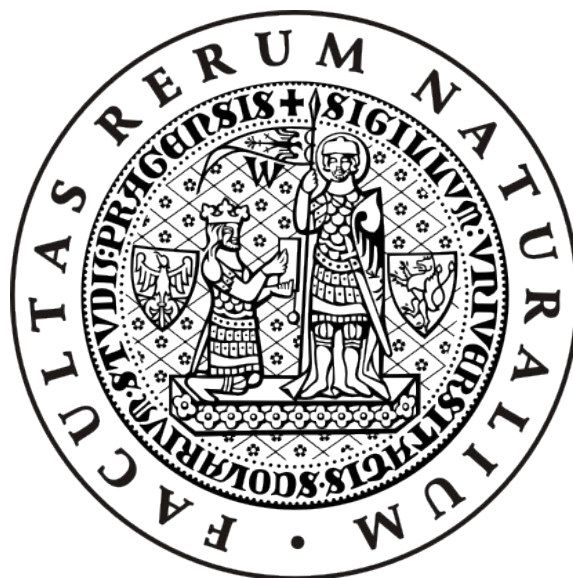


**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra parazitologie



## **Využití metody RNAi u krevsajících členovců**

The Usage of the RNAi Method on Bloodsuckling Arthropods

Bakalářská práce

Nikola Polanská

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Jan Votýpka, Ph.D.

2011

*Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně na základě studia citované literatury a za pomoci konzultací se svým školitelem.*

*V Praze dne 19.8.2011*

*Nikola Polanská*

*Chtěla bych velmi poděkovat mému školiteli Doc. RNDr. Janu Votýpkovi, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a nekonečnou trpělivost při sepisování této práce. Dále bych chtěla poděkovat mým rodičům a kamarádům za jejich podporu.*

## Abstrakt

RNA interference (RNAi) je přirozený obranný mechanismus buněk před cizorodými RNA. Zároveň je ale možné využít RNAi jako metodu pro funkční analýzu genů. RNAi se aktivuje pomocí vnášení krátkých dvouvláknových RNA do buněk či celých organismů. Dochází tak k degradaci specifické messenger RNA, a tím k utlumení fenotypového projevu genu.

Tato bakalářská práce shrnuje dosavadní poznatky o využití RNAi metody u krevsajících členovců a u protozoálních patogenů, které jsou těmito členovci přenášeny.

**Klíčová slova:** RNA interference, siRNA, krevsající členovci, Ixodidae, Culicidae, Glossinidae, Psychodidae, *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp.

## Abstract

RNA interference (RNAi) is a natural cell defense mechanism against heterogeneous RNA. RNAi can be also used as a method for functional analysis of genes. RNAi starts by the induction of short double-stranded RNA into cells or whole organisms. This leads to a specific degradation of messenger RNA and suppression of the gene phenotype.

This thesis summarizes current research of the usage of RNAi method on bloodsucking arthropods and protozoan pathogens transmitted by these arthropods.

**Key words:** RNA interference, siRNA, bloodsucking arthropods, Ixodidae, Culicidae, Glossinidae, Psychodidae, *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Plasmodium* spp.

## Seznam důležitých zkratk:

AGO	protein rodiny Argonaute
DCR	Dicer protein
dsRBD	„double-stranded RNA binding domain“
dsRNA	dvouvláknová RNA
miRNA	micro RNA
nt.	nukleotidy
pre-miRNA	prekurzor miRNA
pri-miRNA	primární transkript miRNA
PTGS	„posttranscriptional gene silencing“
RdRP	RNA-dependentní RNA polymeráza
RISC	„RNA induced silencing complex“
RNAi	RNA interference
siRNA	„small interfering RNA“

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	<b>2</b>
<b>2 RNA interference</b> .....	<b>3</b>
2.1 Druhy malých RNA .....	3
2.2 Dráha vedoucí ke vzniku „micro RNA“ .....	4
2.3 Průběh dráhy RNAi a její jednotlivé komponenty .....	5
<b>3 RNAi a její využití u různých skupin krevsajících členovců</b> .....	<b>7</b>
3.1 RNAi u zástupců čeledi Ixodidae .....	7
3.2 RNAi u zástupců čeledi Culicidae .....	10
3.3 RNAi u zástupců podčeledi Phlebotominae .....	12
3.4 RNAi u zástupců čeledi Reduviidae .....	13
3.5 RNAi u zástupců čeledi Glossinidae .....	14
<b>4 RNAi u protozoálních patogenů přenášených krevsajícími členovci</b> .....	<b>16</b>
4.1 Problematika RNAi a malých RNA u protozoálních parazitů .....	16
4.2 Trypanosomatida .....	17
4.2.1 RNAi dráha v <i>Trypanosoma brucei</i> .....	18
4.2.2 RNAi u dalších trypanosom ( <i>T. evansi</i> , <i>T. congolense</i> a <i>T. cruzi</i> ) ...	20
4.2.3 RNAi u rodu <i>Leishmania</i> .....	21
4.3 Apicomplexa .....	21
4.3.1 Možnosti RNAi u rodu <i>Plasmodium</i> .....	22
<b>5 Závěr</b> .....	<b>24</b>
<b>6 Přehled literatury</b> .....	<b>25</b>

# 1 Úvod

RNA interference (RNAi) je evolučně konzervovaný přirozený jev, který ovlivňuje genovou expresi. Konkrétně se jedná o příklad posttranskripčního umlčování genů pomocí krátkých sekvenčně specifických dvouvláknových RNA (dsRNA). Umlčování genů neboli genový silencing při RNAi probíhá na úrovni mRNA, která je při tomto ději degradována, čímž dochází k utlumení translace příslušného proteinu. RNAi je přirozeným mechanismem obrany genomu proti „parazitickým“ DNA jako jsou transposony (Dernburg *et al.* 2000) a nukleové kyseliny především RNA virů (Mourrain *et al.* 2000).

Jiným typem ovlivnění genové exprese je transkripční umlčování genů, při němž naopak dochází k regulaci exprese již na úrovni DNA (například rozdílnou methylací či vazbou specifických proteinů na DNA), takže při něm nedochází vůbec ke vzniku mRNA. Za objev RNA interference získali roku 2006 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu profesori A. Z. Fire a C. Mello, kteří jako první popsali proces RNAi u háďátka *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.* 1998).

V počátcích výzkumu RNAi byly jednotlivé součásti dráhy nalézány především u rostlin a háďátka (*C. elegans*), později se ale začalo ukazovat, že je tento jev poměrně častý a je možné jej pozorovat ve velké většině eukaryotních organismů, včetně hub, protozoí, zástupců bezobratlých, myši a také člověka (Cogoni a Macino 2000; Cerutti a Casas-Mollano 2006). V současnosti je RNAi často využívána ke zkoumání fenotypových projevů genů prostřednictvím jejich silencingu (umlčení), kdy je možné sledovat změny dějů v buňkách od metabolických drah až po dráhy ovlivňující buněčnou diferenciaci.

Hlavní výhodou metody RNAi u hmyzu je možnost jejího využití i u „nemodelových“ organismů. Funkce genů se tak dají zkoumat *in vitro* či *in vivo* na základě poznatků z bioinformatických analýz genů či z cDNA knihoven. Tím, že většina hmyzích vektorů nepatří mezi „modelové“ organismy, jsou jejich geny z velké části neznámé funkce. Tudíž se RNAi jeví jako velice vhodná metoda například pro výzkum imunity hmyzu, která hraje významnou roli při interakcích mezi patogenem a přenašečem. Takto získané poznatky by mohly pomoci při eliminaci nebezpečných onemocnění přenášených hmyzem, jako je například malárie, spavá nemoc, Chagasova choroba, horečka Dengue a mnoho dalších.

V první části mé práce jsem krátce nastínila obecnou problematiku RNAi. Další část je zaměřena na využití RNAi jako metody umlčování genů u vybraných čeledí krevsajících členovců a protozoálních parazitů, kteří jsou těmito členovci přenášeni.

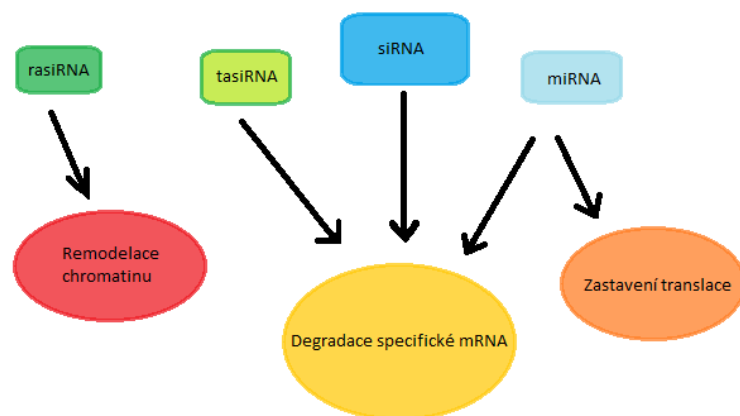
## 2 RNA interference

### 2.1 Druhy malých RNA

Malé RNA se přirozeně vyskytují ve většině eukaryotických organismů. Jsou dlouhé mezi 21 a 25 nukleotidy v závislosti na organismu, ve kterém se nalézají. V rostlinách je jejich délka průměrně 25 nukleotidů a byly poprvé popsány Hamiltonem a Baulcombem (1999) v pletivech *Nicotiana benthamiana*, ve kterých docházelo k PTGS (posttranskripčnímu genovému silencigu – obdoba RNAi v rostlinách). Později se na modelu embrya *Drosophila melanogaster* ukázalo, že 21 – 23 nukleotidů dlouhé dvouvláknové RNA jsou nezbytné pro proces RNAi a jejich pomocí dochází k rozpoznání specifických sekvencí na cílové mRNA a následně k jejímu štěpení (Zamore *et al.* 2000).

Výše popsané krátké RNA vznikají z delších dsRNA prekurzorů. Dle původu těchto prekurzorů dělíme RNA do dvou skupin. První skupina malých RNA je exogenního původu (vzniká například přepisem dsRNA virů, retropozonů, apod.) a nazývají se siRNA, neboli malé interferující RNA („small interfering RNAs“) případně rasiRNA („repeat-associated siRNAs“) či tasiRNA („trans-acting siRNAs“). Druhou skupinou malých RNA jsou pak miRNA („micro RNA“), které jsou endogenního původu. Tyto miRNA vznikají přepisem genů lokalizovaných v buněčném jádře a bude jim krátce věnována následující kapitola.

Všechny výše zmíněné typy malých RNA mají schopnost ovlivňovat (většinou umlčovat) expresi proteinů buňky, ve které se vyskytují. Ovlivnění může být na různých úrovních exprese genu (viz schéma na Obr. 1). Od modifikace chromatinu (rasiRNA), přes zastavení translace (miRNA) až po umlčení genů rozštěpením mRNA (siRNA, miRNA, pravděpodobně i tasiRNA). Tato práce je zaměřena především na poslední zmíněný děj vyvolaný siRNA (shrnutí v Meister a Tuschl 2004).



Obrázek 1: Druhy malých RNA a jejich funkce



## 2.2 Dráha vedoucí ke vzniku „micro RNA“

Jak již bylo zmíněno, miRNA vznikají přepisem jaderné DNA. Primární transkript, tzv. pri-miRNA (s methylguanovinovou čepičkou na 5' konci a polyadenylátem na 3' konci), který má dvě komplementární invertované sekvence (20 – 50 nt. dlouhé), díky kterým zaujme konformaci vlásenky a vytvoří tak v podstatě dsRNA (Jones-Rhoades a Bartel 2004). Tato pri-miRNA je poté štěpena a upravena za pomoci Drosha enzymu (rodina RNáz III spolu s Dicer enzymem, viz *Textový Box 1*) na pre-miRNA, která je exportována z jádra do cytoplasmy. V té je dále štěpena Dicer proteinem za vzniku konečných miRNA (viz *Obr. 2*). Tento krok je víceméně shodný se štěpením dsRNA prekurzoru na siRNA, které bude popsáno dále.

### *Textový Box 1: Rodina RNáz III (ribonukleáz III)*

Je rodina enzymů s endonukleázovou aktivitou na dsRNA, kdy po štěpení vznikají 2 – 3 nt. dlouhé přesahy s fosfátovou skupinou na 5' konci a hydroxylem na 3' konci (Elbashir *et al.* 2001).

