

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



STANOVENÍ GENOVÉ EXPRESE

HABILITAČNÍ PRÁCE

(soubor publikovaných vědeckých prací doplněný komentářem)

Hradec Králové 2018

Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

S vděčností, úctou a láskou

věnuji

své rodině

a především svému muži, bez jehož podpory a nekonečné trpělivosti by tato práce nevznikla.

Děkuji spoluautorům předložených publikací a dalším spolupracovníkům, kteří se na tomto projektu podíleli.

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře České republiky (17 11954Y, P303/12/G163, 18-07724S, 15-05325S) a Univerzitě Karlově (PRIMUS/17/SCI/4).

OBSAH

1 Úvod	1
1.1 Semikvantitativní metody	1
1.1.1 Northern blotting	1
1.1.2 Semikvantitativní PCR	2
1.2 Kvantitativní real-time PCR (qPCR)	3
1.2.1 Barviva	4
1.2.1.1 Interkalační barviva	5
1.2.1.2 Značené primery/sondy	5
1.2.2 Návrh primerů a sond	8
1.2.3 Přístroje a vyhodnocení dat	8
1.2.3.1 Absolutní kvantifikace	9
1.2.3.2 Relativní kvantifikace	9
1.3 Digitální PCR	11
1.4 DNA čipy	13
1.5 RNA sekvenování	15
1.5.1.1 Příprava cDNA knihovny	16
1.5.1.2 Klonální amplifikace	17
1.5.1.3 Sekvenování	18
1.5.1.4 Bioinformatická analýza dat	21
2 Literatura	25
3 Stručný přehled výsledků	28
3.1 Časová závislost změn genové exprese	30
3.2 Výběr referenčních genů pro qPCR	32
3.2.1 Výběr referenčních genů pro qPCR u různě starých čmeláků	32
3.2.2 Výběr referenčních genů pro kvantitativní stanovení mRNA a mikroRNA u myšího modelu obezity	33
3.2.3 Výběr referenčních genů pro qPCR u vlasovky slezové	35

3.2.4	Metody výběru referenčních genů pro qPCR stanovení mikroRNA	36
3.3	Vliv přírodních látek na expresi biotransformačních enzymů	38
3.3.1	Stanovení <i>in vitro</i>	38
3.3.2	Stanovení <i>in vivo</i>	39
3.3.2.1	Biotransformační a antioxidační enzymy u MSG-obézních myší.....	39
3.3.2.2	Vliv extraktu ze zeleného čaje na biotransformační enzymy u myší.....	42
3.3.2.3	Vliv extraktu z brusinek na biotransformační enzymy u myší	45
3.3.2.4	Vliv seskviterpenů na biotransformační enzymy u myší.....	45
3.4	Vysokokapacitní stanovení exprese genů.....	46
3.4.1	Tvorba feromonové směsi u lišaje tabákového	46
3.4.2	UDP-glykosyltransferasy vlasovky slezové.....	48
3.4.3	Vliv fenbendazolu na transkriptom a proteom huseníčku rolního.....	50
3.5	Stanovení genové exprese v jiných projektech	52
3.6	Seznam dalších publikací	54
4	Souhrn	57
5	Přílohy.....	58

- I. Lněničková K., Skálová L., Raisová Stuchlíková L., Szotáková B., Matoušková P*. Induction of xenobiotic-metabolizing enzymes in hepatocytes by beta-naphthoflavone: Time-dependent changes in activities, protein and mRNA levels. (2018) *Acta Pharmaceutica* 68(1), pp. 75-85.....59
- II. Horňáková D.¹, Matoušková P.¹, Kindl J., Valterová I., Pichová I.* Selection of reference genes for real-time polymerase chain reaction analysis in tissues from *Bombus terrestris* and *Bombus lucorum* of different ages. (2010) *Analytical Biochemistry* 397(1), pp.118-120.....71
- III. Matoušková P.*, Bártíková H., Boušová I., Hanušová V., Szotáková B., Skálová L., Reference genes for real-time PCR quantification of messenger RNAs and microRNAs in mouse model of obesity. (2014) *PLOS ONE* 9(1), e86033.....75
- IV. Lecová L., Růžičková M., Laing R., Vogel H., Szotáková B., Prchal L., Lamka J., Vokřál I., Skálová L., Matoušková P.*, Reliable reference gene selection for quantitative real time PCR in *Haemonchus contortus*. (2015) *Molecular and Biochemical Parasitology* 201 pp.123-127.....87

- V. Matoušková P.*, MicroRNAs and reference gene methodology. (2017) Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics, Springer int. P. pp.1-17.....93
- VI. Lněničková K., Procházková E., Skálová L., Matoušková P., Bártíková H., Souček P., Szotáková B.*, Catechins variously affect activities of conjugation enzymes in proliferating and differentiated Caco-2 cells. (2016) *Molecules* 21, 1186.....111
- VII. Zárbynický T., Matoušková P., Lancošová B., Šubrt Z., Skálová L., Boušová I.*, Inter-individual variability in acute toxicity of R-pulegone and R-menthofuran in human liver slices and their influence on miRNA expression changes in comparison to acetaminophen. (2018) *International Journal of Molecular Sciences* 19(6), 1805.....123
- VIII. Matoušková P.*, Bártíková H., Boušová I., Levorová L., Szotáková B., Skálová L. Drug-metabolizing and antioxidant enzymes in monosodium L-glutamate obese mice. (2015) *Drug Metabolism and Disposition* 43, pp.258-265.....141
- IX. Boušová I.*, Košťáková Š., Matoušková P., Bártíková H., Szotáková B., Skálová L. Monosodium glutamate-induced obesity changed the expression and activity of glutathione S-transferases in mouse heart and kidney. (2017) *Pharmazie* 72, pp. 257-259.....149
- X. Matoušková P., Bártíková H., Boušová I., Szotáková B., Martin J., Skorkovská J., Hanušová V., Tománková V., Anzenbacherová E., Lišková B., Anzenbacher P., Skálová L.* Effect of defined green tea extract in various dosage schemes on drug-metabolizing enzymes in mice in vivo. (2014) *Journal of Functional Foods* 10, pp. 327-335.....153
- XI. Boušová I.*, Matoušková P., Bártíková H., Szotáková B., Hanušová V., Tománková V., Anzenbacherová E., Lišková B., Anzenbacher P., Skálová L. Influence of diet supplementation with green tea extract on drug-metabolizing enzymes in a mouse model of monosodium glutamate-induced obesity. (2016) *European Journal of Nutrition* 55, pp. 361-371.....163
- XII. Boušová I.*, Bártíková H., Matoušková P., Lněničková K., Zappe L., Valentová K., Szotáková B., Martin J., Skálová L. Cranberry extract-enriched diets increase NAD(P)H:quinone oxidoreductase and catalase activities in obese but not in nonobese mice. (2015) *Nutrition Research* 35, pp. 901-909.....175
- XIII. Lněničková K., Svobodová H., Skálová L., Ambrož M., Novák F., Matoušková P.*, The impact of sesquiterpenes β -caryophyllene oxide and trans-nerolidol on xenobiotic-metabolizing enzymes in mice in vivo. (2017) *Xenobiotica* p.1-9.....185
- XIV. Buček A.¹, Matoušková P.¹, Vogel H., Šebest P., Ullrich J., Weissflog J., Svatoš A.*, Pichová I.*, Evolution of moth sex pheromone composition by a single amino acid substitution in a fatty acid desaturase. (2015) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(41), pp.12589-12591.....195

- XV. Matoušková P.* , Lecová L., Laing R., Dimunová D., Vogel H., Raisová Stuchlíková L., Nguyen L.T., Kellerová P., Vokřál I., Lamka J., Szotáková B., Várady M., Skálová L. UDP-glycosyltransferase family in *Haemonchus contortus*: phylogenetic analysis, constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences (2018) *odesláno*.....201
- XVI. Syslová E., Landa P., Raisová Stuchlíková L., Matoušková P., Skálová L., Szotáková B., Navrátilová M., Vaněk T., Podlípna R.* , Effect of anthelmintic drug fenbendazole on *Arabidopsis thaliana* transcriptome and proteome (2018) *odesláno*.....225
- XVII. Stuchlíková L., Matoušková P., Bártíková H., Vokřál I., Lamka J., Štolcová T., Pětníková H., Szotáková B., Kubíček V., Skálová L.* , Monepantel induces hepatic cytochromes p450 in sheep in vitro and in vivo. (2015) *Chemico-Biological Interactions* 227, pp.63-68.....243
- XVIII. Krbal L., Hanušová V.* , Soukup J., John S., Matoušková P., Ryška A., Contribution of in vitro comparison of colorectal carcinoma cells from primary and metastatic lesions to elucidation of mechanisms of tumor progression and response to anticancer therapy. (2016) *Tumor Biology* 37, pp.-9565-9578.....249
- XIX. Skarková V.* , Králová V., Krbal L., Matoušková P., Soukup J., Rudolf E., Oxaliplatin and irinotecan induce heterogenous changes in the EMT markers of metastasizing colorectal carcinoma cells. (2018) *Experimental Cell Research* 369, pp.295-303263

1 Úvod

Exprese genů je složitý proces probíhající v každé buňce, při němž je postupně informace uložená ve formě genů (v DNA) nejdříve přepsána do mRNA (transkripce) a poté je přeložena do proteinů (translace). Každá úroveň podléhá složitému systému regulací, na kterých se podílí řada proteinů, ale také mnoho nekódujících RNA, například mikroRNA. Poznání, jaké geny jsou přepisované v buňce v konkrétním okamžiku, nám pomůže odhalit, co se v buňce děje v různých vývojových stádiích, při vzniku nemocí, při působení cizorodých látek a podobně.

Kvantifikací genové exprese (na úrovni mRNA) jsem se zabývala v různých projektech u různých modelových organismů. V této souborné práci nejprve shrnuji v teoretické části metodiku používanou ke stanovení genové exprese na úrovni mRNA. Druhá část obsahuje komentované výsledky mých dosavadních publikací.

1.1 Semikvantitativní metody

Starší metody stanovení genové exprese se spíše využívají pro samotnou detekci exprimovaných genů než pro jejich kvantifikaci. Zahrnují Northern blotting a semikvantitativní polymerasovou řetězovou reakci (PCR, *polymerase chain reaction*).

1.1.1 Northern blotting

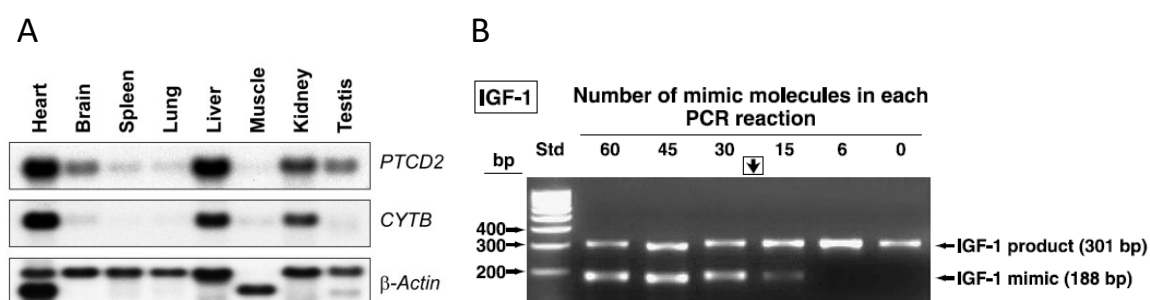
Tato metoda se využívá pro měření množství a velikosti přepsané RNA. Nejprve je RNA rozdělena v denaturačním gelu dle velikosti, poté je přenesena na nylonovou membránu a zafixována. Následně značená sonda, komplementární k části sledovaného genu, procesem hybridizace označí příslušnou oblast (Obr. 1A). Po promytí nenavázaných sond je na membráně detekováno množství a velikost genu. Právě výhodou Northern blottingu je, že lze určit délku mRNA. Téměř u žádné z následujících metod (kromě sekvenování) to není možné a je vždy detekován pouze krátký úsek. K tomuto stanovení také není zapotřebí žádný sofistikovaný přístroj. Další výhodou spočívá v možnosti detekovat i různé sestřihové varianty sledovaného genu. Nevýhodou této metody je potřeba většího množství vstupního materiálu.

Ještě v roce 2007 založili Schlamp se spolupracovníky databázi a poradenství BlotBase (<http://medicalgenomics.org/>), kde měly být sdružovány informace s možností „*high-throughput*“ hledání v publikovaných Northern blotech (Schlamp et al., 2008). Poslední přidané publikace jsou ale z roku 2009 a samotná Schlampova publikace má pouze 11 citací, což svědčí o nepřílišné popularitě této metody v dnešní době.

1.1.2 Semikvantitativní PCR

Metodu polymerasové řetězové reakce (PCR) není třeba detailně představovat. Stručně řečeno se jedná o techniku k namnožení neboli amplifikaci DNA, umožňující vytvořit miliony kopií specifické části DNA z minimálního množství počátečního materiálu. Typicky se jedná o sérii cyklů, při nichž dochází k opakovaným změnám teplot. Každý cyklus zahrnuje fázi denaturace, kdy dochází k oddělení dvouřetězcové DNA, fázi hybridizace neboli „*annealing*“, při níž dochází k nasedání krátkých oligonukleotidů – primerů na komplementární úseky sledovaného genu, a elongační fázi, při které dochází k enzymatické syntéze nového řetězce DNA-polymerasou. Dle konkrétní aplikace se tyto fáze opakují většinou ve 20-40 cyklech. V ideálním případě dojde v každém cyklu ke zdvojení množství vznikajícího produktu, tedy vzniku 2^n kopií, přičemž n je počet cyklů. Ve skutečnosti dochází po určitém cyklu k saturaci, kdy jsou vyčerpány komponenty, a reakce se dostává do tzv. plató fáze. V klasickém uspořádání se amplifikované produkty analyzují na konci reakce nějakou separační technikou (například agarosovou elektroforézou) a vizualizují za pomoci nějakého interkalačního fluorescenčního barviva tzv. „*end-point*“ detekcí. Za objev této metody byla v roce 1993 udělena Nobelova cena za chemii Kary Mullisovi.

Semikvantitativní PCR se využívá při stanovení množství transkriptu, po izolaci RNA, reverzní transkripci a vlastním PCR stanovením s „*end-point*“ analýzou porovnáním se vzorky o známé koncentraci. Tato metoda má však pouze částečnou vypovídací hodnotu o množství vstupního templátu. Variantou tohoto stanovení je komparativní PCR (kompetitivní PCR), kdy se do reakce přidává kompetitor - známý DNA fragment, který je amplifikován stejnými primery, ale produkt má jinou velikost. Oba templáty tak soutěží o jeden set primerů. Určením poměru mezi množstvím produktu v analyzovaném templátu s referenčním produktem můžeme získat určitou představu o koncentraci sledovaného genu (Obr. 1B).



Obrázek 1. Ukázka výsledků Northern blottingu a komparativního PCR (Převzato z (A) Xu et al., 2008, (B) Furukawa et al., 2005).

V obou případech je kvantifikace velmi přibližná. U Northern blotu (Obr. 1A) lze říci, že v srdci, játrech a ledvinách je vysoká exprese genu PTCD2 (*pentatricopeptide repeat domain protein 2*) a genu CYTB (cytochrom b) (Xu et al., 2008). V komparativním PCR (Obr. 1B) lze sledovat, že se snižujícím se množstvím kompetitoru (IGF-1 mimic) se zvyšuje množství sledovaného templátu (IGF-1 product) a při spočítání jejich poměru lze odhadnout množství odpovídající sledovanému genu (v obrázku naznačeno šipkami nad gelem) (Furukawa et al., 2005).

1.2 Kvantitativní real-time PCR (qPCR)

Analýza genové exprese pomocí reverzní transkripce následované kvantitativní PCR v reálném čase je v dnešní době pravděpodobně jednou z nejdostupnějších a nejpoužívanějších metod pro stanovení množství určité RNA. Kromě výzkumu a různých forensních a biotechnologických aplikací se qPCR používá především v diagnostice. V této metodě se propojila klasická PCR s použitím fluorescenčních reportérových molekul pro monitorování vzniku amplifikačního produktu v každém cyklu PCR. Pokud je správně provedena, od plánování, optimalizace a validace až po vlastní stanovení, pak je to nejpřímější možnost jak získat rychle přesná a spolehlivá data za poměrně příznivou cenu. Spolehlivost a reprodukovatelnost ale zcela závisí na podmínkách provedení experimentu a způsobu vyhodnocení (Bustin and Nolan, 2017). Díky velké popularitě použití qPCR existuje celá řada protokolů a způsobů analýzy dat, kvůli nimž je velmi těžké výsledky spolehlivě opakovat v různých laboratořích. Proto vznikla sada doporučení „MIQE guidelines“ (*minimum information for the publication of quantitative PCR experiment*), které shrnují informace potřebné nejen pro publikování, ale i opakování nebo ověřování qPCR experimentů (Bustin et al., 2009).