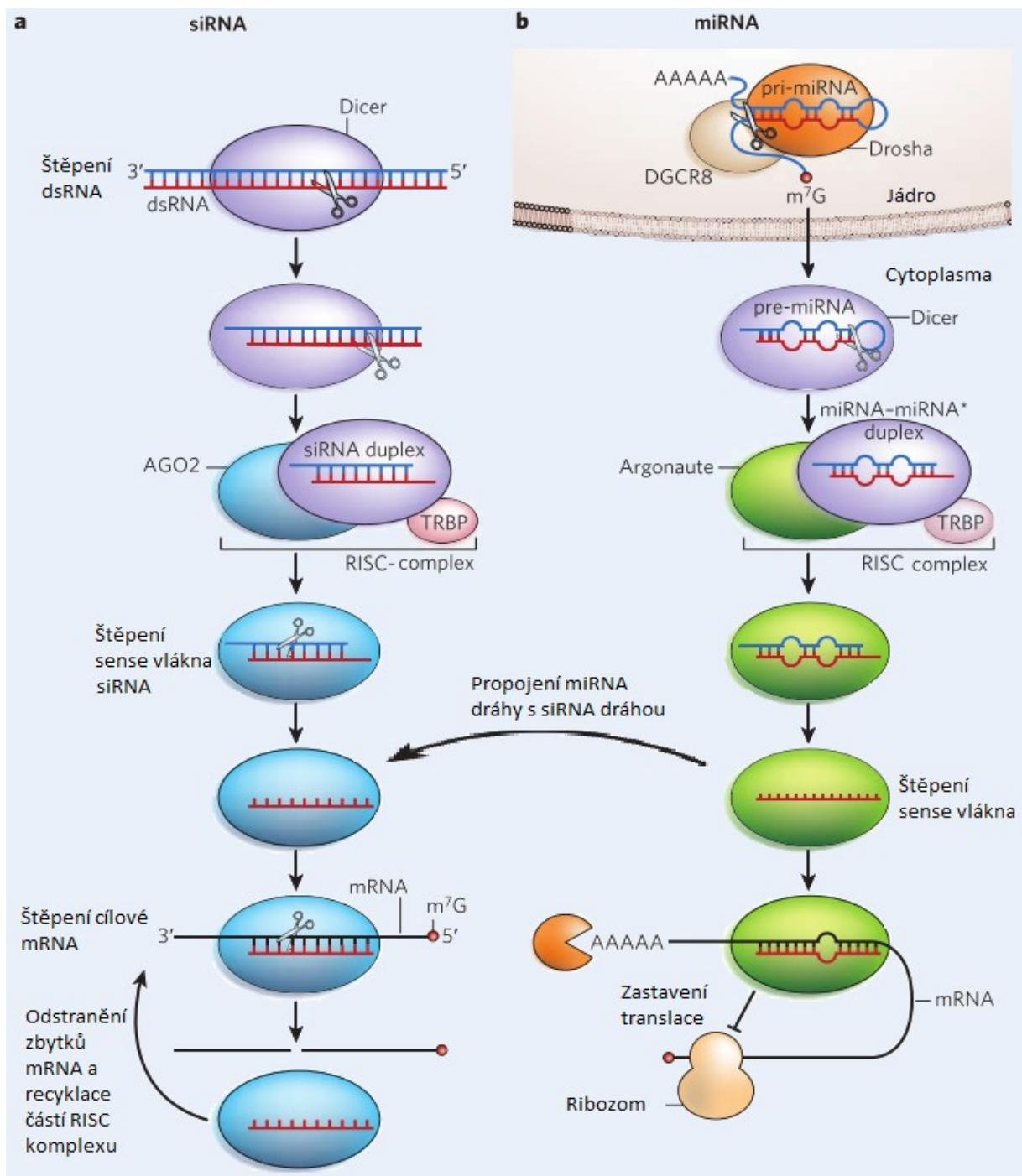
Tato skupina enzymů se dělí na tři podrodiny: Dicer, Drosha a bakteriální RNázy. Podrodiny enzymů se liší nejen svou stavbou a počtem podjednotek, ale i funkcí. Nejjednodušší svou stavbou jsou bakteriální RNázy, které obsahují RNázovou doménu a „dsRNA binding domain“ (dsRBD).

Dicer a Drosha jsou svou stavbou komplexnější než bakteriální RNázy. Drosha je lokalizovaná v jádře a podílí se na úpravě pre-miRNA (viz výše). Má tři domény – dvě RNázové a jednu dsRBD. Navíc pak poměrně dlouhý amino-terminální konec, který se podílí na protein-proteinových interakcích (propojení s Pasha proteinem, který umožňuje připojení Drosha na dsRNA (Denli *et al.* 2004)).

Dicer je cytoplasmatická ribonukleáza, která se podílí na úpravě jak siRNA, tak i pre-miRNA. Tento enzym může mít až pět různých domén, v závislosti na tom, u kterého organismu se nalézá. Stejně jako Drosha má Dicer dvě domény s aktivitou RNázy a jednu doménu vážící dsRNA (dsRBD). Další doménou je PAZ doména, která je shodná s doménou, kterou obsahují enzymy ze skupiny Argonoute. Proteiny této rodiny úzce spolupracují na dalším průběhu RNAi dráhy, kdy jsou i s Dicer proteinem součástí RISC (viz kapitola 2.3 *Průběh dráhy RNAi a její jednotlivé komponenty*) (Cerutti *et al.* 2000). PAZ doména hraje důležitou roli při rozpoznávání a orientaci dsRNA (i pre-miRNA) v komplexu Dicer-dsRNA (pre-miRNA) (Zhang *et al.* 2004). Dicer se dále ještě skládá z evolučně poměrně konzervované domény DUF 283 („domain of unknown function“) a amino-terminální domény s helikázovou případně ATPázovou aktivitou.

## 2.3 Průběh dráhy RNAi a její jednotlivé komponenty

Průběh RNAi dráhy je shrnut na *Obr. 2*. Ke spuštění RNAi dochází buď vstupem exogenní dsRNA do cytoplasmy, kdy je za degradaci cílové mRNA zodpovědná siRNA nebo vstupem pre-miRNA do cytoplasmy z jádra – pak je mRNA rozpoznána pomocí miRNA.



*Obrázek 2: Schéma RNAi dráhy; a) spuštění dráhy přes exogenní siRNA; b) spuštění dráhy přes endogenní miRNA (převzato a upraveno podle: Jinek a Doudna 2009)*

Jak pre-miRNA, tak exogenní dsRNA je vázána Dicer proteinem (případně za pomoci dalšího faktoru R2D2 (Liu *et al.* 2003)), který je štěpí na siRNA (příp. miRNA). Tyto siRNA jsou v dalším kroku RNAi dráhy vázány na multiproteinový komplex RISC – „RNA-induced silencing complex“. Následně je odštěpeno „sense“ neboli „passenger“ vlákna, takže v RISC komplexu zůstane vázáno pouze vlákno „antisense“ z původní dvouvláknové siRNA (Rand *et al.* 2005). Antisense vlákno, jinak také „guide“ vlákno, je komplementární k mRNA cílené degradaci. Ta se díky zmíněné homologii naváže do RISC komplexu (Elbashir *et al.* 2001; Martinez *et al.* 2002).

Důležitou součástí RISC komplexu je protein z velké skupiny Argonaute (např. AGO 2), obsahující několik podjednotek včetně PAZ a PIWI domény, které jsou odpovědné za připojení dalších komponent RISC komplexu a i za samotné štěpení mRNA (Song *et al.* 2004). Dalšími podjednotkami RISC jsou například v předchozích krocích zmíněné proteiny Dicer a R2D2 (Tahbaz *et al.* 2004). Kroky, kdy dochází spojení jednotlivých součástí RISC komplexu, souhrnně nazýváme aktivací RISC komplexu. Po této aktivaci dochází k samotnému štěpení cílové mRNA. Messenger RNA je štěpena mezi 10. a 11. bazí od 5' konce „guide“ vlákna. Vzniklé rozštěpené kusy mRNA jsou dále rozloženy nitrobuněčnými nukleázami a nemohou tak sloužit jako templát pro translaci daného proteinu.

Po rozštěpení mRNA se RISC komplex rozpadá na jednotlivé komponenty, které mohou být znovu využity v dalších RNAi reakcích. Stejně tak je i „guide“ vlákno siRNA uvolněno z komplexu a opětovně použito (Hutvagner a Zamore 2002).

U některých organismů, jako je například *C. elegans*, *Neurospora crassa* a *Dictyostelium discoideum*, se podařilo dokázat přítomnost tzv. RNA-dependentních RNA polymeráz (RdRP) (Dykxhoorn *et al.* 2003). Tyto polymerázy jsou podle všeho schopné využít „guide“ vlákno siRNA po uvolnění z RISC komplexu jako primer navázaný na zbytky rozštěpené mRNA. Ta slouží jako templát pro syntézu kopií siRNA (sekundárních siRNA) a tím může amplifikovat danou RNAi dráhu mezi buňkami živočichů nebo pletivy rostlin (Lipardi *et al.* 2001; Hannon 2002).

### 3 RNAi a její využití u různých skupin krevsajících členovců

#### 3.1 RNAi u zástupců čeledi Ixodidae

Klíšťata (Acarina: Ixodida: Ixodidae) jsou krevsající členovci parazitující na savcích, ptácích, plazích a některých obojživelnících. Spolu s čeledí Agrasidae (klíšťákovití) patří do podřádu Ixodia, čítající přes 900 druhů. Obě čeledi se vzájemně liší morfologií, vývojovým cyklem a také způsobem života. Dále se budu věnovat pouze čeledi Ixodidae. Výzkum RNAi nebyl zatím u čeledi Agrasidae publikován.

Zástupci čeledi Ixodidae jsou přenašeči velkého množství onemocnění jejichž původci jsou viry, bakterie či parazitické prvoci. Nejznámějším virovým onemocněním, vyskytujícím se i v České republice, je klíšťová encefalitida, jejímž původcem je TBEV („Tick-borne encephalitis virus“)<sup>1</sup>. Hlavní zástupci bakteriálních onemocnění jsou shrnuti v *Tab. 1*.

*Tabulka 1: Přehled hlavních bakteriálních onemocnění člověka přenášených klíšťaty*

<b>Původce onemocnění</b>	<b>Název onemocnění</b>
<i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato	Lymeská borelióza
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Lidská granulocytární ehrlichioza/anaplasmóza
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Lidská monocytární ehrlichioza/anaplasmóza
<i>Rickettsia rickettsii</i>	Horečka Skalisticích hor (Rocky mountain spotted fever)
<i>Rickettsia conorii</i>	Africká klíšťová horečka
<i>Francisella tularensis</i>	Tularémie

Mezi protozoální patogeny přenášené klíšťaty patří především čeledi Babesiidae a Theileriidae, kterým je věnována kapitola 4.3 *Apicomplexa* (shrnutí v Süss *et al.* 2004; Bratton a Corey 2005).

RNAi je u klíšťat poměrně hojně užívaná metoda, zejména pro výzkum střevních trávicích enzymů, antikoagulačních a imunomodulačních slinných proteinů a proteinů ovlivňující vztah mezi klíštětem a virem, bakterií či parazitickým prvokem. Pro vnášení dsRNA do klíšťat se využívají čtyři metody (Fuente *et al.* 2007), z nichž asi nejpoužívanější je aplikace dsRNA pomocí mikroinjekcí. Další metodou je přidání dsRNA přímo do stravy nymf či dospělců (Soares *et al.* 2005). Poměrně používanou metodou je „namáčení“ či inkubace klíšťat nebo jejich orgánů v roztoku s dsRNA (Bowman a Sauer 2005). Pro zkoumání RNAi dráhy u klíšťat je možné využít i infekce RNA virem (př. „Semliki Forest virus“- SFV) (Garcia *et*

<sup>1</sup> RNA virus z čeledi *Flaviviridae*

al. 2005).