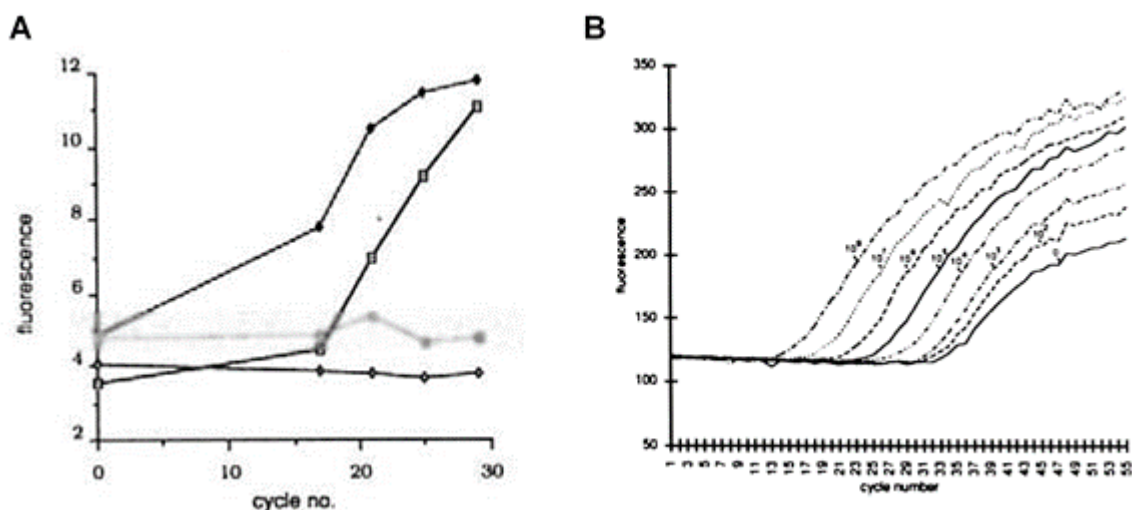
Tato doporučení vyzdvihují nutnost uvádět kromě výsledků stanovení i detailní postupy a validace jednotlivých kroků experimentu. Zde je shrnuto pár bodů, které jsou často v publikacích s výsledky qPCR stanovení opomíjeny. Určení RNA integrity: pro tento bod je uznávanou metodou určení tzv. RIN čísla (*RNA integrity number*) (Schroeder et al., 2006) nebo 5'-3' assay zahrnující PCR amplifikaci dvou amplikonů od jednoho genu s použitím cDNA připravené pomocí oligo(dT) primeru (Nolan et al., 2006). Detailní popis reverzní transkripce: krok, který závisí na mnoha aspektech od použité reverzní transkriptasy přes typ primerů (specifické, oligo(dT), náhodné hexamery apod.) či koncentraci RNA ve vzorku až po samozřejmou přítomnost inhibitorů nebo kontaminujících látek z RNA izolace (Bustin et al., 2015). Vlastní qPCR analýza: závěrečný a nejdůležitější krok. Opět spolehlivost výsledků závisí na jeho provedení a pouze detailní popis praktického provedení umožní zhodnocení kvality provedení. V dnešní době existuje spousta různých možností jak qPCR provést,

jaké reagentie a přístroje použít a jak qPCR vyhodnotit. Těmto aspektům se věnují následující kapitoly.

1.2.1 Barviva

Používaná fluorescenční barviva pro monitorování průběhu qPCR v reálném čase se dělí do dvou skupin; nespecifická interkalační barviva jako jsou SYBR Green I nebo EvaGreen a specifické oligonukleotidy značené různými fluorofory. Do druhé skupiny patří celá řada komerčních molekul od značených primerů, hydrolyzačních sond (např. TaqMan) a hybridizačních sond (např. Hybprobe, Molecular Beacons apod.) po různě modifikovaná analoga nukleových kyselin (PNA, LNA Plexor apod.) (Navarro et al., 2015).

Historicky první „real time“ stanovení provedl ve své laboratoři Higuchi, který poprvé sledoval amplifikační produkty v průběhu jejich vzniku (Obr. 2). Použil ethidiumbromid (interkalační barvivo běžně používané při „end-point“ detekci). Vzorky v upraveném cykléru ozařoval ultrafialovým světlem a vznikající fluorescenci snímal připojenou CCD kamerou. Vynesením přírůstku naměřené fluorescence vůči počtu cyklů vznikl první qPCR graf, který poskytl více informací o průběhu PCR než do té doby běžně používaný klasický PCR s detekcí po všech cyklech (end-point detekce)(Higuchi et al., 1992, Higuchi et al., 1993).

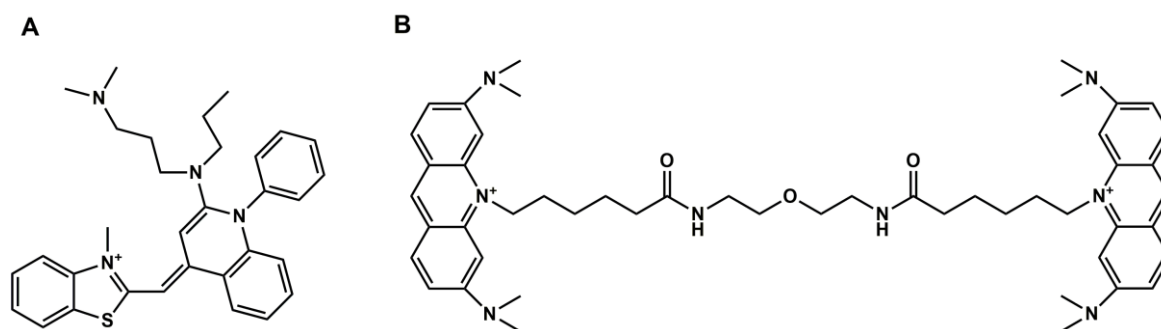


Obrázek 2. První (A) a druhé (B) zobrazení qPCR experimentu. (Převzato z Higuchi et al., 1992, Higuchi et al., 1993).

1.2.1.1 Interkalační barviva

Mezi interkalační barviva patří nejčastěji používaný SYBRGreen I (Obr. 3A). Jedná se o cyaninové barvivo, které se vmezeřuje do menšího žlábků dvouřetězcové DNA. Po navázání tento adukt DNA-barvivo absorbuje modré světlo ($\lambda_{\text{max}} = 497 \text{ nm}$) a emituje zelené světlo ($\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ nm}$), které se měří na konci každého cyklu PCR. Vzhledem k tomu, že je navázání nespecifické, je nutné na konci PCR ještě zařadit analýzu křivky tání pro ověření specifity vzniklého produktu. Při této analýze je postupně zvedána teplota a kontinuálně (nebo v krátkých intervalech - dle možností přístroje) se měří fluorescence. Při teplotě tání vzniklého produktu dojde k prudkému poklesu fluorescence, protože dojde k disociaci obou řetězců a tedy uvolnění barviva a „zhasnutí“ jeho fluorescence. Nespecifické produkty nebo dimery primerů většinou tají při jiných teplotách než specifický produkt PCR. Ovšem i tato analýza má své limity, protože ověřuje pouze přítomnost jednoho či více produktů, přičemž existuje i možnost, že dva produkty mohou mít velmi podobnou teplotu tání a mohou být těžko odhalitelné.

Výhodou použití interkalačních barviv je především jejich cena. Nevýhodou, kromě zmíněné nespecifity, je nižší stabilita barviva a možná inhibice PCR reakce při vyšší koncentraci barviva. Nicméně na trhu dostupné optimalizované komerční mixy tuto nevýhodu značně snižují. Barvivo EvaGreen, řazené mezi třetí generaci interkalačních barviv, už tento limit téměř překonalo, je stabilnější a díky menšímu inhibičnímu efektu se může používat v saturačních podmínkách (Obr. 3B).



Obrázek 3. SybrGreen I (A) a EvaGreen (B)

1.2.1.2 Značené primery/sondy

Vzhledem k nespecifitě interkalačních barviv je vyvíjena celá řada komerčně dostupných primerů nebo sond značených různými fluorofory. Takto značené oligonukleotidy velmi zvyšují specifitu reakce, neboť k emisi fluorescence dochází pouze při interakci s konkrétním amplikonem. Především pro detekci a kvantifikaci jednonukleotidových polymorfismů (SNP) je přesná kvantifikace velmi podstatná.

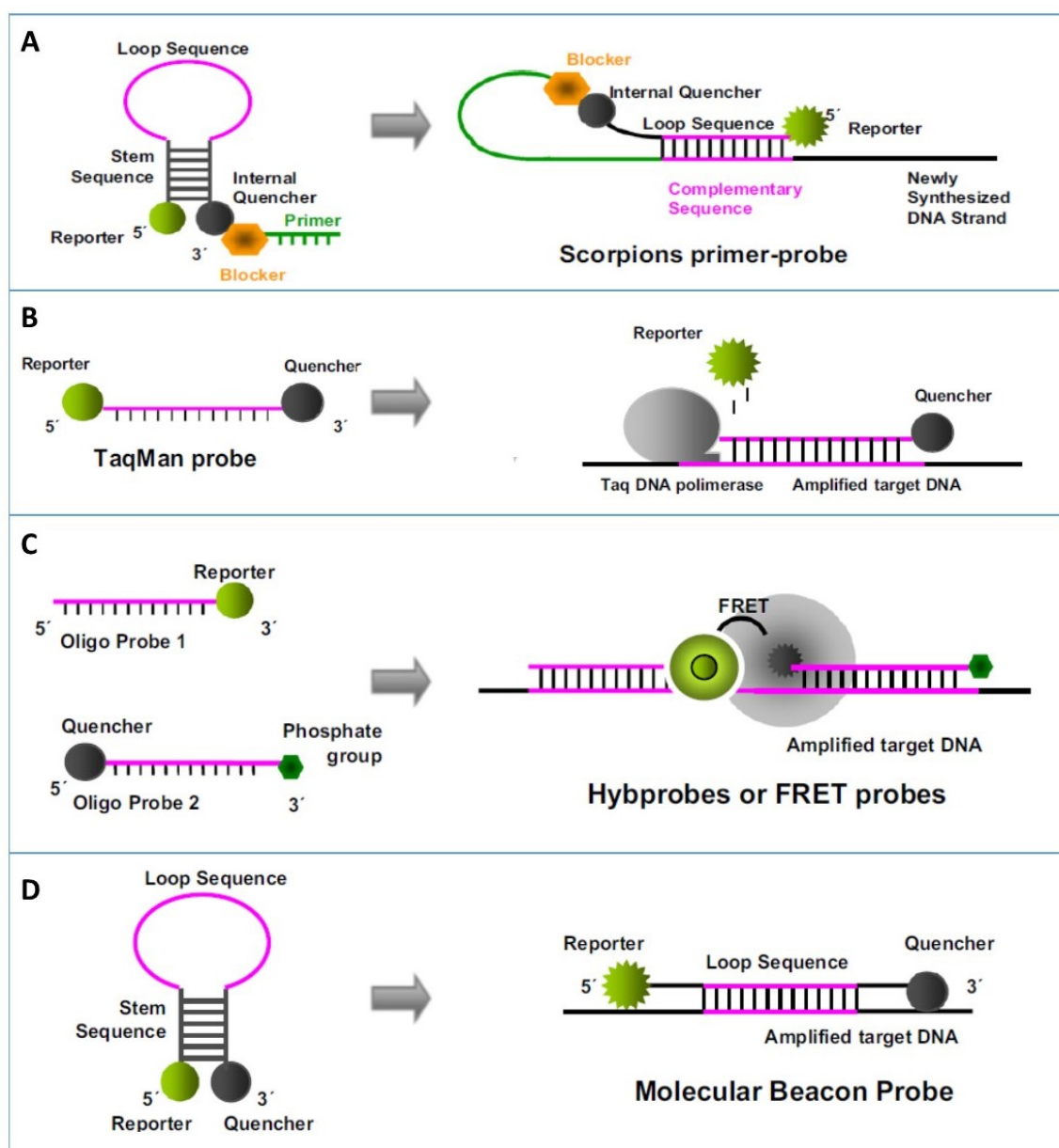
Používané fluorofory jsou malé molekuly připojené k oligonukleotidu, který je komplementární k sekvenci sledovaného genu/produktu. Většina aplikací zahrnuje dva typy fluoroforů - donor a akceptor. Mechanismus reakce zahrnuje nejdříve absorpci světelné energie prvním fluoroforem -donorem, který následně předává emitované světlo akceptoru, ale pouze v případě jsou-li tyto dva fluorofory v dostatečné blízkosti. Tento proces se nazývá „*Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET)“. Podle toho, jaký je použit akceptorový fluorofor, může dojít ke zhášení fluorescence (v tomto případě je emitovaná energie donoru akceptorem pohlcena) nazývané „*FRET-quenching*“ a o takových fluoroforech mluvíme jako o zhášečích (*quencher*). Pokud se takový akceptor/zhášeč oddálí od donoru, je možné měřit rovnou emitované světlo donoru. Pokud je akceptor fluorescenční molekula, pak je měřeno světlo příslušné vlnové délky odpovídající tomuto zářiči. V současnosti je na trhu celá řada kombinací různých donorů a akceptorů s řadou excitačních a emisních spekter.

Výhodou těchto sond, kromě vyšší specifity, je možnost tzv. multiplexování, kdy je v reakci přítomno více různých sond, které emitují svoje záření a v jedné reakci tedy lze sledovat více amplikonů najednou. Ovšem toto uspořádání zvyšuje nároky na přístrojové vybavení.

Značený může být přímo jeden z primerů a v reakci pak není zapotřebí dalšího oligonukleotidu/sondy, nebo je značena sonda jako třetí oligonukleotid v reakci, což dále zvyšuje specifitu celého uspořádání. Jedním z příkladů ze skupiny značených primerů je tzv. „*Scorpion primer*“, který má vlásenkovou strukturu a donor na 5'-konci a akceptorem je zhášeč uvnitř sekvence (Whitcombe 1999). V roztoku jsou donor a akceptor/zhášeč blízko sebe, nedochází tak k emisi fluorescence. V prvním kole PCR dojde k prodloužení sledovaného řetězce o tuto přidanou sekvenci a v dalším kole PCR dojde při nasedání primeru k otevření vlásenky a posunutí zhášeče do větší vzdálenosti, kde přestává působit a měří se fluorescence emitovaná donorem (Obr. 4A). Podobné uspořádání dvou fluoroforů v jednom primeru mají například komerční Amplifluor®, LUX® nebo Cyclicon® (Navarro et al., 2015).

Značené sondy se mohou dále dělit na hydrolyzační a hybridizační. Hydrolyzační sondy využívají 5'-3' exonukleasovou aktivitu použité DNA-polymerasy, díky které je navázaná sonda degradována v průběhu amplifikace, čímž dojde k oddělení zhášeče od donoru. Typickým příkladem jsou „*TaqMan sondy*“ (Holland et al., 1991). Tyto oligonukleotidy mají na svém 5'-konci fluorescenční donor a na 3'-konci zhášeč, jedná se o třetí oligonukleotid přidávaný do reakce. V průběhu amplifikace dojde k degradaci sondy a uvolnění donoru, čímž dojde k emisi záření (Obr. 4B). Nevýhodou těchto sond je, že v průběhu reakce jsou degradovány, takže není možná následná kontrola pomocí křivky tání. Vzhledem ke zvýšené specifitě díky třetímu oligonukleotidu je ale tato nevýhoda minoritní.

Nejjednodušší uspořádání hybridizačních sond využívá tzv. „*head-to-tail*“ orientaci, kdy jsou v celém systému přítomny dva značené oligonukleotidy/primery, které jsou komplementární ke sledované sekvenci ve velké blízkosti, z nichž jeden nese donor na 3'-konci a druhý obsahuje reportérový akceptor na 5'-konci. V průběhu druhé fáze PCR cyklu (*annealing*) dojde k navázání obou oligonukleotidů na templát, čímž se dostávají do těsné blízkosti a dojde k přenosu energie a k emisi fluorescence akceptoru (Obr. 4C). Dalším typem hybridizačních sond jsou vlásenkové sondy, například tzv. „*Molecular Beacons*“, které obsahují donor a zhášec připojené na jeden oligonukleotid. Díky vlásenkové struktuře jsou tyto fluorofory v těsné blízkosti a dochází ke zhášení. Po navázání na cílovou sekvenci dojde k oddělení vlásenky a emisi fluorescence donoru (Obr. 4D).



Obrázek 4. Příklady typů fluorescenčních sond. (Upraveno dle Navarro et al., 2015).

Na trhu existuje celá řada dalších sond a oligonukleotidů, které různě kombinují zmíněné možnosti s různými přídavnými vylepšeními/modifikacemi. Od specifických MGB sond používajících speciální tripeptid tzv. MGB-ligand (*minor groove binding ligand*), které se lépe navazují na dvouřetězcovou DNA až po různé primery obsahující modifikované nukleotidy umožňující lepší vyladování teplot nasedání primerů a sond.

1.2.2 Návrh primerů a sond

Na dobře navržených primerech či sondách zcela závisí správný průběh qPCR reakce. Sleduje se nejen specifická (komplementarita se sledovanou sekvencí), ale také délka, zastoupení guaninů a cytosinů, stabilita na 3'-konci, teplota tání, délka vznikajícího produktu/amplikonu. V dnešní době existuje celá řada pomocných bioinformatických nástrojů pro správný návrh primerů (Primer3, mFold, OligoCalc atd.). Při optimalizaci obou primerů je třeba sledovat i jejich specifitu v celém kontextu plánovaného experimentu a je nutné zkontrolovat oblast jejich nasedání, aby se v komplementární oblasti nevyskytovalo velké množství vlásenkových struktur a podobně (Bustin and Huggett, 2017).

1.2.3 Přístroje a vyhodnocení dat

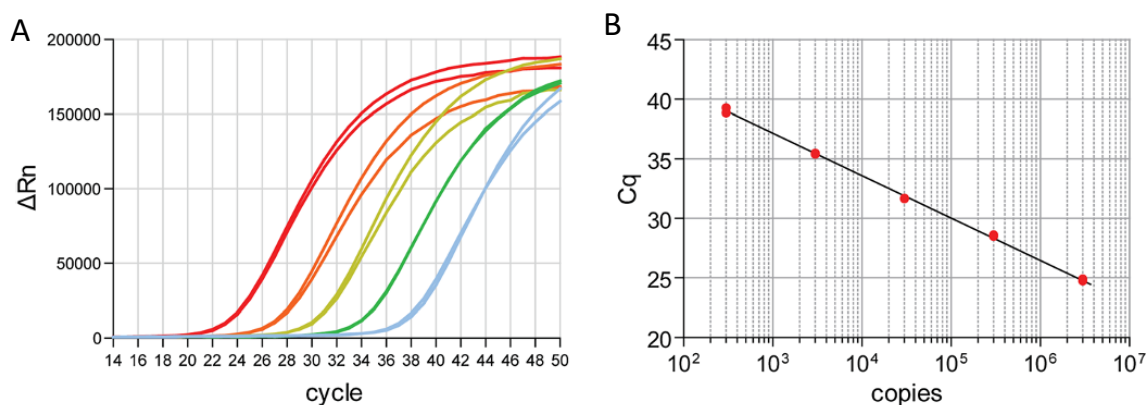
Přístroj používaný pro qPCR analýzu se skládá z vlastního cykléru schopného efektivně a přesně měnit teploty, excitačního zdroje světla, detektoru fluorescence a softwaru pro vyhodnocení zaznamenané fluorescence. První přístroj pro qPCR byl uvedený na trh firmou Applied Biosystems už v roce 1996. Od té doby existuje na trhu celá řada přístrojů s různým uspořádáním (blokové či rotorové), umožňující stanovení různého počtu vzorků s možností sledovat různý počet fluoroforů apod. Faktory, které se sledují při koupi takového přístroje, jsou například uniformita bloku - což znamená, do jaké míry je příslušný blok schopen udržet přesně stejnou teplotu ve všech jamkách, nebo rychlost, s jakou je schopen měnit teplotní fáze cyklu. Přístroje se liší typem používaných zkumavek od 0,1 - 0,2 ml mikrozkušavek organizovaných do destiček či stripů po různé kapilární mikrozkušavky. Přístroje se mohou velmi lišit z hlediska použitého zdroje světla a optiky. Způsob detekce emitovaného fluorescenčního záření se u přístrojů liší od použití fotodiod, fotonásobičů až k CCD kamerám. Každý typ má svoje výhody a nevýhody. Velmi výrazným, ovšem často přehlíženým, kritériem pro výběr přístroje může být i software pro analýzu dat (Sandrine Javorski-Miller, 2011).

Vyhodnocení a analýza dat u qPCR probíhá na základě amplifikační křivky a může dávat buď hodnoty „absolutní“, kdy získáme množství stanovovaného transkriptu na základě porovnání se

standardní křivkou, nebo relativní, kdy pouze porovnáváme množství stanovovaného transkriptu mezi dvěma typy vzorků, například před a po ovlivnění.

1.2.3.1 Absolutní kvantifikace

Absolutní kvantifikace umožní určení počtu kopií sledovaného transkriptu na základě extrapolace ze standardní křivky. Ta je vytvořena postupným ředěním standardu (Obr. 5). Standard většinou tvoří rekombinantní DNA, například plasmid s naklonovaným genem (případně pouze jeho částí), který stanovujeme. Doporučuje se, aby plasmidová DNA byla nejprve pro standardní křivku linearizována. Whelan et al. (2003) však dokázali, že se křivka neliší při použití cirkulárního, nebo linearizovaného plasmidu (Whelan et al., 2003). Další námitky proti absolutní kvantifikaci, které se občas vyskytnou, zdůrazňují, že rekombinantní DNA nepodstoupí stejný proces jako cDNA a tudíž se doporučuje použití rekombinantní RNA jako standardu, která projde reversní transkripcí podobně jako izolovaný vzorek. Aby absolutní kvantifikace byla smysluplná, je nutné přesně stanovit koncentraci standardu. Pro toto stanovení se doporučuje přesnější fluorimetrické stanovení (například s použitím RiboGreen nebo PicoGreen) než spektrofotometrické stanovení množství RNA/DNA Nanodropem. Výsledné jednotky se odvíjí od toho, v jakých jednotkách je vyjádřena koncentrace vzorku použitého pro standardní křivku a jaký je vstupní materiál pro stanovení. Může být vyjádřena jako počet kopií na μg použité cDNA/RNA, jako počet kopií v ml krve, nebo počet kopií na gram tkáně a podobně (Bustin, 2004).



Obrázek 5. Ukázka stanovení absolutní koncentrace neznámého vzorku pomocí sériového ředění a standardní křivky (Převzato z Roberts et al., 2014).

1.2.3.2 Relativní kvantifikace

Relativní kvantifikace, na rozdíl od absolutní, nedává informaci o počtu kopií stanovovaného genu a není nutný standard. Výsledkem relativního stanovení je porovnání množství genu mezi kalibrátorem - kontrolním vzorkem před ovlivněním nebo vzorkem, ke kterému jsou ostatní vzorky vztaženy.

Navíc se při relativním stanovení provádí normalizace dat k určitému genu, který by měl být stabilní v celém experimentu. Takový gen se nazývá referenční gen (RG). Dřívější označení „housekeeping gen“ se již nepoužívá, protože toto označení je zavádějící, neboť ne všechny „housekeeping“ geny mají vždy stabilní expresi. Například často používaná glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasa (GAPDH) je ovlivněna interleukinem-2, a proto jakékoliv stanovení, které se týká zánětu, může být při použití GAPDH špatně interpretováno (Whelan et al., 2003, Sabath et al., 1990). Pro výběr stabilních RG je dostupná řada programů, které nejen že vyhodnotí stabilitu RG, ale také vyberou ze sady testovaných genů ten nejstabilnější (Andersen et al., 2004, Pfaffl et al., 2004, Vandesompele et al., 2002, Silver et al., 2006). Snadné je například použít volně dostupný program RefFinder (<http://150.216.56.64/referencegene.php?type=reference>), který sdružuje čtyři takové programy, všechny dohromady vyhodnotí a vytvoří výsledné pořadí genů dle jejich pořadí v jednotlivých programech. Vstupní data pro tento program jsou Cq hodnoty všech genů ze všech vzorků z daného experimentu. Jeden ze zahrnutých programů GeNorm navíc vyhodnotí homogenitu celého experimentu a na základě toho doporučí počet RG, které by se měly použít pro správnou normalizaci daného experimentu. Obecně se doporučuje použít více než jeden RG pro minimalizaci chyby stanovení. V takovém případě se při výpočtu počítá s geometrickým průměrem naměřených Cq hodnot všech doporučených RG (Vandesompele et al., 2002). Další způsob jak vybrat kvalitní RG umožňuje například Genevestigator, komerční software (<https://genevestigator.com/gv/index.jsp>), který sdružuje veškerá dostupná transkriptomická data, takže při zadání typu experimentu, tkáně, buněčné linie, podmínek a cílového genu doporučí sadu stabilních genů, které se navíc svojí mírou exprese příliš neliší od cílového genu. Vždy ale samozřejmě platí doporučení otestovat více genů, nebo alespoň ověřit stabilitu vybraného genu v reálném experimentu.

Pro výpočet relativního stanovení lze použít několik metod. Nejčastěji používaná metoda tzv. $\Delta\Delta Ct$ je vhodná při splnění podmínky shodné (nebo alespoň podobné) účinnosti primerů pro cílový i referenční gen (rovnice 1.1). Většinou se doporučuje rozmezí účinností 90-110 %, pokud jsou hodnoty účinnosti mimo tento rozsah, je třeba účinnost zahrnout do výpočtu (rovnice 1.2)(Livak and Schmittgen, 2001, Schmittgen and Livak, 2008).

$$\text{relativní exprese} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (\text{rovnice 1.1})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{vzorek}} - \Delta Ct_{\text{kalibrátor}}, \Delta Ct = Ct_{\text{cílový gen}} - Ct_{\text{referenční gen}}$$

$$\text{relativní exprese} = \frac{(E_{\text{cílový gen}})^{\Delta Ct_{\text{cílový gen}} (\text{kalibrátor-vzorek})}}{(E_{\text{referenční gen}})^{\Delta Ct_{\text{referenční gen}} (\text{kalibrátor-vzorek})}} \quad (\text{rovnice 1.2})$$

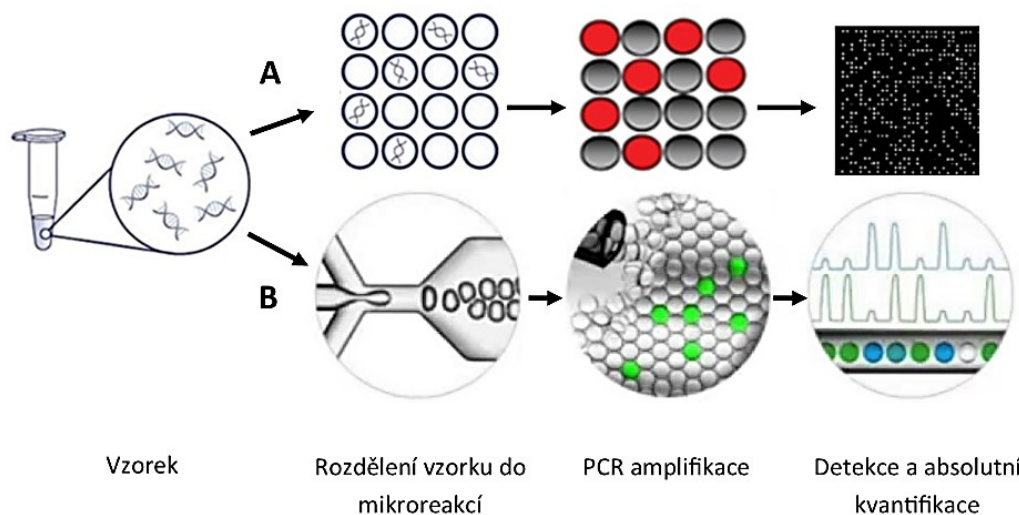
Stanovení účinnosti se proto musí provádět u každé používané sady primerů. Bohužel se často opomíjí kontrola komerčně zakoupených primerů. Sice je při prodeji vždy deklarována dostatečná účinnost primerů, ale už při použití jiného mastermixu pro qPCR se může účinnost lišit. Účinnost se vypočítává ze směrnice kalibrační přímky, která je podobně jako u absolutního stanovení počítána vynesemím logaritmu relativních koncentrací vůči naměřeným C_q hodnotám vzorků získaných postupným ředěním.

Relativní kvantifikaci je výhodné použít při stanovení většího množství genů, pro které nejsou dostupné standardy, a pro které by bylo zbytečně nákladné tyto standardy vytvářet. Jednoduchý výpočet lze provádět přímo v softwaru přístroje, nebo po exportu dat v Excelu. Existuje ale řada programů, které usnadňují výpočet, včetně normalizace dat a statistického vyhodnocení. Takové programy jsou ale většinou komerční a velmi nákladné (qBase, GENEX[®] apod.).

1.3 Digitální PCR

Digitální PCR (dPCR) je poměrně nová metoda pro absolutní kvantifikaci DNA, kterou umožnil uvést do praxe především rozvoj mikrofluidních a emulzních technologií (Sykes et al., 1992, Vogelstein and Kinzler, 1999, Quan et al., 2018). dPCR zahrnuje reagentie obsažené v klasickém PCR včetně fluoroforu používaném při qPCR. Provedení dPCR spočívá v úvodním rozdělení jedné reakce do velkého množství mikroreakcí (stovky až miliony). Objem jednotlivých mikroreakcí se obvykle pohybuje v řádech nano- či pikolitru. Následuje vlastní PCR reakce a čtení fluorescence, kde se většinou sleduje pouze pozitivní a negativní odpověď. Výsledný signál je poté převeden do systému jedniček (pozitivní reakce) a nul (negativní reakce), tedy do podoby binárního kódu - odtud plyne název digitální PCR. Podobně jako u qPCR je možné využít referenční barvivo ROX, které slouží ke kontrole nanesení vzorku na čip a umožňuje stanovení počtu reálně použitých mikrojamek na čipu. Počet pozitivních mikroreakcí vůči počtu všech mikroreakcí udává výsledný absolutní počet kopií dané sekvence ve vzorku. Výpočet je korigovaným předpokladem náhodné distribuce vzorku dle Poissonova rozdělení, kde každá reakce obsahuje buď žádnou, nebo jednu až tři molekuly stanovené DNA. S tím také souvisejí i limity použití dPCR. Nezbytná je volba vhodné koncentrace pro měření konkrétní molekuly, neboť pro správné vyhodnocení nesmí být všechny mikroreakce pozitivní. Dynamický rozsah je tedy poměrně malý a závisí na počtu sledovaných mikroreakcí. Proto je třeba dobře znát nebo předpovědět přibližné množství vstupního templátu, aby byl ve výsledném vzorku dostatečný počet negativních reakcí pro vyloučení úplné saturace vzorkem. Výhodou ale je, že odpadá nutnost vytvoření kalibrační křivky, nebo normalizace dat vůči jinému genu. Přestává tím pádem záležet na účinnosti použitých primerů a také nevádí určitá míra inhibitorů v reakci.

V současnosti existuje několik různých platform pro provedení dPCR, které se liší především ve způsobu úvodního rozdělení reakce do mikroreakcí. Vzorek je buď rozptýlen do malých mikrojamek čipu pomocí mikrokapilár, nebo je vytvořena emulze, která je rozdělena do mikrokapének (Obr. 6).



Obrázek 6. Průběh digitálního PCR. (A) uspořádání v čipu, (B) kapénkové uspořádání. (Upraveno dle www.thermofisher.com a www.bio-rad.com)

Platformy založené na čipech obsahují definované množství mikrojamek. Typy čipů se většinou liší v počtu mikrojamek a ve výsledném objemu mikroreakcí. K plnění čipu se většinou používá mikrokapilár. Pro roztěr nebo tvorbu mikroreakcí je využíván automatický, či poloautomatický přístroj většinou dodávaný spolu s vlastním dPCR přístrojem. Platforma, která využívá emulgaci vzorků, se nazývá „dropletová“ dPCR (ddPCR), kdy jsou mikrokapénky ze směsi vodného roztoku a oleje vytvořeny v generátoru kapének, ve kterých probíhá tzv. emulzní PCR, a které jsou následně vyhodnocovány v mikrofluidním zařízení. Toto uspořádání umožňuje vytvoření většího množství kapének v porovnání s dPCR čipy. Většina systémů dPCR umožňuje multiplexování při použití více různě značených sond, což při vysoké ceně jednoho čipu/stanovení značně snižuje náklady. Podobně jako u qPCR existuje soubor „*dMIQE guidelines*“ pro publikování dat získaných pomocí dPCR, které obsahují esenciální a doporučené položky, které umožní zopakování experimentu i jinou laboratoří (Huggett et al., 2013).

dPCR se používá u vzorků vyžadujících vysokou citlivost nebo při omezeném množství vstupního vzorku. Takže se například používá při stanovení cirkulujících fragmentů fetální DNA v plazmě matky, stanovení a screeningu mutací či přítomnosti nádorových buněk a podobně

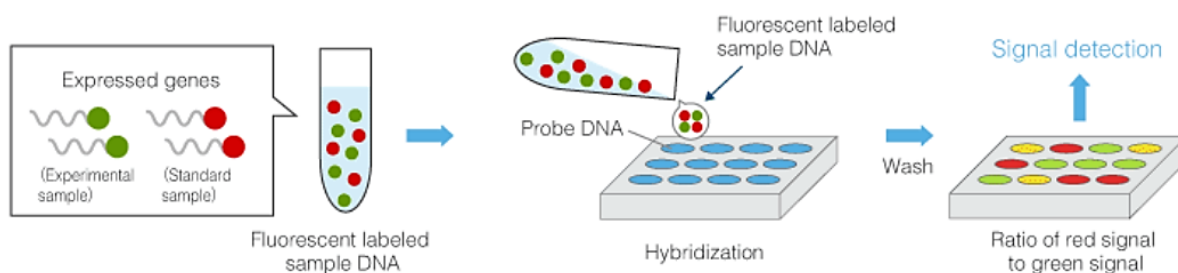
(Fialová et al., 2017). dPCR se používá také při určení počtu variant konkrétního genu (*Copy Number Variant*, CNV), při určování delecí či amplifikací určitých genomových úseků nebo lokusů (Beránek, 2016, Pohl and Shih le, 2004).