Poprvé byla RNAi využita u samic klíštěte *Amblyomma americanum* již v roce 2002, pro umlčení slinného histamin-vázícího proteinu (HBP). Tento pokus, stejně jako pokus o rok později, provedený stejným týmem vědců, byl úspěšný. Došlo k výraznému snížení exprese HBP, ale ne ke stoprocentnímu umlčení (Aljamali *et al.* 2002, 2003).

Pomocí RNAi byla určena případně ověřena i funkce dalších slinných proteinů, které hrají významnou roli při ovlivnění sání klíšťat. Jedním z těchto proteinů je i Salp14 s antikoagulační funkcí u *Ixodes scapularis* (Narasimhan *et al.* 2004). Dr. Narasimhan se podařilo za pomoci dsRNA se sekvencí Salp14 umlčet i další strukturní paralogy tohoto proteinu (např. Salp9pac). Což poukazuje na to, že sekvenční specifita RNAi není vysoká, jak se původně uvažovalo. Důsledkem silencingu Salp14 byla snížená schopnost klíštěte sát. V pokusech, kdy byl za pomoci dsRNA inhibován homolog synaptobrevinu a homolog nSec1 (rodina SNARE a SNARE-asociovaných proteinů<sup>2</sup>) u klíšťat *A. americanum*, došlo k utlumení schopnosti klíšťat sát, což bylo zřejmě způsobeno snížením schopnosti sekrece antikoagulační látky do slin (Karim *et al.* 2004a; 2004b). Další pokusy s využitím RNAi pro výzkum proteinů slinných žláz klíšťat jsou shrnuty v článku Dr. Ramakrishnan (2005).

Další studie se zaměřovaly na zkoumání funkce subolesinu. Tomuto proteinu bylo věnováno velké množství studií, například u druhů *Dermatocentor marginatus*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes scapularis* a dalších. U většiny těchto zástupců byla zjištěna snížená koncentrace mRNA subolesinu. Tento jev vedl k úbytku hmotnosti klíšťat, a k snížení schopnosti samic klást vajíčka a k celkovému poklesu vitality jedinců (Fuente *et al.* 2006a; 2006b; Nijhof *et al.* 2007). Další funkce subolesinu byly prokázány v pozdějších studiích. Včetně jeho vlivu na genovou expresi (Fuente *et al.* 2008). Subolesin je také jeden z důležitých ochranných antigenů, na který je cílen výzkum pro vývoj klíštěcích vakcín. Důležitou studii provedl tým Dr. Fuente na klíštěti *I. scapularis*, kdy za pomoci RNAi provedli mapování obraných antigenů klíštěte (Fuente *et al.* 2005). Výzkumu antigenů klíšťat jako možných cílů pro výrobu klíštěcích vakcín se věnuje mnoho studií z posledních let (Almazán *et al.* 2010; Fuente *et al.* 2010a; Merino *et al.* 2011).

RNAi byla použita také v problematice funkce střevních antikoagulantů a trávicích enzymů – různé druhy cysteinových a aspartátových lysozomálních proteáz. Jednou z proteáz druhu *Haemaphysalis longicornis* je haemalin, důležitý pro rozklad krve v trávicím systému klíštěte a inhibici agregace krevních destiček. Po jeho silencingu došlo u klíšťat k znemožnění sání (Liao *et al.* 2009). Další enzym podílející se na štěpení proteinů ve střevě, je HILgm2 (asparaginilová endopeptidáza z rodiny legumian proteinů), jehož funkci určil za pomoci

<sup>2</sup> Rodina SNARE proteinů hraje hlavní funkci při fúzi membránových váčků a buněčné sekreci.

RNAi Alim *et al.* (2008). Využití RNAi metody umožnilo objasnění metabolismu železa u klíštěte *I. ricinus*. Bylo zjištěno, že sekretorický ferritin 2 hraje významnou roli při vstřebávání železa z nasáté krve a jeho využití v dalších tkáních. Po silencingu mRNA pro ferritin 2 došlo k výrazným obtížím při sání klíšťat (Hajdusek *et al.* 2009). Tyto poznatky jsou využity v dalších výzkumech, které se zaměřují na vývoj eventuálních „očkovacích“ látek proti klíšťatům (Hajdusek *et al.* 2010).

Střevní a slinné proteiny kromě trávení krve a antikoagulačních funkcí, mají velký význam při imunitní reakci a toleranci patogenů přenášených klíšťaty. Zkoumání interakce mezi klíštětem a bakterií způsobující lymeskou boreliózu (*B. burgdorferi*) se věnují mnohé studie. Jedna z nich je zaměřena na proteiny ISAC a jejich umlčení za pomoci dsRNA (podávané v potravě) u nymf klíštěte *I. scapularis*. Důsledkem snížení exprese skupiny proteinů ISAC došlo ke snížení počtů borelií v trávicí soustavě klíštěte (Soares *et al.* 2005). Další skupinou střevních proteinů jsou TROSPA, přes které se bakterie váže na střevní epitel klíšťat. Po umlčení mRNA TROSPA genů došlo opět ke snížení počtů bakterií v klíštěti (Pal *et al.* 2004). Pomocí RNAi byla zkoumána funkce slinného proteinu Salp15 u klíšťat rodu *Ixodes*. Ukázalo se, že tento protein hraje roli při interakci s *B. burgdorferi*, k jejíž povrchovým proteinům má komplementární vazebné domény. Mimo jiné také způsobuje inhibici aktivace CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů při sání na hostiteli (Hojgaard *et al.* 2009).

Na roli defensinů a proteinů tvořící součást parazitiformní vakuoly (GTS, SelM, vATPasu, apod.) v interakci mezi klíšťaty a bakterií *Anaplasma marginale* se zaměřují studie Kocan *et al.* (2008, 2009). Výsledky pokusů týkajících se interakce druhů *Anaplasma* spp. s různými druhy klíšťat a možnosti využití těchto poznatků v přípravě vakcín proti klíšťatům shrnuje Fuente *et al.* (2010b).

U protozoálního patogenu *Babesia bovis* a přenašeče *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* byla RNAi využita pro silencing genů immunophilinu „Imnp“ (ovlivňujícího velké množství metabolických procesů v klíšťatech), lipocalinu (Lpc rodina proteinů mající mnoho funkcí) a inhibitoru serinové proteázy (Spi), která zabraňuje koagulaci krve při sání. Snížení exprese těchto genů vedlo ke snížení životaschopnosti samic *R. microplus* při infekci *B. bovis*, avšak ne ke zvýšení infekce. Při silencingu Imnp navíc došlo k nárůstu infekce *B. bovis* u larválních stádií klíšťat, z čehož se usuzuje, že Imnp hraje roli při regulaci transovariálního přenosu infekce *B. bovis* (Bastos *et al.* 2009). Gen Bm86V byl zkoumán za pomoci RNAi i v další studii, kdy byla prokázána zásadní důležitost tohoto genu pro přežití samic *R. microplus* po sání na skotu infikovaném *B. bovis* (Bastos *et al.* 2010). Tyto poznatky jsou zásadní pro vývoj vakcín proti klíšťatům.

### 3.2 RNAi u zástupců čeledi Culicidae

Komárovití (Diptera: Nematocera: Culicidae) jsou krevsající členovci s celosvětovým rozšířením (s výjimkou polárních a subpolárních oblastí) a do této čeledi je řazeno více jak 3400 druhů. Na hostitelích, kterými jsou obratlovci, parazitují výhradně samičky komárů. Komáři jsou přenašeči velkého množství původců virových onemocnění člověka (např. Dengue virus, virus žluté zimnice, West Nile virus, atd.), mimo to přenášejí také závažná onemocnění způsobená parazitickými prvky (malárii) a helminty (lymfatické filariózy). Hlavními medicínsky významnými podčeleděmi jsou Anophelinae a Culicinae.

Poprvé byla RNAi využita pro zkoumání a ověření funkce glykoproteinu z rodiny TEP – „thioester containing protein“ (konkrétně aTEP-1), který se významně podílí na buňkami zprostředkované imunitní reakci komára vůči bakteriím. V tomto pokusu se podařilo na buněčných kulturách odvozených od hemocytů *Anopheles gambiae* prokázat vazbu TEP na gram-negativní (*E. coli*) i na gram-pozitivní (*Staphylococcus aureus*) bakterie. Za pomoci RNAi se podařilo ověřit funkci TEP jako opsoninu pro fagocytózu gram-negativních bakterií (*E. coli*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*). Po umlčení genu pro TEP došlo ke snížení fagocytické aktivity vůči těmto gram-negativním bakteriím. U gram-pozitivních bakterií nebyl opsonizační účinek TEP potvrzen (Levashina *et al.* 2001). Rok poté byla zkoumána funkce antimikrobiálního proteinu defensinu u komára *An. gambiae*. Defensin je po bakteriální infekci exprimován v tukovém tělese komára a po infekci *Plasmodium* spp. se spustí jeho exprese také ve střevě a slinných žlázách (možná antiprotozoální funkce). Po mikroinjekční aplikaci dsRNA do hrudi komára došlo ke snížení koncentrace mRNA pro defensin. Zároveň došlo ke vzrůstu infekce gram-pozitivními bakteriemi. Při sledování vlivu úbytku defensinu na infekci *Plasmodium berghei* nebyla zaznamenána žádná změna v rozsahu infekce ani v morfologii plasmodia. Tyto výsledky tudíž potvrdily antimikrobiální funkci defensinu, nikoliv však jeho antiprotozoální funkci (Blandin *et al.* 2002). Na zmíněný TEP protein je zaměřeno mnoho výzkumů, které prokazují jeho antimalarickou funkci. Po umlčení genu TEP došlo k výraznému zesílení infekce *P. berghei* u *An. gambiae*. Tento protein také ovlivňuje vektoriální kapacitu komárů (Blandin *et al.* 2004). Problematiku imunity u *An. gambiae* a vlivu hemocytární dráhy a TEP proteinu na nákazu *Plasmodium* spp. řeší Blandin *et al.* (2008). Dalšími proteiny hrající důležitou roli při interakci plasmodia s komáry jsou LRIM1 a APL1 patřící do skupiny LRR proteinů („leucine-rich repeat“). Stejně jako u RNAi TEP proteinu došlo i u těchto LRR proteinů při jejich umlčení k nárůstu infekce komára plasmodiem (Fraiture *et al.* 2009). Díky předešlé sekvenaci genomu *An. gambiae*

(Holt *et al.* 2002) bylo možné nalézt homology DCR (agDCR2) a AGO proteinů (agAGO2, agAGO3) charakteristické pro RNAi dráhu. Mimo jiné bylo prokázáno, že RdRP nejsou v komárech přítomné nebo se šíření siRNA mezi tkáněmi *An. gambiae* neúčastní (Hoa *et al.* 2003).

RNAi byla u *Aedes aegypti* využita pro umlčení genu pro GATA protein – faktor snižující expresi vitelogeninu<sup>3</sup> ve fázi před sáním komára. Pro aktivaci RNAi dráhy vedoucí k degradaci mRNA GATA represoru zvolili vědci vnesení dsRNA za pomoci virového vektoru. Do vektoru odvozeného od Sindbis viru vložili potřebnou sekvenci pro dsRNA GATA jak v „sense“, tak i v „antisense“ orientaci. Po injekci vektoru do komára a jeho expresi došlo ke zvýšení hladiny vitelogeninu, což svědčilo o snížení hladiny GATA, inhibitoru exprese vitelogeninu (Attardo *et al.* 2003).

Slinné proteiny hrají významnou roli jak při interakcích komára a hostitele (především při alergických reakcích a antihemostatických aktivitách), tak při ovlivnění vývoje patogenů přenášených komáry. Metoda RNAi byla pro zkoumání funkce slinných proteinů využita až v roce 2006, a to konkrétně u siRNA komplementární k mRNA pro slinnou apyrázu. Tento pokus byl proveden na *An. gambiae* a jeho výsledkem bylo úspěšné snížení exprese apyrázy. Muselo však být použito velké množství dsRNA oproti případům umlčování genů exprimovaných hemocyty či ve střevě (Boisson *et al.* 2006). V další studii byla RNAi využita ke zkoumání embryogeneze nervové soustavy u dvou druhů komárů *Ae. aegypti* a *An. gambiae* (Clemons *et al.* 2011).