1.4 DNA čipy

DNA čipy (*DNA microarrays*) jsou technologie, kde jsou tisíce oligonukleotidů navázány na povrchu čipu, který pomocí hybridizace a následné detekce signálu umožňuje stanovení relativní koncentrace nukleových kyselin ve směsi. Poprvé byla metoda hybridizace DNA použita už v sedmdesátých letech minulého století pro screening kolonií *E. coli* obsahujících plasmidy s různými sekvencemi (Grunstein and Hogness, 1975). V 90. letech byla tato metoda vylepšena a postupně automatizována (Bumgarner, 2013, Katagiri and Glazebrook, 2009).

Tradiční čipy jsou dvoudimensionální tuhé povrchy ze skla, plastu či silikonu, na které jsou kovalentně navázány až miliony fragmentů DNA, které umožňují hybridizaci značených nukleových kyselin ze studovaného vzorku. Klasická analýza pomocí DNA čipů zahrnuje značení nukleových kyselin ve studovaném vzorku, hybridizaci na čip, detekci signálu a analýzu a interpretaci získaných dat. Dnes existuje celá řada komerčně dostupných platforem a čipů (např. Agilent, Affymetrix, Illumina atd.).

Primární použití DNA čipů je právě pro studium genové exprese. Z extrahované celkové RNA je většinou s použitím afinitní purifikace pomocí oligo(dT) kuliček nebo kolonek přečištěna mRNA, která je následně značena, buď jako cRNA, nebo reversní transkripcí převedena na cDNA. Metod značení je více, nejčastěji používané jsou inkorporace fluorescenčně značených nukleotidů nebo nukleotidů s navázaným biotinem. Takto označená směs značených nukleových kyselin je hybridizována na čip. Po promytí nenavázaných molekul je čip rovnou skenován (nebo v případě použití biotinu je přidán fluorescenčně značený streptavidin, poté je čip znovu promyt a skenován). Skenovací přístroj většinou představuje laserem vybavený konfokální mikroskop. Je také možné použít při hybridizaci víc vzorků značených různými fluorofory a tím přímo využít čip pro komparativní hybridizaci, kdy porovnáním různých emisních spekter lze přímo získat rozdíly v expresích mezi sledovanými vzorky (Obr. 7).



Obrázek 7. Příklad kroků v procesu komparativního DNA čipu: izolace RNA (mRNA), značení, hybridizace a skenování fluorescence. (Převzato z <http://www.3d-gene.com>).

Další použití DNA čipů zahrnují například precipitační tzv. „*ChIP-chip*“ experimenty detekující interakce mezi DNA a transkripčními faktory. Dále se DNA čipy používají ke genotypizaci jednonukleotidových polymorfismů nebo k detekci počtu kopií či aneuploidií. V současnosti se používají také čipy pro detekci mikroRNA, což je celkem obtížné vzhledem k nízkému celkovému zastoupení těchto malých RNA v komplexním vzorku.

Vzhledem k velkému množství informací, které se dají z takové analýzy načerpat, vzniklo společenství „*Microarray Gene Expression Society*“ (www.FGED.org) a databáze, například *Gene Expression Omnibus* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), které sdružují takové experimenty a data pro případné další analýzy či meta-analýzy. Samozřejmě pro průhlednost a možnost tato data vůbec opakovaně použít existuje opět sada doporučení, jaké informace je nutné dodávat při publikování dat z DNA čipů (MIAME - *Minimum Information About Microarray Experiment*) (Brazma et al., 2001). Šest hlavních požadavků pro publikování, které musí být splněny, zahrnují informace o nastavení experimentu, anotace celého čipu (sekvence sond, identifikátory genů apod.), popis jednotlivých vzorků, laboratorní postupy hybridizace a samozřejmě dostupnost surových dat z příslušných platforem a dostupnost normalizovaných dat, ze kterých byly vyvozeny závěry studie.

Limity technologie DNA čipů zahrnují fakt, že při jejich použití dochází k předpokladu, že všechny obsažené oligonukleotidy navázané na čip hybridizují se stejnou efektivitou a proporčně vzhledem ke své koncentraci ve studovaném vzorku. Další nevýhodou je, že může dojít k současné hybridizaci velmi podobných sekvencí, což může zkreslit výsledek, nebo ztížit jeho interpretaci, může také překážet pozadí (např. při analýze patogenů ve směsných vzorcích) či naopak přílišná saturace vzorkem. Hlavní limit této metody ale je, že dochází k hybridizaci pouze těch molekul, na které byly sondy předem navrženy. Není možné touto metodou identifikovat žádné „nové“ molekuly, neboť nebudou mít na co se navázat, není většinou možné ani rozlišit různé sestřihové varianty. Například při studiu organismů s vysokou tendencí k mutacím budou většinou čipy detekovat pouze referenční sekvence a mnohé zajímavé sekvence mohou být opominuty.

Pro vyhodnocování dat z DNA čipů se často používají programové balíky dostupné u příslušných firem dodávajících čipy. Často se také používá balíček programů edgeR. Opět samozřejmě při analýze závisí na správné normalizaci dat. Doporučuje se také každý výsledek z DNA čipů „validovat“ pomocí jiné metody, nejčastěji qPCR (v dnešní době může být nahrazováno dPCR).

1.5 RNA sekvenování

Se snižující se cenou sekvenování jsou postupně DNA čipy nahrazovány touto metodou. Sekvenování celého transkriptomu neboli RNA-sekvenování (RNA-seq) poskytuje jedinečné informace o aktuálním stavu buňky. Transkriptom představuje kompletní set všech transkriptů v buňce v daném vývojovém stádiu a v daných podmínkách. Poznání transkriptomu přináší celou řadu informací a může tedy přispět k porozumění rozvoje chorob apod. Transkriptom obsahuje nejen celé mRNA včetně regulačních oblastí a různých sestřihových variant, ale také nekódující RNA a malé RNA.

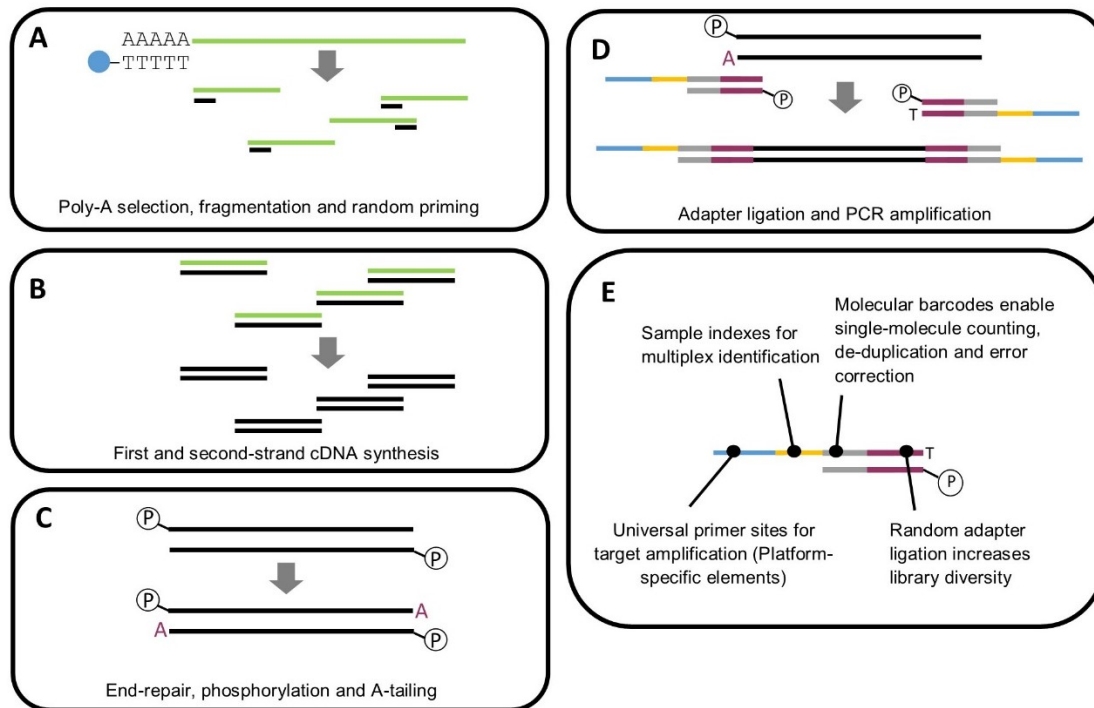
RNA-seq využívá všech dostupných výhod sekvenování nové generace (NGS, *next generation sequencing*). Přípravné kroky zahrnují izolaci celkové RNA, frakcionaci, přepis a tvorbu cDNA knihovny s připojením různých adaptorů na jeden či oba konce. Dále může být zahrnuta nějaká forma amplifikace, to především u málo koncentrovaných vzorků, následuje kontrola kvality knihovny a vlastní sekvenování (Obr. 8). V závislosti na použité metodě lze získat různě dlouhé přečtené fragmenty. Nejnáročnější část celé analýzy spočívá v bioinformatickém zpracování dat. V případě dostupnosti referenčního genomu nebo transkriptomu jsou získaná data porovnána s těmito sekvencemi, v opačném případě musí být fragmenty nově pospojovány (*de novo assembled*). Výhoda RNA sekvenování spočívá v získání veškerých informací, nejen těch které můžeme očekávat dle dostupných sekvencí, sond a čipů. Můžeme získat informace o jednotlivých isoformách, o sestřihových variantách, fúzních transkriptech apod. U nemodelových organismů, pro nedostupnost sekvence genomu a tedy i čipů (které jsou založeny na imobilizovaných sondách o známé sekvenci), představuje RNA-seq jedinou možnost jak získat nějaká data. Na rozdíl od technologie čipů není RNA sekvenování příliš komplikováno přítomností pozadí či komplexním vzorkem, má tudíž velký dynamický rozsah. Bioinformatická analýza a především statistická složka při stanovení diferenciální genové exprese ovšem představuje výzvu.

Před započítím experimentu je potřeba dobře promyslet účel sekvenování, a podle toho plánovat „hloubku čtení“ (*read depth, coverage*), tj. kolikrát předpokládáme, že bude každá sekvence přečtena, kvůli spolehlivosti získaných dat. Například zajímáme-li se o geny, které jsou obecně méně přepisované, je lepší zvýšit počet biologických replikátů, než zvyšovat hloubku čtení.

Dokonce existuje aplikace pro operační systém Android - RNAtor, která umožní propočítat, kolik replikátů a jakou hloubku čtení potřebujeme při konkrétním experimentu. Doporučí jakou platformu zvolit a jaký můžeme očekávat výsledek (Kane et al., 2017). Každý krok v celém procesu RNA-seq metody má celou řadu dostupných provedení, v rámci této práce pouze stručně shrnu a nastíním, jaké možnosti existují, bez ambicí popisovat detailně veškeré platformy a možnosti NGS sekvenování.

1.5.1.1 Příprava cDNA knihovny

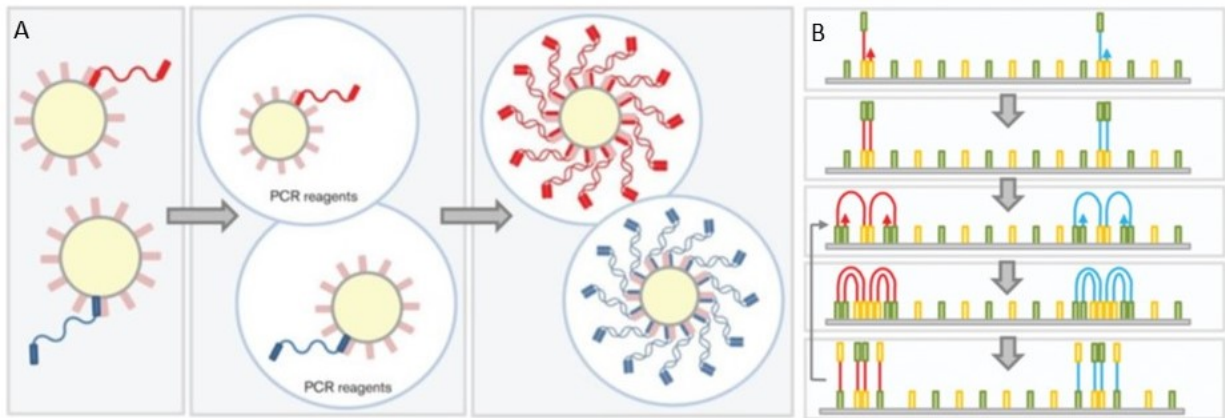
Příprava knihovny závisí na charakteru experimentu, neliší se ale v podstatě od celogenomového sekvenování. Při práci s izolovanou celkovou RNA je doporučeno odstranit ribosomální RNA, která představuje 90-95 % veškeré RNA a při jejím ponechání ve vzorku by bylo zbytečně plýtváno sekvenační kapacitou. Odstranit rRNA se dá například pomocí kitu (Ribo-Zero) obsahujícího sondy komplementární k rRNA navázané na magnetické kuličky, které se po hybridizaci dají snadno oddělit. Izolovat se ale dá přímo i mRNA obsahující poly(A) například pomocí kuliček s navázaným oligo(dT). V případě analýzy dlouhých nekódujících RNA a mRNA je nutné je fragmentovat do menších úseků – požadované velikosti se liší dle typů sekvenátorů (200-500 bp). Fragmentace může být fyzikální - působením tepla, sonikací, nebo nebulizací (obě jsou častěji využity pro DNA knihovny), nebo enzymatická - působením endonukleas (Obr. 8A). Následuje reversní transkripce a syntéza druhého řetězce (Obr. 8B). Zde se může příprava cDNA knihovny lišit od přípravy DNA knihoven, neboť je možné zahrnout krok navíc pro zachování informace o kódujícím řetězci. Následuje ošetření konců vzniklých dvouřetězcových molekul DNA a připojení adaptorů, které jsou opět zcela charakteristické pro následně použitou technologii (Obr. 8C a 8D). Adaptory jsou oligonukleotidy, které slouží jednak jako sondy k navázání na podklad při vlastním sekvenování (například na kotvící kuličky u metody Ion Torrent nebo skleněné plochy pro systém Illumina). Adaptory také slouží jako primery při klonální amplifikaci a mohou sloužit i jako tzv. barkódy (*barcodes*) pro označení původu sekvencí. Především při diferenciálním nebo multiplexním RNA sekvenování se toho často využívá, protože se může víc vzorků sekvenovat najednou. Jednotlivé vzorky jsou pak snadno bioinformaticky odděleny podle přítomných barkódů (specifických sekvencí).



Obrázek 8. Kroky při přípravě cDNA knihovny. (Převzato z <http://archerdx.com/fusionplex-assays/mbc-adapters>)

1.5.1.2 Klonální amplifikace

Následuje klonální amplifikace celé knihovny, k tomu jsou využívány právě připojené adaptory. Postup amplifikace opět závisí na použité technologii sekvenování. Například technologie SOLiD nebo Ion Torrent využívají tzv. emulzní PCR, kdy jsou fragmenty připojeny ke kotvicím kuličkám, kdy každá kulička obsahuje právě jeden hybridizovaný fragment. Vzhledem k celkovému počtu fragmentů tak může jeden sekvenační experiment obsahovat milióny kotvicích kuliček. Přidávaná olejová fáze a následná emulgace umožní vytvoření kapének, které obsahují jednu kuličku s navázanou sekvencí, na níž jsou připojené na každé straně adaptory, ty jsou využity při PCR k namnožení přítomného fragmentu (Obr. 9A).



Obrázek 9. Princip klonální amplifikace pomocí emulzního PCR (A) (technologie Roche 454, SOLiD a Ion Torrent) a „Bridge“ PCR (B) (technologie Illumina) (převzato z Radford et al., 2012).