Díky RNAi se poslední roky daří objasnit funkce mnohých proteinů komárů, které mají významný vliv na vývoj přenášených patogenů. Výzkum je především zaměřen na imunitu komárů vůči *Plasmodium* spp., dále pak na imunitní odpověď, na přirozené využití RNAi dráhy vůči virovým onemocněním a v neposlední řadě také na zkoumání funkce proteinů metabolismu.

---

<sup>3</sup> Vitelogenin je jeden z hlavních prekurzorů proteinů vaječného žloutku.



### 3.3 RNAi u zástupců podčeledi Phlebotominae

Flebotomové (Diptera: Nematocera: Psychodidae) jsou drobný hematofágní hmyz rozšířený v tropických a subtropických oblastech celého světa. Do této podčeledi je řazeno více jak 700 druhů a nejdůležitějšími rody jsou *Phlebotomus* (rozšířený ve Starém světě) a *Lutzomyia* (v Novém světě). Flebotomové jsou přenašeči významných onemocnění, jejichž původci jsou bakterie (*Bartonella bacilliformis* způsobující horečnaté onemocnění „Oroya fever“ či chronické „Verruca peruviana“), viry (*Phlebovirus* způsobující horečku papatačiů) a medicínsky nejvýznamnější leishmaniózy působené parazitickými prvky rodu *Leishmania*.

První využití RNAi metody u flebotomů bylo popsáno u druhu *Lutzomyia longipalpis*. Pro umlčení byl vybrán gen xanthin dehydrogenáza (XDH) hrající roli při rozkladu xanthinu na urát. Urát má antioxidační funkci, která je využita při obraně flebotoma před kyslíkovými radikály (ROS) vznikajícími rozkladem hemu z natrávené krve. Po mikroinjekční aplikaci dsRNA došlo ke snížení exprese XDH a po sání došlo ke snížení koncentrace urátu v celém těle samic *Lu. longipalpis*. Též se snížila životaschopnost jedinců s umlčeným genem pro XDH, z čehož se dá soudit, že XDH hraje zásadní roli v obraně proti ROS (Sant'Anna *et al.* 2008). Výše zmíněný pokus by ovšem nejspíše nebylo možné úspěšně realizovat, pokud by předtím nebyl optimalizován systém RNAi na buněčné kultuře odvozené od embryonálních buněk *Lu. longipalpis* za pomoci rekombinantních virových částic odvozených od West Nile viru (Pitaluga *et al.* 2008). V další studii byla pomocí RNAi prokázána u *Lu. longipalpis* důležitost katalázy, enzymu redukujícího ROS. Po silencingu mRNA katalázy se zvýšila úmrtnost *Lu. longipalpis*, v důsledku zvýšení ROS (Diaz-Albiter *et al.* 2011).

Další studie se věnují problematice přežití leishmanií ve střevech flebotomů. Jedna z nich zkoumá vliv trypsinu I na životaschopnost *Le. mexicana* v *Lu. longipalpis*. V předešlých pokusech bylo prokázáno, že při infekci flebotoma leishmanií dojde ke snížení „trypsin – like“ střevní aktivity (Borovsky a Schlein 1987). Pro ověření této teorie vědci provedli inhibici trypsinu pomocí dsRNA. Podle předpokladu došlo ke snížení exprese trypsinu a zároveň ke zmnožení infekce leishmanií ve střevě flebotoma (Sant'Anna *et al.* 2009). V dalším pokusu byla využita dsRNA pro umlčení genu PpChit1, což je střevní chitináza *Phlebotomus papatasi*. Produkt PpChit1 genu je zapojen do maturace a následně i degradace peritrofické matrix ve střevě. Peritrofická matrix je jedno z několika míst, kde dochází ke kritickým krokům při vývoji leishmanií v přenašeči. Po silencingu chitinázy došlo k redukci populace *Le. major* ve střevě *P. papatasi* (Coutinho-Abreu *et al.* 2010). Výsledky těchto pokusů by se daly využít při výzkumu vakcín proti leishmaniím.

### 3.4 RNAi u zástupců čeledi Reduvidae

Čeď Reduvidae (zákeřnicovití) je jednou z největších z podřádu Heteroptera. Všichni její zástupci jsou predátoři. Je sem řazena podčeď Triatominae, zahrnující krevsající ploštice, které jsou ve Střední a Jižní Americe přenašeči *Trypanosoma cruzi* způsobující závažné lidské onemocnění – Chagasovu nemoc. K přenosu *T. cruzi* z ploštice na člověka dochází kontaminativně, kdy ploštice při sání na člověka zároveň defekují a spolu s výkaly vylučují infekční stádia trypanosom. Ty do těla člověka vnikají drobnými oděrkami, například v místě sání ploštice nebo přes spojivku.

Poté co v posledních letech došlo k velkému rozvoji sekvenování a vzniku nových genomových knihoven, je třeba určit funkce velkého počtu neznámých genů. U krevsajících ploštic je výzkum zaměřen především na neznámé geny exprimované ve slinných žlázách a ve střevě, které by mohly ovlivňovat průběh sání i imunitní reakci hostitele.

V roce 2006 Dr. Araujo se svými kolegy optimalizoval proces vnášení dsRNA pro ploštice podčeď Triatominae. První pokusy s RNAi provedli na druhu *Rhodnius prolixus*, kdy porovnávali úspěšnost silencingu slinného nitroporinu 2 (NP2)<sup>4</sup> při mikroinjekčním vnášení a při přidání dsRNA do potravy ploštic. Umlčení NP2 proběhlo v obou případech, ale vnášení dsRNA za pomoci mikroinjekcí se ukázalo být úspěšnější (Araujo *et al.* 2006). Funkce nitroporinů byla zkoumána i v dalších letech, kdy po silencingu NP1 až NP4 docházelo ke zvýšení koagulace krve, ale pouze pokud ploštice sály na menších cévách. Při sání ploštic na větší ocasní cévě myši se viskozita krve a schopnost sání ploštic nezměnila. Za změnu hustoty krve nejsou zodpovědné pouze slinné nitroporiny, ale na tomto jevu se podílí více faktorů (Araujo *et al.* 2009).

V další studii byla využita RNAi u *Triatoma brasiliensis* pro funkční analýzu střevního proteinu inhibujícího trombin, zvaného brasiliensin, který je exprimován v přední části střeva ploštic. Po mikroinjekčním vnesení dsRNA došlo ke snížení koncentrace brasiliensinu, což vedlo ke zvýšení viskozity přijímané krve a tím ke zvýšení tlaku ve střevě a snížení schopnosti sát (Araujo *et al.* 2007).

Poznatky z předchozích pokusů prokazuje a shrnuje Dr. Paim a její kolegyně ve srovnávací studii, zaměřené na funkce střevních i slinných antikoagulantů a míru jejich exprese u ploštic druhů *T. brasiliensis*, *T. infestans* a *R. prolixus*. Dále se zabývají tím, do jaké míry tyto antikoagulanty ovlivňují výběr hostitele pro sání a rychlost samotného sání (Paim *et al.* 2011).

---

<sup>4</sup> Nitroporiny jsou proteiny obsahující Hem-skupinu, která váže oxid dusnatý v závislosti na okolním pH. Při sání ploštice dojde ke změně pH a k odvázní NO, což vede k inhibici agregace destiček a vasodilataci.

### 3.5 RNAi u zástupců čeledi Glossinidae

Glossiny (Diptera: Glossinidae) neboli mouchy tse-tse, jsou krevsající členovci rozšíření v Subsaharské Africe, především v tzv. „glossinovém pásmu“. Toto území je ohraničeno ze severu Saharou a z jihu pouští Kalahari (pás mezi 14° s. š. a 29° j. š.). Glossiny jsou vektory afrických trypanosom, které způsobují vážná onemocnění člověka (spavá nemoc) a zvířat (nagana). Dále je jim věnována kapitola 4.2 *Trypanosomatida*.

Rod *Glossina* se dělí na tři podrody: *Glossina* čili „morsitans“, *Nemorhina* („palpalis“) a *Austenina* („fusca“). První dva podrody jsou medicínsky a veterinárně důležité: glossiny skupiny morsitans (též glossiny savan) přenášejí *Trypanosoma brucei rhodosiense*, glossiny skupiny palpalis (tzv. říční glossiny) přenášejí především *Trypanosoma brucei gambiense*.

Metoda RNAi se u much tse-tse využívá především pro výzkum imunitních vztahů mezi glossinou a trypanosomami a obdobně také ve vztahu mezi glossinou a člověkem (jako jejím hostitelem).

Prvně byla RNAi u much tse-tse použita pro prokázání antimikrobiální funkce střevních proteinů u *Glossina morsitans morsitans*. Za pomoci mikroinjekčně vnášených dsRNA byl umlčován gen pro transkripční faktor Relish (GmmRel), který spouští transkripci antimikrobiálních peptidů (AMP) attacinu a cecropinu. Po silencingu mRNA pro GmmRel se snížila přirozená úmrtnost trypanosom ve střevě glossiny. Pravděpodobně proto, že došlo k zastavení transkripce AMP a tím i snížení přirozené imunity ve střevě glossiny (Hu a Aksoy 2006). O rok později Dr. Nayduch s Dr. Aksoy zaměřily svůj pokus přímo na umlčení mRNA attacinu, který je exprimován v tukovém tělese much tse-tse. Tímto pokusem chtěly zjistit, proč jsou některé druhy glossin méně (*G. pallidipes*, *G. palpalis palpalis*) či více (*G. morsitans morsitans*) náchylné k infekci trypanosomami. Po silencingu mRNA se snížila koncentrace attacinu v *G. pallidipes*, čímž se stala náchylnější k infekci. Byla tak potvrzena antitrypanosomální funkce AMP attacinu (Nayduch a Aksoy 2007).

Další pokusy zkoumající vliv bakterií [symbiotických (*Eodalis glossinidius*) a patogenních (*Escherichia coli* K12)] na střevní imunitu glossin a jejich toleranci k bakteriálním infekcím prokázaly, že jednu z hlavních rolí v této problematice hraje protein rozeznávající peptidoglykan bakteriální stěny (PGRP-LB) (Weiss *et al.* 2008). Při degradaci mRNA PGRP-LB u glossin s mutualistickými bakteriemi (*Wegglesworthia glossinidae*) došlo ke snížení počtu bakterií ve střevě glossiny a také k zvýšení vnímavosti vůči nákaze trypanosomami. Zároveň však došlo k aktivaci IMD („immune deficienci“ signální dráhy)

vedoucí k expresi AMP (ale ne k snížení infekce trypanosomamy). Tento rozpor mezi zvýšením senzitivity k trypanosomální infekci a antitrypanosomální funkcí AMP, ke kterému dochází při regulaci imunity pomocí PGRP-LB, zatím není úplně objasněn. Tato problematika vlivu symbiotických bakterií a PGRP-LB na imunitní odezvu vůči trypanosomám je složitá a vyžaduje další zkoumání (Wang *et al.* 2009).

V předchozích výzkumech vědci vnášeli interferující dsRNA do glossin za pomoci mikroinjekcí. V roce 2009 tým Dr. Walshe vyzkoušel použít poměrně novou metodu pro vnesení dsRNA do much tse-tse. Začali přidávat dsRNA glossinám přímo do potravy. Tímto způsobem se podařilo umlčet antimikrobiální střevní EP protein s přibližně stejnou účinností jako při aplikaci dsRNA mikroinjekčně. Výhodou přidání dsRNA do potravy je minimální invazivita metody což vede ke snížení mortality glossin a minimalizuje se i zásah do přirozeného prostředí jejich střeva. Nevýhodou ovšem je, že se takto dají umlčovat pouze geny exprimované ve střevě. Při pokusu o umlčení mRNA transferinu exprimovaného v tukovém tělese glossiny, nebyla hladina proteinu prokazatelně snížena. V důsledku toho vědci usuzují, že v mouchách tse-tse není funkční mechanismus pro šíření siRNA skrze tkáň (Walshe *et al.* 2009). RNAi byla využita i pro zkoumání antitrypanosomální funkce EP proteinu ve střevě *G. m. morsitans* a *G. p. palpalis* při nákaze *T. b. brucei* a *T. congolense* (Haines *et al.* 2010).