Technologie Illumina využívá jiný způsob amplifikace, tzv. „bridge“ PCR, kdy jsou oba k adaptorům komplementární primery vázané na skleněné destičce a při amplifikaci dochází k ohnutí fragmentu a vytvoření jakéhosi můstku, vznikající nový fragment zůstává připojen k podkladu. Takto je v definovaném prostoru fragment mnohonásobně namnožen a vznikají izolované klastry o stejné sekvenci, které poskytnou dostatečný signál pro sekvenování (Obr. 9B) (Radford et al., 2012).

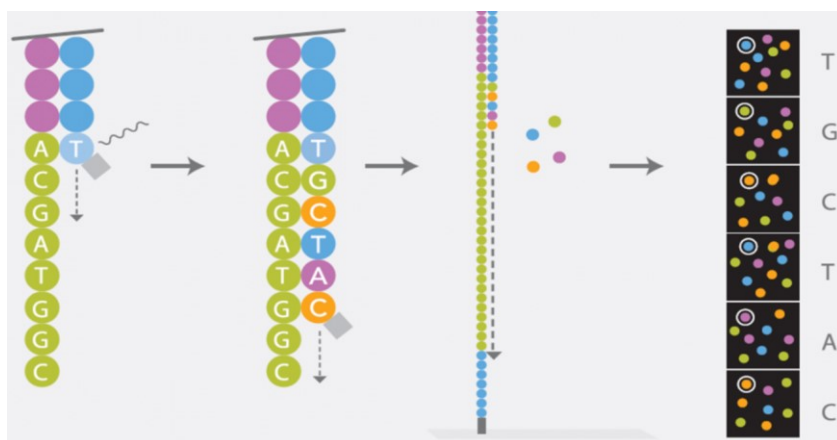
1.5.1.3 Sekvenování

Způsob sekvenování závisí na technologii použité platformy, které se mezi sebou velmi liší. Zde jsou uvedeny tři typy sekvenací: nejpožívanější *Illumina* technologie - založená na použití fluoroforů, *Ion Torrent* – založený na elektrochemickém měření pH, a *Roche/454* založený na pyrosekvenování. Nakonec pro zajímavost uvádím metodu budoucnosti, *Nanopore*, jediný přenosný sekvenátor využívající proteinového póru.

Illumina

Sekvenátory firmy Illumina (např. HiSeq, MiSeq) jsou v současnosti nepoužívanější. Využívají průtokovou celu a sekvenují fragmenty organizované v klastrech po „můstkové“ amplifikaci. Tato metoda se nejvíce blíží klasickému Sangerovu sekvenování, je také založena na „sekvenování syntézou“, kdy jsou ke všem klastrům najednou kromě DNA-polymerasy přidávány nukleotidy značené čtyřmi různými fluorofory (Obr. 10). Na rozdíl od použití dideoxynukleotidů, které ukončují syntézu, jsou zde použité nukleotidy pouze chráněny před navázáním více jednotek a po naskenování fluorescence jsou fluorofory odštěpeny a odmyty. Následuje další kolo přidavku

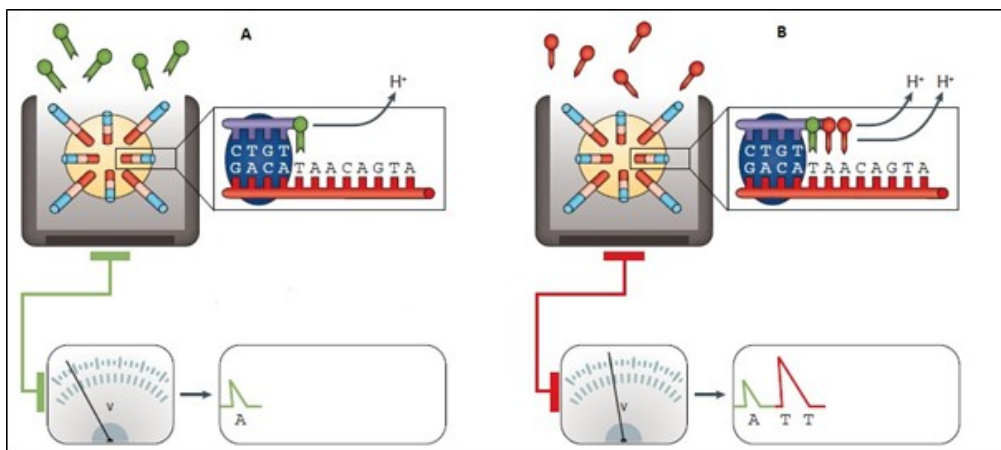
nukleotidů značených fluorofory a opět je naskenován další nukleotid v každém klastru. Tento proces je velmi rychlý a spolehlivý. Délka čtení je ale omezená a dosahuje většinou maximálně 50-250 nukleotidů (nt) (Ansorge, 2009).



Obrázek 10. Postup sekvence technologií Illumina (Převzato z Ansorge, 2009).

Ion Torrent

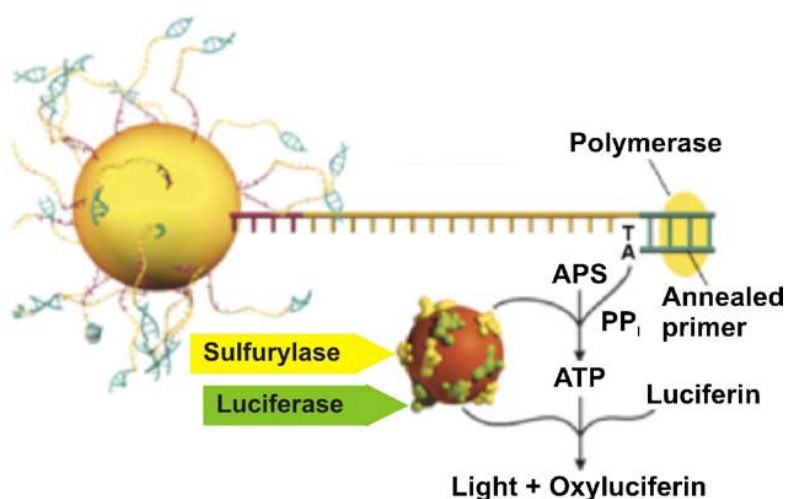
Tato technologie firmy Thermo Fisher Scientific také využívá „sekvenování syntézou“, ale pracuje na zcela odlišné bázi než jiné sekvenátory, detekuje totiž změny pH. Knihovna je amplifikována emulzní PCR na kotvících kuličkách, tyto kuličky jsou poté rozmístěny do polovodičového čipu obsahujícího jamky veliké přesně pro jednu kuličku. Poté je čip oplachován roztokem s jedním typem nukleotidu. Po připojení správného nukleotidu je uvolněn jeden proton, čímž dojde ke změně pH v dané jamce. Citlivá vrstva na dně jamky zaznamená tuto změnu - tedy inkorporovaný nukleotid. Celý proces je opakován a další nukleotidy jsou zaznamenávány (Obr. 11) (Kchouk et al., 2017). Výhodou této technologie je rychlost a délka čtení, která může dosahovat až 600 nt. Nevýhodou je složitá interpretace homopolymerních úseků (> 6nt), kdy je změna pH zaznamenávána nepřesně.



Obrázek 11. Technologie Ion Torrent (převzato z Kchouk et al., 2017).

Roche/454

Tato technologie sekvenování je založena na zcela jiném principu a to pyrosekvenování. Po amplifikaci knihovny na kotvících kuličkách jsou tyto kuličky umístěny do pikotitrační destičky z optických vláken, kdy každá jamka pojme jednu kuličku. Opět se jedná o metodu „sekvenování syntézou“, tentokrát ale sekvenátor využívá spřažených reakcí. Při inkorporaci správného nukleotidu je uvolněn difosfát (pyrofosfát), který je využit přidávanou ATP-sulfurylasou k vytvoření ATP, následně enzym luciferasa způsobí, díky přítomnosti ATP, přeměnu luciferinu na oxyluciferin za současného uvolnění světelného kvanta, které je zaznamenáno detektorem (Obr. 12). Nejnovější přístroj této technologie GS FLX+ je schopen číst sekvence až do velikosti 1000 nt (Ansorge, 2009). Nevýhodou je opět nedostatečný signál při čtení homopolymerních úseků.



Obrázek 12. Pyrosekvenování, technologie Roche/454. (Převzato z Ansorge, 2009).

Nanopore

Všechny zmíněné technologie jsou doposud limitovány délkou čtení kratší než 1000 nt. V tomto směru zaznamenala revoluci metoda Nanopore firmy Oxford Nanopore sequencing, která uvedla na trh MinION, přístroj, který připomíná flashdisk a připojuje se přes USB port k počítači. Fragment DNA je protlačován skrz kanál tvořený proteiny, které mění konformaci dle procházejících nukleotidů v sekvenci, tyto změny jsou zaznamenány a převáděny v signál (Obr. 13). Tento systém má několik výhod, tou hlavní je velikost přístroje. Tento přenosný systém lze využít po připojení k laptopu kdekoliv v terénu, byl také testován na různých extrémních místech planety - na horách, pod vodou, v arktických oblastech, a také ve vesmíru. Délka čtení (až 150 tisíc nt) a příznivá cena (cca 1000 dolarů) dělají z tohoto přístroje hudbu budoucnosti. Nevýhodou je v současnosti velká chybovost sekvenování (až 12 %). Tento přístroj lze použít i pro sekvenování RNA, kdy se při přípravě knihovny využívá přímo RNA. Umožňuje tak odhalit i modifikace RNA (<https://nanoporetech.com/products/minion>).



Obrázek 13. MinION Nanopore technologie. (Převzato z <https://nanoporetech.com/minion>)

1.5.1.4 Bioinformatická analýza dat

Bioinformatická analýza dat zahrnuje několik kroků. První krok, tj. převedení změřených signálů (fluorescenčních, světelných, elektrochemických apod.) do digitální „písmenné“ podoby, provede přímo sekvenátor. Nutno zdůraznit, že téměř veškeré programy dostupné pro bioinformatickou analýzu jsou programovány v systému Linux a operační systém Windows je pro bioinformatiku velmi nepřátelský. Nicméně pro běžné uživatele, kteří nepracují s příkazovým řádkem a chtějí se na svoje data alespoň podívat, existuje například platforma Galaxy (<https://usegalaxy.org/>), která pracuje s Linuxovými programy přes Windows rozhraní.

Surová primární sekvenační data jsou dodávána ve formátu FastQ, který obsahuje nejen získanou sekvenci z jednotlivých kuliček nebo klastrů a její identifikátor, ale také informaci o kvalitě (a spolehlivosti) každé přečtené báze (Obr. 14) (Bao et al., 2012).

#	FASTQ Data
1	@SRR032209.2000 length=36
2	GTTGTGGCTGAGATGGGATGTAAACTTGANGANANN
3	+SRR032209.2000 length=36
4	B=A@?@BBB<285 : <?8%3 ; ######!##!#!

Obrázek 14. FastQ formát sekvence. Obsahuje na každém řádku konkrétní informaci: 1 - @ a identifikátor, 2 - vlastní sekvence, 3 - + a přídatné informace, 4 - skóre kvality „Phred“ (v ASCII formátu) pro každou přečtenou bázi. (Převzato z Wan et al., 2012).

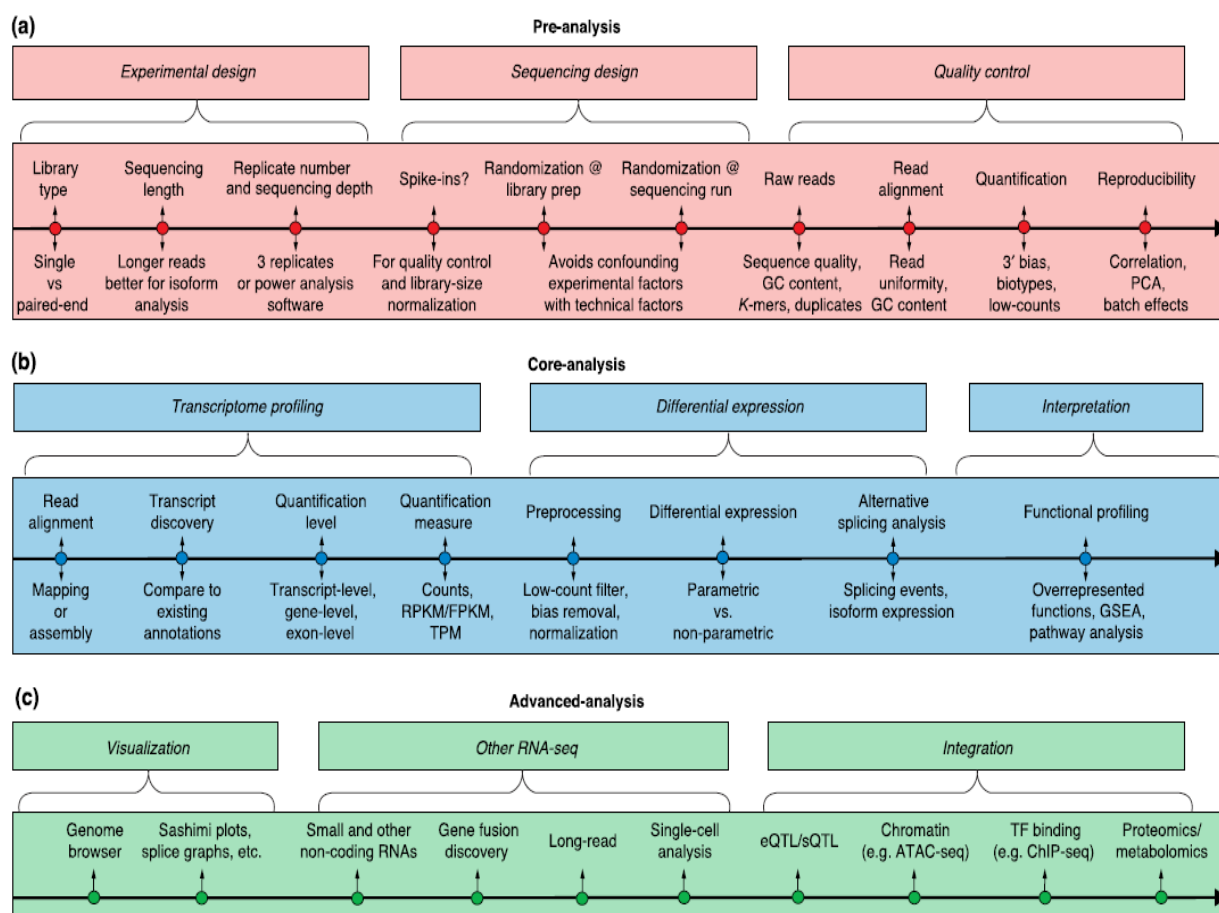
První krokem je kontrola kvality (FastQC), zda jsou získané sekvence dostatečné kvalitní, případně dojde k odstranění nekvalitních dat (Trimming). Následuje odstranění adaptorů a rozdělení všech dat do jednotlivých skupin podle přidávaných barkódů, jedná-li se o multiplexní experiment. Další kroky zahrnují například párování (v případě použití párového čtení, tj. z obou stran amplikonů). V závislosti na dostupnosti referenčních sekvencí se odvíjejí další kroky zpracování dat, existuje-li referenční transkriptom, jsou získané sekvence mapovány na tyto referenční sekvence. Je-li k dispozici pouze referenční genom, je nutné zahrnout při mapování i možnost rozdělování sekvencí, protože genom obsahuje introny, které při sekvenování transkriptomu nebudou přítomné, a proto některé sekvenované fragmenty budou mapovány do více oblastí genomu. Nejsložitější situace nastává, když není dostupná žádná referenční sekvence a je nutno spojit přečtené fragmenty metodou „*de novo assembly*“.

Po mapování sekvencí jsou jednotlivé zmapované sekvence spočítány a je vypočítán diferenciální profil všech transkriptů pro kvantitativní vyjádření jejich míry exprese. Tato část je u metody nejproblematičtější. Opět závisí na normalizaci dat, kdy existuje několik přístupů. Například normalizace na délku přečtené sekvence (FPKM, *Fragments Per Kilobase Millions*) zohledňuje počet fragmentů přečtených pro každý transkript vůči celé délce transkriptu, neboť logicky při stejné expresi budou mít delší transkripty přiřazeno více fragmentů, a kdyby se tento fakt nezohlednil, byly by ve výsledku falešně nadhodnocené.

Závěrečný krok vyhodnocení diferenciální exprese jednotlivých transkriptů, například při porovnání míry exprese genů v různých tkáních, umožňuje například program DESeq2 nebo edgeR.

Tyto dva statistické programy jsou schopny vyhodnocovat výsledky z více vzorků, tedy z různých cDNA knihoven.

Obrázek 15 nastiňuje komplexnost RNA-seq stanovení se všemi kroky, které jsou v průběhu experimentu nutné zvážit a projít. Od plánování experimentu (a), přes konkrétní provedení a vyhodnocení (b) až po pokročilejší analýzy poskytující biologicky relevantní informace (c) (Conesa et al., 2016).



Obrázek 15. Jednotlivé kroky RNA-seq analýzy (Převzato z Conesa et al., 2016).

2 Literatura

- ANDERSEN, C. L., JENSEN, J. L. & ØRNTOFT, T. F. 2004. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Research*, 64, 5245-5250.
- ANSORGE, W. J. 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*, 25, 195-203.
- BAO, B., WANG, Z., ALI, S., AHMAD, A., AZMI, A. S., SARKAR, S. H., BANERJEE, S., KONG, D., LI, Y., THAKUR, S. & SARKAR, F. H. 2012. Metformin Inhibits Cell Proliferation, Migration and Invasion by Attenuating CSC Function Mediated by Dereglating miRNAs in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Prevention Research*, 5, 355-364.
- BERÁNEK, M. 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. 1. vydání. Karolinum, Praha, 194 stran.
- BRAZMA, A., HINGAMP, P., QUACKENBUSH, J., SHERLOCK, G., SPELLMAN, P., STOECKERT, C., AACH, J., ANSORGE, W., BALL, C. A., CAUSTON, H. C., GAASTERLAND, T., GLENISSON, P., HOLSTEGE, F. C., KIM, I. F., MARKOWITZ, V., MATESE, J. C., PARKINSON, H., ROBINSON, A., SARKANS, U., SCHULZE-KREMER, S., STEWART, J., TAYLOR, R., VILO, J. & VINGRON, M. 2001. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet*, 29, 365-71.
- BUMGARNER, R. 2013. DNA microarrays: Types, Applications and their future. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, 0 22, Unit-22.1.
- BUSTIN, S., DHILLON, H. S., KIRVELL, S., GREENWOOD, C., PARKER, M., SHIPLEY, G. L. & NOLAN, T. 2015. Variability of the reverse transcription step: practical implications. *Clin Chem*, 61, 202-12.
- BUSTIN, S. & HUGGETT, J. 2017. qPCR primer design revisited. *Biomol Detect Quantif*, 14, 19-28.
- BUSTIN, S. & NOLAN, T. 2017. Talking the talk, but not walking the walk: RT-qPCR as a paradigm for the lack of reproducibility in molecular research. *Eur J Clin Invest*, 47, 756-774.
- BUSTIN, S. A. 2004. *A-Z of Quantitative PCR*, International University Line.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J. & WITTEWER, C. T. 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611-622.
- CONESA, A., MADRIGAL, P., TARAZONA, S., GOMEZ-CABRERO, D., CERVERA, A., MCPHERSON, A., SZCZESNIAK, M. W., GAFFNEY, D. J., ELO, L. L., ZHANG, X. & MORTAZAVI, A. 2016. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol*, 17, 13.
- FIALOVÁ, E., ZDEŇKOVÁ, K. & DEMNEROVÁ, K. 2017. Digitální PCR a její porovnání s PCR I. a II. generace. *Biopropect : bulletin biotechnologických společností v České republice a Slovenské republice*, 27, 91-94.
- FURUKAWA, M., RAFFELD, M., MATEO, C., SAKAMOTO, A., MOODY, T. W., ITO, T., VENZON, D. J., SERRANO, J. & JENSEN, R. T. 2005. Increased expression of insulin-like growth factor I and/or its receptor in gastrinomas is associated with low curability, increased growth, and development of metastases. *Clin Cancer Res*, 11, 3233-42.

- GRUNSTEIN, M. & HOGNESS, D. S. 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 3961-5.
- HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P. S. & GRIFFITH, R. 1992. SIMULTANEOUS AMPLIFICATION AND DETECTION OF SPECIFIC DNA-SEQUENCES. *Bio-Technology*, 10, 413-417.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G. & WATSON, R. 1993. KINETIC PCR ANALYSIS - REAL-TIME MONITORING OF DNA AMPLIFICATION REACTIONS. *Bio-Technology*, 11, 1026-1030.
- HOLLAND, P. M., ABRAMSON, R. D., WATSON, R. & GELFAND, D. H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 7276-80.
- HUGGETT, J. F., FOY, C. A., BENES, V., EMSLIE, K., GARSON, J. A., HAYNES, R., HELLEMANS, J., KUBISTA, M., NOLAN, R., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L., VANDESOMPELE, J., WITTEWER, C. T. & BUSTIN, S. A. 2013. The Digital MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 59, 892-902.
- KANE, S., GARG, H., KRISHNAN, N., SINGH, A. & PANDA, B. 2017. RNAtor: an Android-based application for biologists to plan RNA sequencing experiments [version 2; referees: 1 approved, 1 approved with reservations]. *F1000Research*, 6.
- KATAGIRI, F. & GLAZEBROOK, J. 2009. Overview of mRNA expression profiling using DNA microarrays. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 22, Unit 22 4.
- KCHOUK, M., GIBRAT, J.-F. & ELLOUMI, M. 2017. Generations of sequencing technologies: From first to next generation. *Biology and Medicine*, 9.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, 25, 402-408.
- NAVARRO, E., SERRANO-HERAS, G., CASTANO, M. J. & SOLERA, J. 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*, 439, 231-250.
- NOLAN, T., HANDS, R. E. & BUSTIN, S. A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1, 1559-1582.
- PFAFFL, M. W., TICHOPAD, A., PRGOMET, C. & NEUVIANS, T. P. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26, 509-515.
- POHL, G. & SHIH IE, M. 2004. Principle and applications of digital PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 4, 41-7.
- QUAN, P. L., SAUZADE, M. & BROUZES, E. 2018. dPCR: A Technology Review. *Sensors*, 18.
- RADFORD, A. D., CHAPMAN, D., DIXON, L., CHANTREY, J., DARBY, A. C. & HALL, N. 2012. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J Gen Virol*, 93, 1853-68.
- ROBERTS, T. C., COENEN-STASS, A. M. L., BETTS, C. A. & WOOD, M. J. A. J. B. P. O. 2014. Detection and quantification of extracellular microRNAs in murine biofluids. 16, 5.

- SABATH, D. E., BROOME, H. E. & PRYSTOWSKY, M. B. 1990. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA is a major interleukin 2-induced transcript in a cloned T-helper lymphocyte. *Gene*, 91, 185-91.
- SANDRINE JAVORSKI-MILLER, I. D. O. 2011. Real-Time PCR Instrumentation: An Instrument Selection Guide. In: SUZANNE KENNEDY, N. O. (ed.) *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide*. Caister Academic Press.
- SCHLAMP, K., WEINMANN, A., KRUPP, M., MAASS, T., GALLE, P. R. & TEUFEL, A. 2008. BlotBase: A northern blot database. *Gene*, 427, 47-50.
- SCHMITTGEN, T. D. & LIVAK, K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. *Nature Protocols*, 3, 1101-1108.
- SCHROEDER, A., MUELLER, O., STOCKER, S., SALOWSKY, R., LEIBER, M., GASSMANN, M., LIGHTFOOT, S., MENZEL, W., GRANZOW, M. & RAGG, T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 7, 3.
- SILVER, N., BEST, S., JIANG, J. & THEIN, S. L. 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *Bmc Molecular Biology*, 7.
- SYKES, P. J., NEOH, S. H., BRISCO, M. J., HUGHES, E., CONDON, J. & MORLEY, A. A. 1992. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques*, 13, 444-9.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. & SPELEMAN, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3.
- VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 1999. Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 9236-9241.
- WAN, R., ANH, V. N. & ASAI, K. 2012. Transformations for the compression of FASTQ quality scores of next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28, 628-635.
- WHELAN, J. A., RUSSELL, N. B. & WHELAN, M. A. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods*, 278, 261-9.
- XU, F., ACKERLEY, C., MAJ, MARY C., ADDIS, JANE B. L., LEVANDOVSKIY, V., LEE, J., MACKAY, N., CAMERON, JESSIE M. & ROBINSON, BRIAN H. 2008. Disruption of a mitochondrial RNA-binding protein gene results in decreased cytochrome *b* expression and a marked reduction in ubiquinol–cytochrome *c* reductase activity in mouse heart mitochondria. *Biochemical Journal*, 416, 15-26.

3 Stručný přehled výsledků

Vzhledem k rozmanitosti projektů, na nichž jsem se doposud podílela, je stručný přehled výsledků a soubor publikací předkládaných v této práci uspořádán do několika tematických celků. U každé publikace je zdůrazněna konkrétní souvislost se stanovením genové exprese.

Jako první je zařazena publikace, která je poměrně zásadní svým obsahem. Poukazuje na nutnost důkladně promyslet časové rozvržení experimentu z hlediska odběru vzorků a výběru měřených parametrů. Zejména při sledování a porovnávání vlivu látek na expresi genů na úrovni transkripce (množství mRNA) a na úrovni translace (množství proteinů), případně při požadavku tato stanovení dát do souvislostí se změnami aktivit sledovaných enzymů.

Druhá část zahrnuje čtyři publikace zabývající se problematikou referenčních genů (RG) při relativním vyhodnocování qPCR. V ideálním případě by každému experimentu mělo předcházet určení stability několika vybraných referenčních genů, které mohou být následně využity pro normalizaci dat. Tímto stanovením jsme se důkladně zabývali u třech typů organismů: čmeláků (*Bombus terrestris* a *B. lucorum*); myši (*Mus musculus*) a vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*). Poslední publikace této části se zabývá metodologií a výběrem RG pro stanovení mikroRNA publikovaná v monografii věnované epigenetice.

Třetí část obsahuje osm publikací zabývajících se vlivem přírodních látek na biotransformační enzymy v různých modelech. Dvě publikace vznikly na základě *in vitro* experimentů a dalších šest na základě *in vivo* experimentů. Dvě publikace se vztahují k myším modelu obezity navozenému *s.c.* podáváním glutamátu sodného (MSG) novorozeným mláďatům. Zabývali jsme se jednak obecným porovnáním exprese genů kódujících biotransformační enzymy mezi hubenými a tlustými myši v játrech a tenkém střevě, a porovnáním exprese glutathion-S-transferas v srdci a ledvinách. Další čtyři publikace zahrnují podávání potravních doplňků (extrakt ze zeleného čaje nebo brusinek) myším, kde byl sledován jejich vliv na expresi a aktivitu vybraných biotransformačních, případně antioxidantních enzymů.

Čtvrtá část zahrnuje tři publikace, které obsahují kromě qPCR i vysokokapacitní metody stanovení genové exprese. Jedná se o RNA sekvenování u lišaje tabákového (*Manduca sexta*) a u vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*) a o stanovení genové exprese pomocí DNA-čipů u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*).

Pátá část zahrnuje tři publikace z různých tematicky nesouvisejících projektů, do jejichž řešení jsem byla zapojena a na jejichž řešení jsem se podílela především při stanovení genové exprese metodou qPCR.

Na konci této části je shrnutí publikací s krátkými komentáři, na jejichž řešení jsem se podílela a neobsahují žádné stanovení genové exprese.

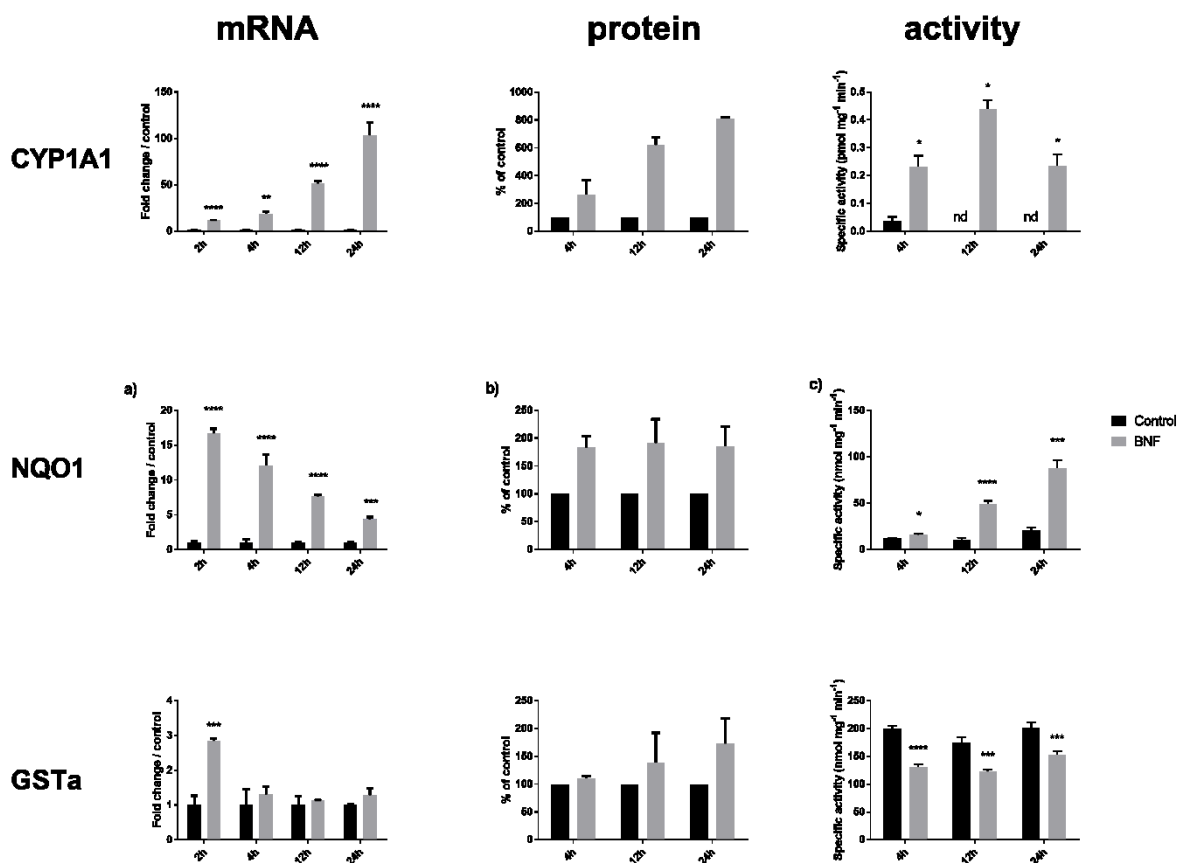
3.1 Časová závislost změn genové exprese

Lněničková K., Skálová L., Raisová Stuchlíková L., Szotáková B., Matoušková P. Induction of xenobiotic-metabolizing enzymes in hepatocytes by beta-naphthoflavone: Time-dependent changes in activities, protein and mRNA levels. (2018) Acta Pharmaceutica 68(1), pp. 75-85.*

Výše uvedená publikace je zaměřena na sledování časové závislosti účinku modelového induktoru na aktivitu a genovou expresi (na úrovni proteinů i na úrovni mRNA) tří vybraných biotransformačních enzymů. Jako experimentální model byla zvolena primární kultura potkaních hepatocytů. Experimenty byly rozvrženy tak, aby postihly časovou závislost odpovědi na přítomnost induktoru a mohly být sledovány korelace mezi jednotlivými parametry. Vzhledem k tomu, že se v buňce jedná o následné děje, které mohou být ovlivněny různými faktory, se všeobecně odpověď na přítomnost induktoru mezi hladinami mRNA a proteinů výrazně liší.

Nejpřesnější a nejspecifičtější je pravděpodobně stanovení hladiny mRNA, které ale může být ovlivněno systémovými chybami, mezi které patří například použití nevhodných referenčních genů (viz. následující kapitola), nebo vyšší riziko degradace vstupního materiálu, RNA, zapříčiněné vsudypřítomnými RNAsami. Na druhou stranu výpovědní hodnota tohoto parametru může být z farmakologického hlediska nedostačující. Stanovení hladiny proteinů pomocí specifických protilátek může být zatíženo větší chybou a malé rozdíly mohou být pominuty, výpovědní hodnota bude však o něco vyšší. Z farmakologického hlediska vítězí stanovení enzymové aktivity, které ale může být komplikované, především kvůli stanovování ve směsných vzorcích a nejednoznačné specifičnosti používaných substrátů. Sledování všech tří hladin má proto své opodstatnění, které může odhalit místa dalších regulací.

V předkládané publikaci byl sledován indukční efekt β -naftoflavonu (BNF), modelového induktoru enzymů regulovaných přes receptor pro aromatické uhlovodíky (AhR), na biotransformační enzymy cytochrom P450 (CYP) 1A1/2, NAD(P)H:chinonoxidoreduktasu (NQO1) a glutathion-S-transferasu alfa (GSTa). Kvůli lepší dostupnosti byla použita kultura primárních potkaních hepatocytů připravená v naší laboratoři pomocí dvoustupňové kolagenasové metody. Vzorky byly odebrány 2, 4, 12 a 24 hodin po indukci. Výsledky se výrazně lišily u všech sledovaných enzymů. Pouze CYP1A1/2 vykazoval vlivem BNF časově závislý nárůst ve všech sledovaných parametrech. Hladina mRNA NQO1 byla nejvíce zvýšená po dvou hodinách inkubace s BNF a měla postupně klesající tendenci, protein se mírně zvýšil po čtyřech hodinách bez dalšího nárůstu a aktivita rostla až do posledního měření. U GSTa byla pozorována zvýšená hladina mRNA pouze po dvou hodinách s následným poklesem na úroveň kontroly. Množství proteinu se téměř nezměnilo a aktivita naopak klesla pod úroveň kontroly (Obr. 16).