Dr. Caljon a jeho kolegové se ve svých pokusech zaměřují na vztah glossin a jejich hostitelů. V roce 2009 prokázali alergenní funkci TAg5 proteinu ve slinách glossin (Caljon *et al.* 2009). O rok později zaměřili výzkum na slinnou nukleotidázu (5Nuc), která zamezuje agregaci krevních destiček hostitele a již agregované destičky rozrušuje. Po umlčení mRNA pro 5Nuc došlo k snížení protisrážlivé funkce slin glossin a značnému omezení jejich možnosti sát krev hostitele (Caljon *et al.* 2010).

## 4 RNAi u protozoálních patogenů přenášených krevsajícími členovci

### 4.1 Problematika RNAi a malých RNA u protozoálních parazitů

Poté, co se dostala RNAi do širšího povědomí vědecké společnosti, začala se zkoumat její přítomnost a využití u protozoálních patogenů. Jako u prvního parazita byla funkce dsRNA objevena u *Trypanosoma brucei*, a to pokusem, kdy při transfekci syntetické dsRNA nesoucí sekvenci genu pro  $\alpha$ -tubulin 5'UTR („untranslated region“) došlo k degradaci mRNA  $\alpha$ -tubulinu, a tím k celkovému snížení syntézy  $\alpha$ -tubulinu (Ngô *et al.* 1998). Po tomto objevu se nabízela RNAi jako jedna z velice slibných metod pro úpravu exprese genů protozoálních parazitů.

Bohužel po prvotním nadšení z teoretických možností RNAi vědci zjistili, že RNAi dráha zdaleka není funkční u všech parazitických protozoí. Do roku 2008 byla RNAi dráha, nebo její část, prokázána u osmi protozoálních patogenů (viz *Tab. 2*). Parazitické prvoky tak lze rozdělit do třech skupin dle přítomnosti a funkčnosti RNAi dráhy (Militello *et al.* 2008):

- I. Skupina prvoků, u kterých byla RNAi prokázána bioinformatickými metodami (hledání orthologů enzymů RNAi dráhy) a má i funkční podporu. Metodu RNAi je u nich možné experimentálně využít.
- II. Skupina prvoků, u kterých se buď za pomoci bioinformatických srovnávacích metod povedlo nalézt geny pro RNAi enzymy nebo se povedla prokázat alespoň část funkční dráhy RNAi. Samotnou metodu RNAi se však nepodařilo experimentálně využít.
- III. Skupina prvoků, u kterých nebyly dráha RNAi ani enzymy, které se na ní podílejí, prokázány.

Tabulka 2: Přítomnost RNAi dráhy u parazitických prvoků (převzato a upraveno podle Militello et al. 2008)

Organismus	Skupina dle přítomnosti RNAi	Ortholog Dicer	Ortholog Argonaute	Průkaz RNAi
<i>Entamoeba histolytica</i>	I	ano	ano	ano
<i>Toxoplasma gondii</i>	I	ano	ano	ano
<i>Trypanosoma brucei</i> *	I	ano	ano	ano
<i>Trypanosoma congolense</i> *	I	ano	ano	ano
<i>Giardia intestinalis</i>	II	ano	ano	ano <sup>1</sup>
<i>Leishmania braziliensis</i> *	II	ano	ano	?
<i>Plasmodium spp.</i> *	II	ne	ne	ano <sup>2</sup>
<i>Trichomonas vaginalis</i>	II	ano	ano	?
<i>Trypanosoma cruzi</i> *	II	ne	ano <sup>3</sup>	ne
<i>Babesia bovis</i>	III	ne	ne	?
<i>Cryptosporidium spp.</i>	III	ne	ne	?
<i>Eimeria tenella</i>	III	ne	ne	?
<i>Leishmania infantum</i> *	III	ne	ne	?
<i>Leishmania major</i> *	III	ne	ne	ne
<i>Theileria spp.</i>	III	ne	ne	?

\* – Více informací o problematice RNAi u těchto skupin je uvedeno v dalších kapitolách

1 – Ve výzkumu Rivero et al. (2010) se podařila aktivovat RNAi dráha pomocí dlouhých endogenních dsRNA, ne však pomocí krátkých dsRNA (ať už exogenního, či endogenního původu), nicméně výsledky je třeba podrobit dalšímu výzkumu.

2 – Později bylo prokázáno, že u *Plasmodium spp.* RNAi přítomna není (více v kapitole 4.3.1.)

3 – Byl objeven ortholog AGO proteinu, ale jeho funkce v RNAi u *T. cruzi* je nejasná (Garcia Silva et al. 2010).

? – Zatím nebyl funkčně ověřen průkaz RNAi dráhy.

## 4.2 Trypanosomatida

Do řádu Trypanosomatida (Excavata: Euglenozoa: Kinetoplastea) náleží významné lidské i zvířecí patogeny, které se vyskytují převážně v tropických, subtropických a mírných oblastech jak Starého, tak i Nového světa. Hlavní lékařsky a veterinárně významní zástupci spadají do rodů *Trypanosoma* a *Leishmania*. Oba rody jsou řazeny mezi dvouhostitelská (digenetická) Trypanosomatida, kdy je přenos na hostitelského obratlovce zajištěn hmyzím přenašečem (Diptera a Heteroptera).

Do rodu *Trypanosoma* řadíme původce americké trypanosomatózy (Chagasovy choroby), kterým je *Trypanosoma cruzi*, která je přenášena plošticemi podčeledi Triatominae. Další zástupce je *Trypanosoma brucei* a její tři poddruhy: *T. brucei brucei*, *T. brucei rhodesiense* a *T. brucei gambiense*, které v Africe přenášejí mouchy tse-tse (*Glossina* spp.). *T. b. brucei* způsobuje veterinárně závažné onemocnění dobytka – nagana, zatímco další dva poddruhy způsobují lidskou spavou nemoc; *T. b. rhodesiense* akutní formu nemoci (východoafrickou) a *T. b. gambiense* chronickou formu nemoci, tzv. západoafrickou (shrnuto podle Barrett *et al.* 2003).

Druhým rodem náležícím do řádu Trypanosomatida je rod *Leishmania*, jehož přenašeči jsou zástupci podčeledi Phlebotominae (Diptera: Nematocera). Rod *Leishmania* je rozšířen jak ve Starém světě, kde je přenášén rodem *Phlebotomus*, tak i v Novém světě, kde jsou jeho přenašeči flebotomové rodu *Lutzomyia*. Zástupci rodu *Leishmania* způsobují onemocnění zvané leishmanióza, které může mít různé projevy od kožních až po život ohrožující orgánové infekce.

### 4.2.1 RNAi dráha v *Trypanosoma brucei*

Jak již bylo zmíněno *Trypanosoma brucei* patří mezi první organismy, u nichž bylo popsáno umlčení genu za pomoci dsRNA (Ngô *et al.* 1998). Díky tomu je u ní RNAi dráha prozkoumána nejlépe ze všech parazitických prvoků. Již v roce 2001 se podařilo týmu vědců na univerzitě v Yale (Djikeng *et al.* 2001) identifikovat a osekvenovat siRNA v *T. brucei* a zjistit, že většina siRNA je odvozena od retroposonů – viz níže.

*T. brucei* má dva orthology Dicer proteinu. Jeden z nich je lokalizován v cytoplasmě – TbDCL1 (Shi *et al.* 2006) a druhý je jaderný – TbDCL2 (Patrick *et al.* 2009). Zatím jediné rozpoznatelné domény těchto proteinů jsou dvě domény s aktivitou RNázy III (RNáza IIIa, RNáza IIIb) a PAZ doména. Jejich vzájemná poloha v DCL proteinech *T. brucei* způsobuje, že

štěpené siRNA jsou o něco delší než u *C. elegans* (Patrick *et al.* 2009). Další protein nezbytný pro fungování RNAi je Argonaute protein TbAGO1 (jinak také „Slicer“), který je lokalizován jak v cytoplasmě, tak v jádře. Mimo jiné se ukázalo, že TbAGO1 je nezbytný pro regulaci transkriptů vzniklých přepisem retroposonů vyskytujících se v genomu *T. brucei*. Dále pak hraje roli při mitotické segregaci chromozomů, která je pravděpodobně spojená s přestavbami pericentromerického heterochromatinu (Shi *et al.* 2004, 2006; Durand-Dubief *et al.* 2007; Patrick *et al.* 2009).

Díky sekvenaci se podařilo určit, že většina siRNA *T. brucei* je odvozena od mobilních genetických elementů (retroposonů) a následně se ukázalo, že v genomu *T. brucei* jsou nejméně dvě skupiny těchto retroposonů. První skupinou jsou INGI retroposony a do druhé skupiny patří tzv. SLACS (spliced leader associated conserved sequence) (Djikeng *et al.* 2001). Později byla objevena další skupina siRNA, která je odvozena od 147 pb dlouhých repetitivních sekvencí. Tato skupina byla nazvána CIR147 („chromosome internal repeats“).

Díky těmto poznatkům se zdá, že hlavní funkcí RNAi u *T. brucei* je ochrana genomu před retroposony a jinými mobilními genetickými elementy, které narušují genomovou stabilitu. Tento fakt podporuje také pokus, kdy trypanosomy bez TbAGO1 vykazovaly vysoké procento přestaveb v místech genomu, kde se nacházejí právě oblasti se SLACS (shrnutí v Patrick *et al.* 2008, 2009).

Hlavním bodem výzkumu pomocí RNAi u *T. brucei* je hledání esenciálních genů, bez kterých není možný další vývoj parazita. Syntéza exogenních dsRNA pro umlčování konkrétních genů je nyní možná jak *in vitro*, tak *in vivo* systémech, a to jak v krevních, tak i v procyklických formách přímo v přenašeči (Peacock *et al.* 2005). Pro syntézu dsRNA se nejčastěji využívá tetracyklin-redukovatelný T7 expresní systém, který zajišťuje vyšší stabilitu dsRNA a vyšší úspěšnost degradace mRNA než například vnášení dsRNA elektroporací (Wang *et al.* 2000; Morris *et al.* 2001).

RNAi u *T. brucei* byla využita například při zkoumání funkce a skladby proteinů paraflagelární tyče bičíku (Bastin *et al.* 2000). V dalších pokusech se podařilo prokázat, že při umlčení mRNA pro FLA1 protein bičíku v procyklických formách *T. brucei*, dojde nejen k narušení funkce bičíku, ale také k poruchám ve vývoji buněk, konkrétně k narušení schopnosti cytokinese (LaCount *et al.* 2002). Další výzkumy se věnovaly například metabolickým drahám, kompartmentaci enzymů do glykosomů (Guerra-Giraldez *et al.* 2002) a zkoumání funkce mitochondriální topoizomerázy II (Wang a Englund 2001). Stejně tak byla RNAi využita pro zkoumání funkce trypanosomálních sfingolipidů, nutných pro



správný průběh buněčného cyklu, a jejich syntézy *de novo* (Fridberg *et al.* 2008). Jiným esenciálním enzymem, jehož funkce byla ověřena pomocí RNAi, je farnesyl pyrofosfát syntáza (TbFPPS) (Montalvetti *et al.* 2003). Další studie jsou věnovány mitochondriálním esenciálním genům. Pomocí RNAi byl umlčován frataxin, což je protein, na kterém závisí správné fungování metabolismu mitochondrie. Po silencingu genu došlo především ke zhoršení tvorby Fe-S center, nezbytných pro mnoho klíčových proteinů respiračního řetězce mitochondrií (Long *et al.* 2008). Mitochondriálnímu metabolismu je věnován i další výzkum, kdy za pomoci dsRNA byly degradovány mRNA pro cystein desulfurázu (TbiscS) a metallochaperone (TbiscU) u procyklických forem trypanosomy. Silencing těchto genů vedl k inhibici mitochondriální i cytoplasmatické akonitázy z důvodu špatné maturace Fe-S center. Krom toho byla inhibována i transformace metabolických drah z procyklického stádia *T. brucei* na její krevní formu (Smíd *et al.* 2006). RNAi byla využita také při objasnění funkce proteinů metabolismu síry a selenu v *T. brucei* (Poliak *et al.* 2010).

Tyto pokusy zaměřené na umlčení a rozpoznání esenciálních genů dávají velkou šanci využití RNAi při vývoji nových léčiv proti spavé nemoci, kterou *T. brucei* způsobuje.

#### 4.2.2 RNAi u dalších trypanosom (*T. evansi*, *T. congolense* a *T. cruzi*)

V poslední době bylo prokázáno, že RNAi dráha je funkční také u dalších zástupců trypanosom. V roce 2004 Witola a jeho kolegové poprvé využili RNAi u *T. evansi* způsobující onemocnění „Surra“ u domácích zvířat. V tomto projektu použili vědci expresní systém pro *T. brucei* a aplikovali ho na *T. evansi*, kdy cíleně umlčovali gen transportéru pro adenosin (TevAT1), který hraje roli v resistenci proti některým léčivům (Witola *et al.* 2004).

RNAi je také funkční u *T. congolense*, která způsobuje jednu z nejzávažnějších forem onemocnění nagana. Poprvé se podařilo u této trypanosomy prokázat RNAi roku 2002, a to s využitím expresního systému *T. brucei* (Inoue *et al.* 2002). O rok později byla zkoumána funkce trypanosomálního hsp 70 („heat shock protein“) (Bannai *et al.* 2003). V posledních letech byl vytvořen vlastní expresní systém pro *T. congolense*, jehož pomocí se zkoumají funkce proteinů buněčného cyklu *in vitro* (Coustou *et al.* 2010).

Jak již bylo zmíněno, problémem zůstává RNAi u *T. cruzi*, která je původcem americké trypanosomatózy. Zatím se nepodařilo prokázat přítomnost RNAi dráhy ani orthologů Dicer proteinů, a proto se soudí, že tato dráha nebo její podstatná část byla evolučně potlačena (Beverley 2003). Ovšem i přes to, že *T. cruzi* nejspíše nemá funkční RNAi dráhu, obsahuje

její genom mobilní genetické elementy, které nejsou výrazně pomnožené. Usuzuje se tudíž, že *T. cruzi* používá k ochraně před retroposony nějakých jiných mechanismů (DaRocha 2004; El-Sayed *et al.* 2005). Otázka RNAi dráhy u *T. cruzi* byla znovu otevřena po objevu orthologu AGO proteinu (včetně poddomény PIWI), který je podle všeho exprimován po celou dobu životního cyklu trypanosomy (Garcia Silva *et al.* 2010). Tento objev nejspíše povede k dalšímu zkoumání využití umlčování genů pomocí dsRNA u této *T. cruzi*.

#### 4.2.3 RNAi u rodu *Leishmania*

U většiny druhů rodu *Leishmania* (*L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani*) nebyla RNAi dráha ani její komponenty prokázány (Ullu *et al.* 2004; Cerutti a Casas-Mollano 2006). Pokus o aplikaci RNAi metody u *L. donovani* a *L. major* byl neúspěšný. Vědci se pokoušeli umlčet mRNA pro  $\alpha$ -tubulin, avšak po vnesení dsRNA nedošlo k žádné změně v morfologii leishmanií a hladina tubulinu v buňkách zůstala na stejné úrovni (Robinson a Beverley 2003). Jedinou výjimkou je *L. braziliensis*, u které byly pomocí sekvenčně-srovnávacích metod prokázány orthology Dicer a Argonaute proteinů (Peacock *et al.* 2007). *L. brasiliensis* na rozdíl od předchozích leishmanií (*L. major*, *L. mexicana*, *L. donovani*), u kterých nebyla RNAi zaznamenána, patří do podrodu *Viannia* (Lainson & Shaw, 1987). Evoluční historie tohoto podrodu pravděpodobně rozhodla o tom, že u něj je RNAi dráha přítomna. V další studii se ukázalo, že siRNA jsou u *L. braziliensis* odvozené od SLAC retroposonových elementů stejně jako u *T. brucei*, a mají i stejnou délku – 25 nt. (Lye *et al.* 2010).

### 4.3 Apicomplexa

Do kmene Apicomplexa patří velké množství veterinárně i lékařsky významných intracelulárních (příp. epicelulárních) patogenů. Parazity přenášené krevsajícími členovci nalezneme zejména ve třídě Haematozoa. Hostitelem, ve kterém probíhá asexuální množení parazita (merogonie), je obratlovec, zatímco sexuální množení (gamogonie a sporogonie) probíhá ve členovci (Diptera, Ixodida), o kterém hovoříme jako o tzv. „vektoru“. V této třídě jsou dva řády lišící se částí svého vývojového cyklu: Haemosporida (čeledi Haemoproteidae a Plasmodiidae) a Piroplasmida (čeledi Babesiidae a Theileriidae).

Zástupci čeledi Haemoproteidae parazitují v buňkách endotelu, erytrocytech a leukocytech u plazů a ptáků. Jejich přenašeči jsou zástupci řádu Diptera např. kloši (Hippoboscidae), muchničky (Simuliidae) či tiplíci (Ceratopogonidae). Rody *Haemoproteus* a *Leucocytozoon* parazitují především u ptáků a mohou být vysoce patogenní.

Do čeledi Plasmodiidae řadíme medicínsky významný rod *Plasmodium* vyskytující se u savců, ptáků i plazů. Přenos je zprostředkován nakaženým vektorem – komárem, buď rodu *Anopheles* (savčí plasmodia) nebo rodu *Culex* a dalších rodů (ptačí, plazí a někdy savčí plasmodia).

Příslušníci řádu Piroplasmida parazitují v erytrocytech (případně leukocytech) obratlovců a jejich vektory jsou klíšťata (Ixodidae) a klíšťáci (Agrasidae). Do řádu Piroplasmida náleží dvě veterinárně (vzácně i medicínsky) významné čeledi: Babesiidae a Theileriidae. Důležitá onemocnění způsobená těmito zástupci jsou shrnuta v Tab. 3.

Tabulka 3: Přehled onemocnění způsobených parazity řádu Piroplasmida

Čeď	Druh	Název onemocnění	Možní hostitelé	Vektor
Babesiidae	<i>B. bovis</i>	„red water“	skot	<i>Ixodes</i> , <i>Rhipicephalus</i>
	<i>B. bigemina</i>	„texaská horečka skotu“	skot, případně člověk	
	<i>B. microti</i>	při napadení člověka „Nantuckett fever“	drobní savci, případně člověk	<i>Ixodes</i>
Theileriidae	<i>T. parva</i>	východoafrická pobřežní horečka skotu „East coast fever“	skot	<i>Rhipicephalus</i>

U čeledi Babesiidae ani u čeledi Theileriidae nebyla však přítomnost RNAi dráhy ani Dicer a Argonaute proteinů prokázána (Militello *et al.* 2008).

### 4.3.1 Možnosti RNAi u rodu *Plasmodium*

Mezi roky 2002 a 2006 proběhlo několik nezávislých výzkumů zaměřených na využití RNAi dráhy u *Plasmodium falciparum* a *Plasmodium berghei*. Značná část z těchto pokusů se snažila o umlčení genů esenciálních pro přežití plasmodia, například plasmodiální dihydroorotát dehydrogenázu (DHODH), enzym syntézy pyrimidinů. Po aplikaci siRNA došlo k inhibici růstu buněk (McRobert a McConkey 2002). V dalších pokusech byla využita metoda RNAi pro silencing transkripčního faktoru PfMyb1, kdy došlo ke snížení jeho koncentrace v buňkách a opět ke zpomalení růstu buněk (Gissot *et al.* 2005). Při použití siRNA pro cysteinové proteázy *P. falciparum* (falciparin 1 a 2) došlo k hromadění hemoglobinu v potravních vakuolách plasmodia a opět k pozastavení růstu buněk (Malhotra *et al.* 2002). V podobném pokusu Mohammed (2003) využil RNAi cysteinové proteázy u *Plasmodium berghei in vivo* v myši, tehdy došlo ke změnám potravní vakuoly a hromadění hemoglobinu. Ovšem při odstranění genu pro cysteinovou proteázu pomocí homologní rekombinace nedošlo k žádnému hromadění hemoglobinu, deformaci potravní vakuoly či k inhibici růstu buněk (Eksi *et al.* 2004). Tyto pokusy dávají naději pro využití RNAi při výrobě nových léků proti malárii, avšak zatím se nepodařilo nalézt orthology ani k Dicer ani k Argonaute proteinům (Rathjen *et al.* 2006).

V poslední studii z roku 2009 tým Dr. Bauma testoval RNAi u *P. falciparum* jak funkčními pokusy, kdy vnášeli dsRNA pro různé geny, tak použitím srovnávací analytické bioinformatické metody pro hledání orthologů k Dicer a Argonaute proteinu. Bohužel ani jeden těchto pokusů nebyl úspěšný. Předchozí zjištění RNAi v *Plasmodium* spp. vysvětlují tím, že dsRNA je pro plasmodia přirozeně toxická, což má za následek inhibici růstu buněk a hromadění hemoglobinu v potravních vakuolách. V další hypotéze připouštějí, že plasmodia mohou mít naprosto rozdílnou dráhu s dsRNA, která zatím nebyla analyzována (Baum *et al.* 2009). Přítomnosti malých RNA včetně siRNA u plasmodií a dalších zástupců kmene Apicomplexa je věnován článek z roku 2010 shrnující poznatky předešlých let (Matrajt 2010).

## 5 Závěr

V této bakalářské práci jsou shrnuty základní poznatky o RNA interferenci a jejím využití jako metody umlčování genů u krevsajících členovců a protozoálních patogenů, které jsou těmito členovci přenášeny. Využití metody RNAi u krevsajících členovců je velice slibné, jelikož s narůstajícím počtem informací o sekvencích genů se jeví RNAi jako vhodná metoda pro jejich funkční analýzu. Pomocí této metody se stále zlepšuje porozumění v oblasti metabolických drah, imunitních odezev či regulací vývojových cyklů u krevsajících členovců. Poznatky nabyté z těchto výzkumů se dále dají aplikovat při boji proti těmto parazitům a tím i patogenům, které členovci přenášejí. Je tedy pochopitelné, že nejvíce studií využívajících metodu RNAi bylo provedeno u komárů a klíšťat – nejčastějších roznašečů zárodků chorob. V obou případech se vědci nejvíce zaměřují na výzkum genů, které nějakým způsobem ovlivňují interakci mezi členovcem a protozoálním (v případě komárů) či bakteriálním (v případě klíšťat) patogenem.

U RNAi dráhy v protozoálních patogenech je výzkum zaměřen především na určení funkcí jednotlivých genů a zejména pak na geny potřebné k přežití či k transformaci do dalšího stádia životního cyklu. Problémem při užívání RNAi u protozoí je však stále nejasná přítomnost této dráhy u řady druhů parazitických prvoků.

V diplomové práci bych se chtěla zaměřit na využití RNAi u zástupců podčeledi Phlebotominae, kdy bych se snažila o umlčení genů hrajících roli při vzájemném působení leishmanií a flebotomů. Jako nejlepší metoda pro vnášení dsRNA do flebotomů se jeví mikroinjekční aplikace, která byla využita již v několika pokusech (Sant'Anna *et al.* 2008; 2009; Coutinho-Abreu *et al.* 2010; Diaz-Albiter *et al.* 2011). Další metodou, jejíž využití připadá v úvahu pro umlčování genů exprimovaných v trávicí soustavě a navíc je méně invazivní, je přidávání dsRNA flebotomům do potravy. Ovšem tento postup zatím nebyl u podčeledi Phlebotominae vyzkoušen. Nicméně byl úspěšně aplikován u klíšťat druhu *Ixodes scapularis* (Soares *et al.* 2005) a u krevsajících ploštic druhu *Rhodnius prolixus* (Araujo *et al.* 2006).