Obrázek 16. Časová závislost hladin mRNA, proteinů a aktivity enzymů. (Upraveno z Lněničková et al., 2018, Příloha I).

Modulační účinek látek je důležitým kritériem při schvalování léčiv, především při hodnocení potenciálních interakcí mezi současně podávanými léčivy. Z našich výsledků je patrné, že stanovení pouze v jednom časovém intervalu nebo jednoho vybraného parametru může být zavádějící.

3.2 Výběr referenčních genů pro qPCR

Díky rychlosti a spolehlivosti bývá kvantitativní PCR v reálném čase první volbou při sledování změn expresí menšího množství genů. Vzhledem k obtížnosti získávání standardů pro absolutní kvantifikaci je častěji používáno relativní stanovení, při kterém jsou porovnávány hladiny mRNA mezi jednotlivými vzorky. Toto vyhodnocení ale vyžaduje normalizaci pomocí referenčních genů, dříve označovaných jako tzv. "housekeeping geny". Referenční geny pro daný experiment musí vykazovat stabilitu ve všech vzorcích a nesmějí být ovlivněny podmínkami experimentu. Každému experimentu by mělo předcházet ověření stability několika potenciálních referenčních genů.

3.2.1 Výběr referenčních genů pro qPCR u různě starých čmeláků

Horňáková D.¹, Matoušková P.¹, Kindl J., Valterová I., Pichová I. *Selection of reference genes for real-time polymerase chain reaction analysis in tissues from *Bombus terrestris* and *Bombus lucorum* of different ages. (2010) Analytical Biochemistry 397(1), pp. 118-120.*

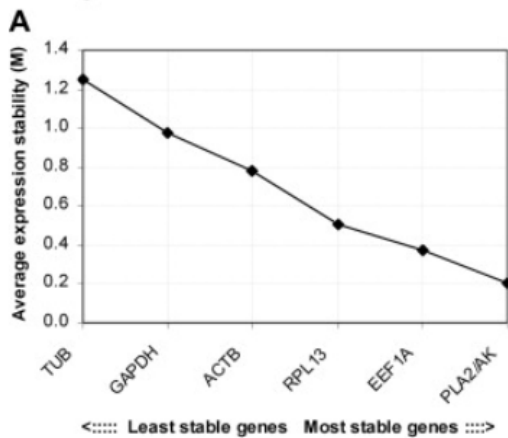
1-autoři přispěli rovnocenným podílem

Výše zmíněná publikace zahrnuje výběr referenčních genů (RG) pro normalizaci dat pro qPCR. Byla sledována stabilita osmi vybraných genů v labiální žláze a tukovém tělese dvou druhů čmeláků různého stáří (č. zemní - *Bombus terrestris*, č. hájový – *B. lucorum*). Situaci komplikovala nedostupnost genomu obou druhů čmeláků v době stanovení (v současnosti je k dispozici genom čmeláka zemního), a proto bylo nutné pomocí degenerovaných primerů navržených podle dostupných sekvencí jiných organismů tyto geny namnožit a osekvenovat. Následovalo navržení specifických primerů pro qPCR a ověření jejich funkčnosti a účinnosti. K hodnocení stability testovaných RG byl použit program GeNorm, který vyhodnocuje párovou variabilitu mezi hodnocenými geny a řadí geny od nestabilních po dva nejstabilnější. Zároveň GeNorm doporučí počet potřebných genů pro konkrétní soubor vzorků. Pro minimalizaci chyby se doporučuje vždy použít nejméně dva RG.

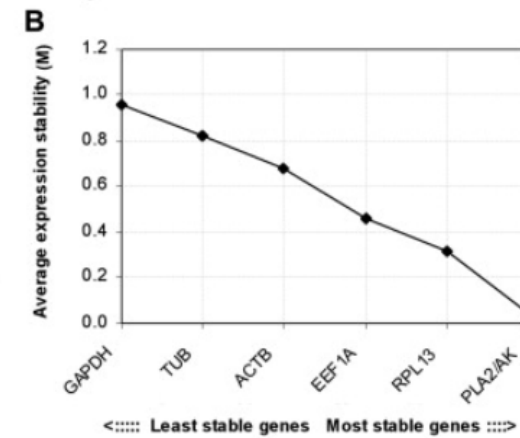
Výsledky ukázaly, že z našeho výběru sedmi potenciálních RG byly nejstabilnější geny kódující argininkinasu (AK) a fosfolipas A2 (PLA2) v obou tkáních čmeláka zemního (*B. terrestris*). U čmeláka hájového (*B. lucorum*) byly v obou tkáních nejstabilnější geny kódující elongační faktor 1 alfa (EEF1a) a opět PLA2. Soubor testovaných genů obsahoval také dva z nejčastěji používaných referenčních genů glyceralddehyd-3-fosfátdehydrogenasu (GAPDH) a β -aktin (ACTB), oba se ale jevily jako poměrně nestabilní v obou testovaných druzích (Obr. 17).

Bombus terrestris

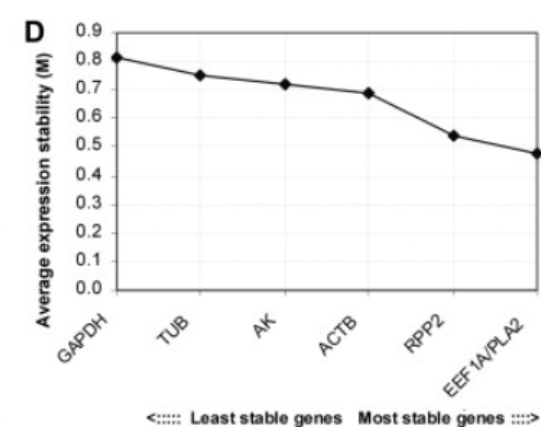
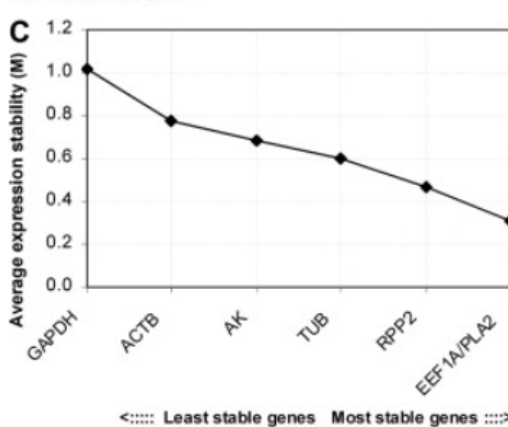
Labial gland



Fat body



Bombus lucorum



Obrázek 17. Výstup z programu GeNorm pro výběr nejstabilnějších referenčních genů. (Převzato z Horňáková et al., 2010, Příloha II)

3.2.2 Výběr referenčních genů pro kvantitativní stanovení mRNA a mikroRNA u myšího modelu obezity

Matoušková P.*, Bártíková H., Boušová I., Hanušová V., Szotáková B., Skálová L., Reference genes for real-time PCR quantification of messenger RNAs and microRNAs in mouse model of obesity. (2014) PLOS ONE 9(1), e86033.

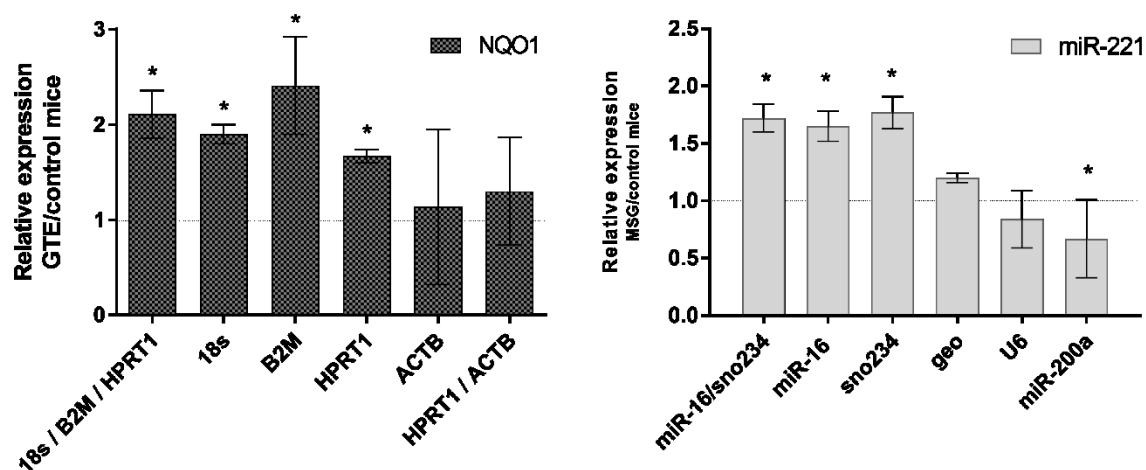
V této publikaci jsme se zabývali výběrem RG pro myší model obezity, který jsme používali v naší laboratoři při studiích vlivu potravních doplňků na biotransformační enzymy tlustých a hubených myší. Tento model je vytvořen opakovaným subkutánním podáváním glutamátu sodného (MSG, *monosodium glutamate*) novorozeným myším, který způsobí zánik části hypotalamu (*nucleus*

arcuatus), která se podílí na regulaci příjmu potravy. Takto ošetřené myši mají tendenci k obezitě způsobené pravděpodobně snížením fyzické aktivity, bez výrazně vyššího příjmu potravy. Model je vhodný především pro experimenty s podáváním různých doplňků stravy, protože jejich efekt není ovlivněn vysokotučnou dietou, která se nejčastěji používá k navození obezity u myši.

Pro zmíněnou publikaci byly navrženy dvě sady primerů, jedna pro testování RG pro stanovení hladin mRNA a jedna pro výběr RG pro normalizaci mikroRNA. První sada zahrnovala 7 genů, kde kromě běžně používaných GAPDH a ACTB byly také primery pro 18S ribosomální RNA, která se také často používá jako RG pro qPCR. Byly analyzovány vzorky myši hubených, tlustých a z obou skupin vzorky po podávání výtažku ze zeleného čaje izolované ze dvou tkání, jater a tenkého střeva, které jsme využívali v našich experimentech nejčastěji. Vyhodnocení probíhalo třemi programy (GeNorm, NormFinder a BestKeeper), které se běžně používají pro výběr RG a mají různé algoritmy výpočtů. I přesto, že se 18S přímo nedoporučuje používat vzhledem k jinému původu (nejedná se o mRNA jako u ostatních genů a může tak podléhat jiné regulaci, navíc tvoří velkou část celkové RNA a Ct hodnoty jsou výrazně nižší, čímž může dojít ke zkreslení výsledků), byla mezi třemi nejstabilnějšími geny v obou sadách vzorků. Naopak GAPDH ani ACTB se jako stabilní nejevily. Výsledkem bylo doporučení použít tři referenční geny pro obě sady.

Pro testování mikroRNA jsme dle dostupné literatury vybrali a navrhli primery pro 10 genů, které zahrnovaly 7 mikroRNA, dvě malé jadéřkové RNA a malou nekódující RNA U6, která se velmi často používá při kvantifikacích mikroRNA (nutno podotknout, že bez jakékoliv validace stability). Sada testovaných vzorků byla stejná jako v předchozím experimentu, nicméně z hlediska exprese testovaných mikroRNA se obě sady jevily jako homogennější a variabilita mezi testovanými mikroRNA byla mnohem menší. Výsledné doporučení pro qPCR experimenty sledující hladiny mikroRNA bylo použití sno234 a miR-16 pro játra a miR-186 a miR-200a pro tenké střevo.

Pro validaci získaných výsledků byly použity dva geny, NQO1, u které jsme dle dříve publikovaných dat očekávali nárůst po podávání extraktu ze zeleného čaje, a miR-221, u které bylo popsáno její zvýšení při obezitě. Na obrázku 18 jsou grafy zobrazující výstup tohoto validačního experimentu. Při normalizaci dat s použitím tří nejstabilnějších RG v kombinaci nebo jednotlivě vykazuje hladina mRNA NQO1 (po působení extraktu ze zeleného čaje) signifikantní zvýšení, naopak při použití nestabilního RG (ACTB) toto zvýšení není patrné. Podobně u stanovení hladin miR-221 je při normalizaci vůči stabilním RG pozorováno (u tlustých myši) zvýšení, a naopak vůči nestabilní U6 toto zvýšení patrné opět není, navíc při použití nestabilního RG (miR-200a) k normalizaci se dokonce exprese miR-221 jevila jako snížená. Tento experiment jasně prokázal nutnost ověření stability referenčních genů.



Obrázek 18. Validace výběru referenčních genů pro stanovení mRNA a mikroRNA. (Upraveno z publikace Matoušková et al., 2014, Příloha III)

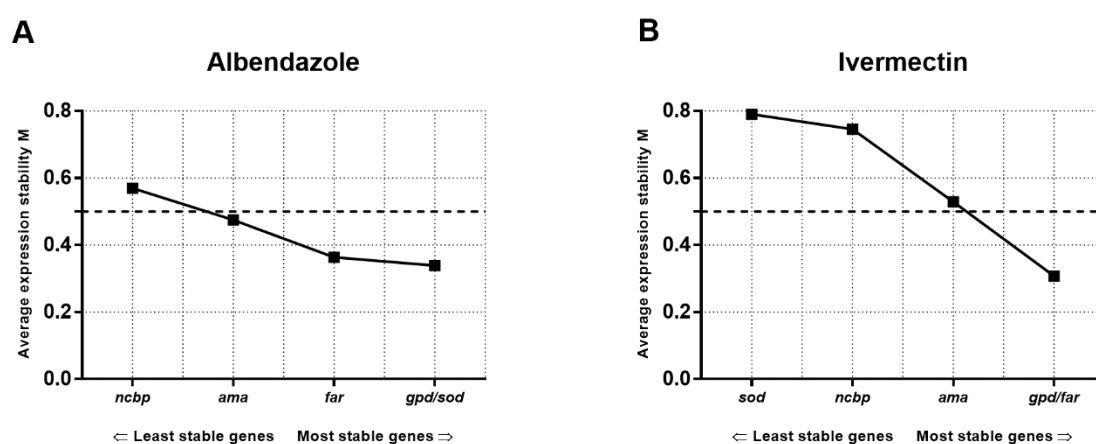
3.2.3 Výběr referenčních genů pro qPCR u vlasovky slezové

Lecová L., Růžičková M., Laing R., Vogel H., Szotáková B., Prchal L., Lamka J., Vokřál I., Skálová L., **Matoušková P.***, *Reliable reference gene selection for quantitative real time PCR in Haemonchus contortus.* (2015) *Molecular and Biochemical Parasitology* 201, pp. 123-127.

V této publikaci jsme vybírali referenční geny pro qPCR u vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*). Jedná se o parazita malých přežvýkavců, který ročně způsobuje velké ekonomické ztráty. Tímto helmintem se dlouhodobě v laboratoři prof. Skálové zabýváme, především studiem metabolismu a odbourávání anthelmintik. Publikace genomu *H. contortus* v roce 2013 usnadnila i metodiky molekulární biologie, protože jsou již dostupné sekvence potenciálních referenčních genů pro návrh primerů.

Stabilita vybraných jedenácti genů byla testována na dospělých dvou kmenů vlasovky slezové, citlivém kmenu ISE a multirezistentním kmenu WR, samci a samice byli testováni odděleně. Stabilitu pěti nejstabilnějších genů jsme dále testovali na vzorcích získaných z obou kmenů po vystavení nejčastěji používaným anthelmintikům (albendazol a ivermektin). Získaná data jsme analyzovali pomocí volně dostupného webového programu RefFinder, který sdružuje čtyři programy pro vyhodnocení referenčních genů. Mezi pět nejstabilnějších genů tentokrát patřil i gen pro GAPDH (*gpd*, zkratka doporučená pro názvosloví genů u vlasovky slezové), který se po testování působením obou anthelmintik ukázal jako nejstabilnější. Při porovnání působení albendazolu a

ivermektinu na stabilitu těchto genů je opět znázorněna nutnost validace stability referenčních genů. Z obrázku 19 je vidět, že u vzorků po působení albendazolu se jako nejstabilnější ukázala dvojice GAPDH (*gpd*) a superoxiddismutasa (*sod*). Druhý zmíněný byl však ve vzorcích po působení ivermektinu nejméně stabilní, což naznačuje, že by *sod* mohl být jeho působením ovlivněn a byl by tak naprosto nevhodným referenčním genem. Podle těchto výsledků by celkové doporučení bylo při experimentu s oběma anthelmintiky použít pro normalizaci qPCR kombinaci *gdp* a genu pro protein vázající mastné kyseliny (*far*), protože u vzorků ovlivněných ivermektinem to byly dva nejstabilnější geny a u vzorků ovlivněných albendazolem první a třetí (dle hodnoty stability M se stále jednalo o velmi stabilní gen – viz. Obr. 19).