## 6 Přehled literatury

- Alim M A, Tsuji N, Miyoshi T, Islam M K, Huang X, Hatta T, Fujisaki K. 2008.** HILgm2, a member of asparaginyl endopeptidases/legumains in the midgut of the ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*, is involved in blood-meal digestion. *Journal of Insect Physiology* **54**: 573-85.
- Aljamali M N, Sauer J R, Essenberg R C. 2002.** RNA interference: applicability in tick research. *Experimental & Applied Acarology* **28**: 89-96.
- Aljamali M N, Bior A D, Sauer J R, Essenberg R C. 2003.** RNA interference in ticks: a study using histamine binding protein dsRNA in the female tick *Amblyomma americanum*. *Insect Molecular Biology* **12**: 299-305.
- Almazán C, Lagunes R, Villar M, Canales M, Rosario-Cruz R, Jongejan F, Fuente J de la. 2010.** Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitology Research* **106**: 471-9.
- Araujo R N, Santos A, Pinto F S, Gontijo N F, Lehane M J, Pereira M H. 2006.** RNA interference of the salivary gland nitrophorin 2 in the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) by dsRNA ingestion or injection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **36**: 683-93.
- Araujo R N, Campos I T N, Tanaka A S, Santos A, Gontijo N F, Lehane M J, Pereira M H. 2007.** Brasiliensin: A novel intestinal thrombin inhibitor from *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera: Reduviidae) with an important role in blood intake. *International Journal for Parasitology* **37**: 1351-8.
- Araujo R N, Soares A C, Paim R M M, Gontijo N F, Gontijo A F, Lehane M J, Pereira M H. 2009.** The role of salivary nitrophorins in the ingestion of blood by the triatomine bug *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 83-9.
- Attardo G M, Higgs S, Klingler K A, Vanlandingham D L, Raikhel A S. 2003.** RNA interference-mediated knockdown of a GATA factor reveals a link to anautogeny in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 13374-9.
- Bannai H, Sakurai T, Inoue N, Sugimoto C, Igarashi I. 2003.** Cloning and expression of mitochondrial heat shock protein 70 of *Trypanosoma congolense* and potential use as a diagnostic antigen. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **10**: 926-33.
- Barrett M P, Burchmore R J S, Stich A, Lazzari J O, Frasch A C, Cazzulo J J, Krishna S. 2003.** The trypanosomiases. *Lancet* **362**: 1469-80.
- Bastin P, Ellis K, Kohl L, Gull K. 2000.** Flagellum ontogeny in trypanosomes studied via an inherited and regulated RNA interference system. *Journal of Cell Science* **113**: 3321-8.
- Bastos R G, Ueti M W, Guerrero F D, Knowles D P, Scoles G A. 2009.** Silencing of a putative immunophilin gene in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* increases the infection rate of *Babesia bovis* in larval progeny. *Parasites & Vectors* **2**: 57.

- Bastos R G, Ueti M W, Knowles D P, Scoles G A. 2010.** The *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Bm86 gene plays a critical role in the fitness of ticks fed on cattle during acute *Babesia bovis* infection. *Parasites & Vectors* **3**: 111.
- Baum J, Papenfuss A T, Mair G R, Janse C J, Vlachou D, Waters A P, Cowman A F, Crabb B S, Koning-Ward T F de. 2009.** Molecular genetics and comparative genomics reveal RNAi is not functional in malaria parasites. *Nucleic Acids Research* **37**: 3788-98.
- Beverley S M. 2003.** Protozoomics: trypanosomatid parasite genetics comes of age. *Nature reviews. Genetics* **4**: 11-19.
- Blandin S, Moita L F, Köcher T, Wilm M, Kafatos F C, Levashina E A. 2002.** Reverse genetics in the mosquito *Anopheles gambiae*: targeted disruption of the Defensin gene. *EMBO Reports* **3**: 852-6.
- Blandin S, Shiao S-H, Moita L F, Janse C J, Waters A P, Kafatos F C, Levashina E A. 2004.** Complement-like protein TEP1 is a determinant of vectorial capacity in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Cell* **116**: 661-70.
- Blandin S A, Marois E, Levashina E A. 2008.** Antimalarial responses in *Anopheles gambiae*: from a complement-like protein to a complement-like pathway. *Cell Host & Microbe* **3**: 364-74.
- Boisson B, Jacques J C, Choumet V, Martin E, Xu J, Vernick K, Bourgouin C. 2006.** Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. *FEBS Letters* **580**: 1988-92.
- Borovsky D, Schlein Y. 1987.** Trypsin and chymotrypsin-like enzymes of the sandfly *Phlebotomus papatasi* infected with *Leishmania* and their possible role in vector competence. *Medical and Veterinary Entomology* **1**: 235-242.
- Bowman A S, Sauer J R. 2005.** Tick salivary glands: function, physiology and future. *Parasitology* **129**: S67.
- Bratton R L, Corey R. 2005.** Tick-borne disease. *American Family Physician* **71**: 2323-30.
- Caljon G, Broos K, Goeyse I De, Ridder K De, Sternberg J M, Coosemans M, Baetselier P De, Guisez Y, Den Abbeele J Van. 2009.** Identification of a functional Antigen5-related allergen in the saliva of a blood feeding insect, the tsetse fly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 332-41.
- Caljon G, Ridder K De, Baetselier P De, Coosemans M, Den Abbeele J Van. 2010.** Identification of a tsetse fly salivary protein with dual inhibitory action on human platelet aggregation. *PloS One* **5**: e9671.
- Cerutti L, Mian N, Bateman A. 2000.** Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends in Biochemical Sciences* **25**: 481-2.
- Cerutti H, Casas-Mollano J A. 2006.** On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Current Genetics* **50**: 81-99.
- Clemons A, Haugen M, Le C, Mori A, Tomchaney M, Severson D W, Duman-Scheel M. 2011.** siRNA-mediated gene targeting in *Aedes aegypti* embryos reveals that frazzled regulates vector mosquito CNS development. *PloS One* **6**: e16730.

- Cogoni C, Macino G. 2000.** Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Current Opinion in Genetics & Development* **10**: 638-43.
- Coustou V, Guegan F, Plazolles N, Baltz T. 2010.** Complete in vitro life cycle of *Trypanosoma congolense*: development of genetic tools. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4**: e618.
- Coutinho-Abreu I V, Sharma N K, Robles-Murguia M, Ramalho-Ortigao M. 2010.** Targeting the midgut secreted PpChit1 reduces *Leishmania major* development in its natural vector, the sand fly *Phlebotomus papatasi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4**: e901.
- DaRocha W, Otsu K, Teixeira S M, Donelson J E. 2004.** Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **133**: 175-86.
- Denli A M, Tops B B J, Plasterk R H A, Ketting R F, Hannon G J. 2004.** Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**: 231-5.
- Dernburg A F, Zalevsky J, Colaiácovo M P, Villeneuve A M. 2000.** Transgene-mediated cosuppression in the *C. elegans* germ line. *Genes & Development* **14**: 1578-83.
- Diaz-Albiter H, Mitford R, Genta F A, Sant'Anna M R V, Dillon R J. 2011.** Reactive oxygen species scavenging by catalase is important for female *Lutzomyia longipalpis* fecundity and mortality. *PloS One* **6**: e17486.
- Djikeng A, Shi H, Tschudi C, Ullu E. 2001.** RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA* **7**: 1522-30.
- Durand-Dubief M, Absalon S, Menzer L, Ngwabyt S, Ersfeld K, Bastin P. 2007.** The Argonaute protein TbAGO1 contributes to large and mini-chromosome segregation and is required for control of RIME retroposons and RHS pseudogene-associated transcripts. *Molecular and Biochemical Parasitology* **156**: 144-53.
- Dyxhoorn D M, Novina C D, Sharp P A. 2003.** Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **4**: 457-67.
- Eksi S, Czesny B, Greenbaum D C, Bogyo M, Williamson K C. 2004.** Targeted disruption of *Plasmodium falciparum* cysteine protease, falcipain 1, reduces oocyst production, not erythrocytic stage growth. *Molecular Microbiology* **53**: 243-50.
- El-Sayed N M, Myler P J, Bartholomeu D C, Nilsson D, Aggarwal G, et al. 2005.** The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* **309**: 409-15.
- Elbashir S M, Lendeckel W, Tuschl T. 2001.** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development* **15**: 188-200.
- 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.
- Fraiture M, Baxter R H G, Steinert S, Chelliah Y, Frolet C, Quispe-Tintaya W, Hoffmann J A, Blandin S A, Levashina E A. 2009.** Two mosquito LRR proteins function as complement control factors in the TEP1-mediated killing of *Plasmodium*. *Cell Host & Microbe* **5**: 273-84.



- Fridberg A, Olson C L, Nakayasu E S, Tyler K M, Almeida I C, Engman D M. 2008.** Sphingolipid synthesis is necessary for kinetoplast segregation and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science* **121**: 522-35.
- Fuente J de la, Almazán C, Blouin E F, Naranjo V, Kocan K M. 2005.** RNA interference screening in ticks for identification of protective antigens. *Parasitology Research* **96**: 137-41.
- Fuente J de la, Almazán C, Blas-Machado U, Naranjo V, Mangold A J, Blouin E F, Gortazar C, Kocan K M. 2006a.** The tick protective antigen, 4D8, is a conserved protein involved in modulation of tick blood ingestion and reproduction. *Vaccine* **24**: 4082-95.
- Fuente J de la, Almazán C, Naranjo V, Blouin E F, Meyer J M, Kocan K M. 2006b.** Autocidal control of ticks by silencing of a single gene by RNA interference. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **344**: 332-8.
- Fuente J de la, Kocan K M, Almazán C, Blouin E F. 2007.** RNA interference for the study and genetic manipulation of ticks. *Trends in Parasitology* **23**: 427-33.
- Fuente J de la, Maritz-Olivier C, Naranjo V, Ayoubi P, Nijhof A M, Almazán C, Canales M, Pérez de la Lastra J M, Galindo R C, Blouin E F, Gortazar C, Jongejan F, Kocan K M. 2008.** Evidence of the role of tick subolesin in gene expression. *BMC Genomics* **9**: 372.
- Fuente J de la, Manzano-Roman R, Naranjo V, Kocan K M, Zivkovic Z, Blouin E F, Canales M, Almazán C, Galindo R C, Step D L, Villar M. 2010a.** Identification of protective antigens by RNA interference for control of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Vaccine* **28**: 1786-95.
- Fuente J de la, Kocan K M, Blouin E F, Zivkovic Z, Naranjo V, Almazán C, Esteves E, Jongejan F, Daffre S, Mangold A J. 2010b.** Functional genomics and evolution of tick-*Anaplasma* interactions and vaccine development. *Veterinary Parasitology* **167**: 175-86.
- Garcia S, Billecocq A, Crance J-marc, Munderloh U, Garin D, Bouloy M. 2005.** Nairovirus RNA sequences expressed by a Semliki Forest virus replicon induce RNA interference in tick cells. *Journal of Virology* **79**: 8942-7.
- Garcia Silva M R, Tosar J P, Frugier M, Pantano S, Bonilla B, Esteban L, Serra E, Rovira C, Robello C, Cayota A. 2010.** Cloning, characterization and subcellular localization of a *Trypanosoma cruzi* argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids. *Gene* **466**: 26-35.
- Gissot M, Briquet S, Refour P, Boschet C, Vaquero C. 2005.** PfMyb1, a *Plasmodium falciparum* transcription factor, is required for intra-erythrocytic growth and controls key genes for cell cycle regulation. *Journal of Molecular Biology* **346**: 29-42.
- Guerra-Giraldez C, Quijada L, Clayton C E. 2002.** Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science* **115**: 2651-8.
- Haines L R, Lehane S M, Pearson T W, Lehane M J. 2010.** Tsetse EP protein protects the fly midgut from trypanosome establishment. *PLoS Pathogens* **6**: e1000793.
- Hajdusek O, Sojka D, Kopacek P, Buresova V, Franta Z, Sauman I, Winzerling J, Grubhoffer L. 2009.** Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 1033-8.

- Hajdusek O, Almazán C, Loosova G, Villar M, Canales M, Grubhoffer L, Kopacek P, Fuente J de la. 2010.** Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. *Vaccine* **28**: 2993-8.
- Hamilton A J, Baulcombe D C. 1999.** A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* **286**: 950-2.
- Hannon G J. 2002.** RNA interference. *Nature* **418**: 244-51.
- Hoa N T, Keene K M, Olson K E, Zheng L. 2003.** Characterization of RNA interference in an *Anopheles gambiae* cell line. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**: 949-57.
- Hojgaard A, Biketov S F, Shtannikov A V, Zeidner N S, Piesman J. 2009.** Molecular Identification of Salp15, a key Salivary gland protein in the transmission of lyme disease spirochetes, from *Ixodes persulcatus* and *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* **46**: 1458-63.
- Holt R A, Subramanian G M, Halpern A, Sutton G G, Charlab R, et al. 2002.** The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298**: 129-49.
- Hu C, Aksoy S. 2006.** Innate immune responses regulate trypanosome parasite infection of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Molecular Microbiology* **60**: 1194-204.
- Hutvagner G, Zamore P D. 2002.** A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**: 2056-60.
- Inoue N, Otsu K, Ferraro D M, Donelson J E. 2002.** Tetracycline-regulated RNA interference in *Trypanosoma congolense*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **120**: 309-13.
- Jinek M, Doudna J A. 2009.** A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* **457**: 405-12.
- Jones-Rhoades M W, Bartel D P. 2004.** Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell* **14**: 787-99.
- Karim S, Ramakrishnan V G, Tucker J S, Essenberg R C, Sauer J R. 2004a.** *Amblyomma americanum* salivary gland homolog of nSec1 is essential for saliva protein secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **324**: 1256-63.
- Karim S, Ramakrishnan V G, Tucker J S, Essenberg R C, Sauer J R. 2004b.** *Amblyomma americanum* salivary glands: double-stranded RNA-mediated gene silencing of synaptobrevin homologue and inhibition of PGE2 stimulated protein secretion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**: 407-13.
- Kocan K M, Fuente J de la, Manzano-Roman R, Naranjo V, Hynes W L, Sonenshine D E. 2008.** Silencing expression of the defensin, varisin, in male *Dermacentor variabilis* by RNA interference results in reduced *Anaplasma marginale* infections. *Experimental & Applied Acarology* **46**: 17-28.
- Kocan K M, Zivkovic Z, Blouin E F, Naranjo V, Almazán C, Mitra R, Fuente J de la. 2009.** Silencing of genes involved in *Anaplasma marginale*-tick interactions affects the pathogen developmental cycle in *Dermacentor variabilis*. *BMC developmental biology* **9**: 42.
- LaCount D J, Barrett B, Donelson J E. 2002.** *Trypanosoma brucei* FLA1 is required for flagellum attachment and cytokinesis. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 17580-8.

- 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**: 709-18.
- Liao M, Zhou J, Gong H, Boldbaatar D, Shirafuji R, Battur B, Nishikawa Y, Fujisaki K. 2009.** Hemalin, a thrombin inhibitor isolated from a midgut cDNA library from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *Journal of Insect Physiology* **55**: 164-73.
- Lipardi C, Wei Q, Paterson B M. 2001.** RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* **107**: 297-307.
- Liu Q, Rand T A, Kalidas S, Du F, Kim H-E, Smith D P, Wang X. 2003.** R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway. *Science* **301**: 1921-5.
- Long S, Jirků M, Mach J, Ginger M L, Sutak R, Richardson D, Tachezy J, Lukes J. 2008.** Ancestral roles of eukaryotic frataxin: mitochondrial frataxin function and heterologous expression of hydrogenosomal *Trichomonas* homologues in trypanosomes. *Molecular Microbiology* **69**: 94-109.
- Lye L-F, Owens K, Shi H, Murta S M F, Vieira A C, Turco S J, Tschudi C, Ullu E, Beverley S M. 2010.** Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathogens* **6**: e1001161.
- Malhotra P, Dasaradhi PVN, Kumar A, Mohmmmed A, Agrawal N, Bhatnagar RK, Chauhan VS. 2002.** Double-stranded RNA-mediated gene silencing of cysteine proteases (falcipain-1 and -2) of *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology* **45**: 1245-54.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T. 2002.** Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**: 563-74.
- Matrajt M. 2010.** Non-coding RNA in apicomplexan parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology* **174**: 1-7.
- McRobert L, McConkey G A. 2002.** RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **119**: 273-8.
- Meister G, Tuschl T. 2004.** Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**: 343-9.
- Merino O, Almazán C, Canales M, Villar M, Moreno-Cid J A, Estrada-Peña A, Kocan K M, Fuente J de la. 2011.** Control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations by the combination of subolesin vaccination and tick autocidal control after subolesin gene knockdown in ticks fed on cattle. *Vaccine* **29**: 2248-54.
- Militello K T, Refour P, Comeaux C A, Duraisingh M T. 2008.** Antisense RNA and RNAi in protozoan parasites: working hard or hardly working? *Molecular and Biochemical Parasitology* **157**: 117-26.
- Mohmmmed A. 2003.** In vivo gene silencing in *Plasmodium berghei* — a mouse malaria model. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **309**: 506-11.

- Montalvetti A, Fernandez A, Sanders J M, Ghosh S, Brussel E Van, Oldfield E, Docampo R. 2003.** Farnesyl pyrophosphate synthase is an essential enzyme in *Trypanosoma brucei*. In vitro RNA interference and in vivo inhibition studies. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 17075-83.
- Morris J C, Wang Z, Drew M E, Paul K S, Englund P T. 2001.** Inhibition of bloodstream form *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using the pZJM dual T7 vector. *Molecular and Biochemical Parasitology* **117**: 111-3.
- Mourrain P, Béclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel J B, Jouette D, Lacombe A M, Nikic S, Picault N, Rémoúé K, Sanial M, Vo T A, Vaucheret H. 2000.** *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**: 533-42.
- Narasimhan S, Montgomery R R, DePonte K, Tschudi C, Marcantonio N, Anderson J F, Sauer J R, Cappello M, Kantor F S, Fikrig E. 2004.** Disruption of *Ixodes scapularis* anticoagulation by using RNA interference. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 1141-6.
- Nayduch D, Aksoy S. 2007.** Refractoriness in tsetse flies (Diptera: Glossinidae) may be a matter of timing. *Journal of Medical Entomology* **44**: 660-5.
- Ngô H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. 1998.** Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 14687-92.
- Nijhof A M, Taoufik A, Fuente J de la, Kocan K M, Vries E de, Jongejan F. 2007.** Gene silencing of the tick protective antigens, Bm86, Bm91 and subolesin, in the one-host tick *Boophilus microplus* by RNA interference. *International Journal for Parasitology* **37**: 653-62.
- Paim R M M, Araújo R N, Soares A C, Lemos L C D, Tanaka A S, Gontijo N F, Lehane M J, Pereira M H. 2011.** Influence of the intestinal anticoagulant in the feeding performance of triatomine bugs (Hemiptera; Reduviidae). *International Journal for Parasitology* **41**: 765-73.
- Pal U, Li X, Wang T, Montgomery R R, Ramamoorthi N, Desilva A M, Bao F, Yang X, Pypaert M, Pradhan D, Kantor F S, Telford S, Anderson J F, Fikrig E. 2004.** TROSPA, an *Ixodes scapularis* receptor for *Borrelia burgdorferi*. *Cell* **119**: 457-68.
- Patrick K L, Luz P M, Ruan J, Shi H, Ullu E, Tschudi C. 2008.** Genomic rearrangements and transcriptional analysis of the spliced leader-associated retrotransposon in RNA interference-deficient *Trypanosoma brucei*. *Molecular Microbiology* **67**: 435-47.
- Patrick K L, Shi H, Kolev N G, Ersfeld K, Tschudi C, Ullu E. 2009.** Distinct and overlapping roles for two Dicer-like proteins in the RNA interference pathways of the ancient eukaryote *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 17933-8.
- Peacock L, Bailey M, Gibson W. 2005.** Tetracycline induction of gene expression in *Trypanosoma brucei* within the tsetse fly vector. *Molecular and Biochemical Parasitology* **140**: 247-9.

- Peacock C S, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz J C, Quail M A, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream M-A, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabbinowitsch E, Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf S L, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge D P, Oyola S O, Hilley J D, Brito L O, Tosi L R O, Barrell B, Cruz A K, Mottram J C, Smith D F, Berriman M. 2007.** Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature Genetics* **39**: 839-47.
- Pitaluga A N, Mason P W, Traub-Cseko Y M. 2008.** Non-specific antiviral response detected in RNA-treated cultured cells of the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Developmental and Comparative Immunology* **32**: 191-7.
- Poliak P, Hoewyk D Van, Oborník M, Zíková A, Stuart K D, Tachezy J, Pilon M, Lukes J. 2010.** Functions and cellular localization of cysteine desulfurase and selenocysteine lyase in *Trypanosoma brucei*. *The FEBS Journal* **277**: 383-93.
- Ramakrishnan V G, Aljamali M N, Sauer J R, Essenberg R C. 2005.** Application of RNA interference in tick salivary gland research. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT* **16**: 297-305.
- Rand T A, Petersen S, Du F, Wang X. 2005.** Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* **123**: 621-9.
- Rathjen T, Nicol C, McConkey G, Dalmay T. 2006.** Analysis of short RNAs in the malaria parasite and its red blood cell host. *FEBS Letters* **580**: 5185-8.
- Rivero M R, Kulakova L, Touz M C. 2010.** Long double-stranded RNA produces specific gene downregulation in *Giardia lamblia*. *The Journal of Parasitology* **96**: 815-9.
- Robinson K A, Beverley S M. 2003.** Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **128**: 217-28.
- Sant'Anna M R, Alexander B, Bates P A, Dillon R J. 2008.** Gene silencing in phlebotomine sand flies: Xanthine dehydrogenase knock down by dsRNA microinjections. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38**: 652-60.
- Sant'Anna MRV, Diaz-Albiter H, Mubarak M, Dillon R J, Bates P A. 2009.** Inhibition of trypsin expression in *Lutzomyia longipalpis* using RNAi enhances the survival of *Leishmania*. *Parasites & Vectors* **2**: 62.
- Shi H, Djikeng A, Tschudi C, Ullu E. 2004.** Argonaute protein in the early divergent eukaryote *Trypanosoma brucei*: control of small interfering RNA accumulation and retroposon transcript abundance. *Molecular and Cellular Biology* **24**: 420-7.
- Shi H, Tschudi C, Ullu E. 2006.** An unusual Dicer-like1 protein fuels the RNA interference pathway in *Trypanosoma brucei*. *RNA* **12**: 2063-72.
- Smíd O, Horáková E, Vilimová V, Hrdy I, Cammack R, Horváth A, Lukes J, Tachezy J. 2006.** Knock-downs of iron-sulfur cluster assembly proteins IscS and IscU down-regulate the active mitochondrion of procyclic *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry* **281**: 28679-86.

- Soares C A G, Lima C M R, Dolan M C, Piesman J, Beard C B, Zeidner N S. 2005.** Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the *isac* gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Molecular Biology* **14**: 443-52.
- Song J-J, Smith S K, Hannon G J, Joshua-Tor L. 2004.** Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* **305**: 1434-7.
- Süss J, Fingerle V, Hunfeld K-P, Schrader C, Wilske B. 2004.** [Tick-borne human pathogenic microorganisms found in Europe and those considered nonpathogenic. Part II: Bacteria, parasites and mixed infections]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* **47**: 470-86.
- Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T. 2004.** RNA interference in protozoan parasites. *Cellular Microbiology* **6**: 509-19.
- Walshe D P, Lehane S M, Lehane M J, Haines L R. 2009.** Prolonged gene knockdown in the tsetse fly glossina by feeding double stranded RNA. *Insect Molecular Biology* **18**: 11-9.
- Wang J, Wu Y, Yang G, Aksoy S. 2009.** Interactions between mutualist *Wigglesworthia* and tsetse peptidoglycan recognition protein (PGRP-LB) influence trypanosome transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 12133-8.
- Wang Z, Englund P T. 2001.** RNA interference of a trypanosome topoisomerase II causes progressive loss of mitochondrial DNA. *The EMBO Journal* **20**: 4674-83.
- Wang Z, Morris J C, Drew M E, Englund P T. 2000.** Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *The Journal of Biological Chemistry* **275**: 40174-9.
- Weiss B L, Wu Y, Schwank J J, Tolwinski N S, Aksoy S. 2008.** An insect symbiosis is influenced by bacterium-specific polymorphisms in outer-membrane protein A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 15088-93.
- Witola W H, Inoue N, Ohashi K, Onuma M. 2004.** RNA-interference silencing of the adenosine transporter-1 gene in *Trypanosoma evansi* confers resistance to diminazene aceturate. *Experimental Parasitology* **107**: 47-57.
- Zamore P D, Tuschl T, Sharp P A, Bartel DP. 2000.** RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**: 25-33.
- Zhang H, Kolb F A, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. 2004.** Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* **118**: 57-68.