Obrázek 19. Analýza vybraných referenčních genů programem geNorm po působení albendazolu (A) a ivermektinu (B). (Převzato z Lecová et al., 2015, Příloha IV).

3.2.4 Metody výběru referenčních genů pro qPCR stanovení mikroRNA

Matoušková P. *, *MicroRNAs and reference gene methodology. (2017) Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics, Springer int. P. pp.1-17.*

Tato publikace představuje přehledovou metodologickou kapitolu v knize „*Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics*“ a zabývá se obecně mikroRNA, jejich biogenezí, názvoslovím a především problematikou výběru referenčních genů a normalizací qPCR dat.

MikroRNA, nekódující malé jednořetězcové molekuly RNA, se těší v poslední době velkému zájmu vědecké komunity. Jsou to molekuly, které se podílejí na jemné regulaci téměř všech procesů v buňce. Poprvé byly zmíněny v roce 1993, kdy byla u háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*) objevena krátká molekula RNA (*lin-4*) schopná snižovat množství transkriptu genu *lin-14*. Od té doby

byla publikována celá řada poznatků o mikroRNA, které se staly součástí učebnic molekulární biologie. Objev cirkulujících mikroRNA v krvi a jejich deregulace v řadě nemocí naznačily možnost využít tyto molekuly jako časné biomarkery vznikajícího onemocnění.

Problematika referenčních genů zmíněná výše se netýká pouze stanovení množství mRNA, ale také stanovení hladin mikroRNA. Bohužel neexistuje „univerzální“ referenční mikroRNA, která by byla za všech okolností stabilní. Běžný přístup „vzít“ jednu mikroRNA, v horším případě jednu malou RNA (nejčastěji U6), a použít ji jako referenční gen může vést k podstatnému zkreslení výsledků. Bohužel se tak velmi často děje. Konkrétně U6 bývá používána velmi často i ve zcela nevhodných případech. Například při stanovení cirkulujících mikroRNA v plasmě nebo séru je U6 přítomná pouze díky hemolýze nebo srážení, což jsou faktory vysoce ovlivněné preanalytickou manipulací se vzorky. Existují však i publikace, které se touto problematikou zabývají a doporučují konkrétní mikroRNA pro daný typ experimentu. Z výsledků v těchto publikacích lze vyjít při návrhu referenčních genů pro vlastní experiment. Vždy je však nutné ověřit několik RG (mikroRNA) a vybrat z nich 2-3 nejstabilnější.

3.3 Vliv přírodních látek na expresi biotransformačních enzymů

Do této části jsem zařadila publikace, ve kterých jsme v různých modelech testovali vliv přírodních látek na expresi biotransformačních enzymů.

3.3.1 Stanovení *in vitro*

*Lněničková K., Procházková E., Skálová L., Matoušková P., Bártíková H., Souček P., Szotáková B.**, *Catechins variously affect activities of conjugation enzymes in proliferating and differentiated Caco-2 cells. (2016) Molecules 21, 1186.*

Tato studie se zabývala působením extraktu ze zeleného čaje, který je bohatý na katechiny, a epigalokatechingalátu (EGCG), který je v něm nejvíce zastoupen. Jako model jsme použili CaCo-2 buňky pocházející z lidského kolorektálního adenokarcinomu, které mají po diferenciaci fenotyp podobný enterocytům a využívají se proto jako model buněk tenkého střeva. Porovnávali jsme vliv extraktu ze zeleného čaje a EGCG na životnost buněk a především na aktivity a hladiny mRNA konjugačních enzymů - sulfotransferasy, UDP-glukuronosyltransferasy, katechol-O-methyltransferasy a glutathion-S-transferasy. Zjistili jsme, že po diferenciaci buněk jsou hladiny mRNA všech testovaných enzymů zvýšené, nikoliv aktivity. Extrakt ze zeleného čaje ani EGCG neměly významný vliv na životnost buněk ani hladiny mRNA. Aktivity některých konjugačních enzymů v diferencovaných buňkách byly pouze mírně změněné, takže bychom nepředpokládali, že hrozí interakce se společně podávanými léčivy. Zároveň ale nelze říci, že by měl zelený čaj nebo EGCG pozitivní indukční vliv na tyto enzymy.

*Zárybnický T., Matoušková P., Lancošová B., Šubrt Z., Skálová L., Boušová I.**, *Inter-individual variability in acute toxicity of R-pulegone and R-menthofuran in human liver slices and their influence on miRNA expression changes in comparison to acetaminophen. (2018) International Journal of Molecular Sciences 19(6), 1805.*

Toto je naše nejnovější publikace, která vznikla v rámci grantu GAČR 18-09946S doc. Boušové, který se zabývá hepatotoxicitou terpenů. V této publikaci jsme se zabývali studiem hepatotoxicity monoterpenů R-pulegonu a R-menthofuranu, častých v silicích rostlin. Jako model jsme využili ultratenké řezy z lidských jater, které jsou pro stanovení toxicity látek velmi dobrým modelem, protože obsahují všechny typy jaterních buněk při zachování trojrozměrné struktury tkáně. Prokázali jsme poměrně vysokou toxicitu R-pulegonu (vyšší než u paracetamolu použitého jako pozitivní kontrola). Dále jsme sledovali vliv monoterpenů na expresi vybraných jaterních

mikroRNA. Obecně jsme zaznamenali vysokou variabilitu v hladinách expresí testovaných mikroRNA mezi jednotlivými vzorky jater (k dispozici jsme měli vzorky od pěti pacientů, kteří podstoupili částečnou hepatektomii). Nejvýznamnější změnu jsme zaznamenali u miR-155-5p, která je obecně považována za marker zánětu. V našem experimentu se jeví jako slibný kandidát pro určení časné hepatotoxicity monoterpenů a zaslouží si další pozornost.

Za zmínku stojí, že původně, dle publikované literatury, jsme pro normalizaci qPCR dat vybrali malou jadernou U6, ale ta po ověření stability v testovaných vzorcích vykazovala vysokou variabilitu, a proto jsme použili jako referenční gen miR-93-5p, která se jevila jako stabilní.

3.3.2 Stanovení *in vivo*

V dalším projektu jsme se věnovali studiu vlivu přírodních látek na biotransformační a antioxidační enzymy u myši *in vivo*. Především jsme se zabývali myším modelem obezity navozené podáváním glutamátu sodného (MSG) novorozeným myším. Tento model jsme využili k několika různým experimentům, které zahrnovaly stanovení exprese biotransformačních enzymů většinou jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinů. V úvodu tohoto projektu jsme nejdříve testovali, jaký vliv má obezita na tyto enzymy. A dále jsme zjišťovali, jaký vliv má na biotransformační a antioxidační enzymy podávání suplementů. Těmito experimenty bychom mohli odhalit potenciální interakce současného podávání léků s běžnými potravními doplňky.

3.3.2.1 Biotransformační a antioxidační enzymy u MSG-obézních myši

Matoušková P.*, Bártíková H., Boušová I., Levorová L., Szotáková B., Skálová L. *Drug-metabolizing and antioxidant enzymes in monosodium L-glutamate obese mice. (2015) Drug Metabolism and Disposition 43, pp. 258-265.*

Boušová I.,* Košťáková Š., **Matoušková P.**, Bártíková H., Szotáková B., Skálová L. *Monosodium glutamate-induced obesity changed the expression and activity of glutathione S-transferases in mouse heart and kidney. (2017) Pharmazie 72, pp. 257-259.*

Vzrůstající prevalence obezity v celém světě je alarmující. Fyziologické změny, které obezitu doprovázejí, mohou ovlivnit expresi a aktivitu různých enzymů. Vzhledem k tomu, že biotransformační a antioxidační enzymy mají velkou úlohu v obranných mechanismech organismu, může mít jejich ovlivnění závažné následky. V první publikaci jsme porovnávali hubené a tlusté MSG myši. Kromě různých biochemických parametrů (např. hladiny hormonů leptinu a insulinu) jsme také porovnávali v játrech a tenkém střevě vybrané biotransformační a antioxidační enzymy na

úrovni mRNA, proteinů i enzymové aktivity. Snížení či zvýšení těchto enzymů při obezitě může ovlivnit farmakokinetiku podávaných léčiv. Dále jsme stanovovali expresi Nrf2, což je transkripční faktor reagující na antioxidační podněty a regulující příslušné enzymy. U obézních myší jsme pozorovali více než dvakrát vyšší transkripci tohoto faktoru. S tím korelovalo i zvýšené množství NQO1 (na všech testovaných úrovních), což je typický cílový gen, který se používá jako pozitivní kontrola při studiu Nrf2. Signifikantní zvýšení tohoto regulačního faktoru u obézních myší může být známkou ochranné adaptace na vyšší oxidační stres, který byl již dříve u obezity popisován. Kromě NQO1 byla v játrech také ve všech testovaných parametrech zvýšená například UDP-glukuronosyltransferasa 1A (UGT1A), a naopak snižená byla glutathion-S-transferasa pí (GSTp), také ve všech sledovaných parametrech (aktivita byla měřena společně pro všechny isoformy enzymu). Většina změn, které jsme pozorovali, byla patrná pouze v játrech, a nikoliv v tenkém střevě. Naopak v tenkém střevě jsme pozorovali spíše sníženou aktivitu některých antioxidačních enzymů, jako například katalasy (CAT) nebo glutathionreduktasy (GR) (Tab. 1). V tenkém střevě byla nízká korelace mezi jednotlivými parametry měření. Například u glutathionperoxidasy (GPx) jsme pozorovali sníženou hladinu mRNA, nezměněnou hladinu proteinu a mírně zvýšenou aktivitu. Nutno podotknout, že aktivita byla měřena společně pro všech osm isoform enzymu, ale množství proteinu a mRNA bylo stanoveno pouze pro GPx2, dle literatury v gastrointestinálním traktu převládající isoformu.

Jak jsme několikrát pozorovali korelace mezi hladinami mRNA, proteinu a aktivity v jednom časovém bodě je poměrně slabá, protože každý parametr se zvedá v jinou dobu. Takže při stanovení všech tří úrovní v jednom čase se nemusí projevit změny ve všech parametrech. Některé výsledky si ale vysvětlit nedokážeme, například u superoxidodismutasy jsme pozorovali nezměněnou aktivitu, zvýšené množství proteinu a snížené množství mRNA. Nicméně i taková data jsou v živých systémech poměrně běžná.

Tabulka 1: Porovnání hubených a tlustých myší - ukázka výsledků měření aktivity, proteinu a mRNA antioxidantních enzymů z tenkého střeva. (Převzato z Matoušková et al., 2015, Příloha VIII).

	Catalytic Activities		Immunoblotting		mRNA Quantity	
	Control	Obese	Control	Obese	Control	Obese
Liver						
SOD1	100.0 ± 1.5	104.8 ± 1.4	100.0 ± 6.9	114.5 ± 11.7	1.00 ± 0.46	1.36 ± 0.33
CAT	100.0 ± 1.4	99.3 ± 37.7	100.0 ± 3.2	88.7 ± 5.0*	1.00 ± 0.37	1.19 ± 0.20
GPx ^a	100.0 ± 0.5	78.3 ± 1.7*	n.d.	n.d.	1.00 ± 0.31	3.21 ± 1.15*
GR	100.0 ± 7.3	103.4 ± 2.6	100.0 ± 16.9	118.3 ± 14.0	1.00 ± 0.43	1.31 ± 0.48
TR	100.0 ± 12.3	107.2 ± 16.5	100.0 ± 13.8	66.40 ± 5.0*	1.00 ± 0.46	0.79 ± 0.23
Small Intestine						
SOD1	100.0 ± 4.5	106.0 ± 4.7	100.0 ± 10.0	151.4 ± 10.7*	1.00 ± 0.44	0.52 ± 0.08
CAT	100.0 ± 7.7	61.2 ± 1.7*	100.0 ± 10.6	160.4 ± 8.1*	1.00 ± 0.66	1.15 ± 0.42
GPx ^a	100.0 ± 3.8	119.0 ± 7.0*	100.0 ± 9.1	89.0 ± 7.2	1.00 ± 0.17	0.30 ± 0.12*
GR	100.0 ± 2.6	89.8 ± 1.5*	100.0 ± 7.3	147.7 ± 9.0*	1.00 ± 0.07	0.94 ± 0.25
TR	100.0 ± 2.0	86.9 ± 7.5*	100.0 ± 18.1	102.7 ± 11.9	1.00 ± 0.13	0.63 ± 0.12*

n.d., Not detected.

^aRelative specific activity measured for all isoforms, protein, and mRNA GPx2-specific isoform only.

*Statistically significant ($P < 0.05$).

V druhé publikaci této kapitoly jsme navázali na zjištěnou sníženou aktivitu GST v játrech obézních MSG myší a zaměřili se na tuto nadrodinu enzymů v srdcích a ledvinách hubených a obézních jedinců. GST jsou zástupci enzymů zajišťující druhou fázi biotransformace xenobiotik, katalyzující připojení tripeptidu glutathionu na hydroxylovou skupinu xenobiotik (přítomnou nebo zavedenou v první fázi biotransformace). Tato nadrodina obsahuje celou řadu isoform rozdělených dle sekvenčních podobností do tříd alfa (a), pí (p), mu (m), theta (t) a dalších.

K testování enzymových aktivit jsme použili spektrofotometrickou metodu se substrátem (1-chloro-2,4-dinitrobenzen) univerzálním pro většinu GST isoform. Hladiny proteinů jsme sledovali pomocí Western blotingu s použitím protilátek detekujících rodiny GST (a, m, p) a hladiny mRNA jsme sledovali pro jednotlivé isoformy (v případě velké sekvenční podobnosti byly primery pro qPCR navrženy pro více isoform). V srdcích obézních myší jsme zjistili sníženou aktivitu GST; na úrovni proteinu i mRNA byla snížena pouze isoforma GSTp. Na druhou stranu v ledvinách byla GST aktivita mírně zvýšená. Za toto zvýšení by v ledvinách mohla být zodpovědná rodina GSTa, neboť bylo zvýšené i množství proteinu. Hladina mRNA byla zvýšená u isoformy GSTa1/2 (Tab. 2). Zvýšená aktivita GST v ledvinách může být kompenzačním mechanismem pro vyšší oxidační stres způsobený obezitou. Na druhou stranu snížená aktivita v srdci může způsobit nedostatečnou kompenzaci oxidačního stresu a může znamenat rizikový faktor doprovázející obezitu.

Tabulka 2. Katalytická aktivita, hladina proteinů a mRNA měřené v srdcích a ledvinách hubených a obézních myší. (převzato z Boušová et al., 2017, Příloha IX).

Enzyme	Catalytic activity		Immunoblotting	mRNA quantity				
	control	obese		control	obese			
			class		isoform			
Heart								
GST	93.6 ± 15.6	45.7 ± 6.1 ▼	GSTA	100.0 ± 3.1	61.5 ± 42.0	Gsta1/2 ^a	1.00 ± 0.34	3.37 ± 1.71
				Gsta3	1.00 ± 0.40	0.65 ± 0.51		
			Gsta4	1.00 ± 0.23	1.08 ± 0.36			
			Gstm3	1.00 ± 0.53	1.31 ± 0.23			
			Gstp1/2 ^a	1.00 ± 0.32	0.44 ± 0.06 ▼			
Kidney	79.3 ± 10.1	104.0 ± 10.7 ▲	GSTA	100.0 ± 34.1	738.2 ± 278.9 ▲	Gsta1/2 ^a	1.00 ± 0.12	6.44 ± 1.25 ▲
				Gsta3	1.00 ± 0.28	0.94 ± 0.57		
			Gsta4	1.00 ± 0.10	1.16 ± 0.19			
			Gstm3	1.00 ± 0.21	0.69 ± 0.28			
			Gstp1/2 ^a	1.00 ± 0.19	1.02 ± 0.31			

Abbreviation: GST represents glutathione S-transferase. Specific activity (nmol/min/mg of protein) is expressed as mean ± S.D., where n = 3. Results of immunoblotting and mRNA quantification are expressed as relative mean ± standard deviation (S.D.), controls set to 100%, where n = 4. mRNA quantity expressed as a fold change. Significantly (P < 0.05) increased (▲) or decreased (▼) in comparison to control. ^a Two isoforms analyzed together.

3.3.2.2 Vliv extraktu ze zeleného čaje na biotransformační enzymy u myší

Matoušková P., Bártíková H., Boušová I., Szotáková B., Martin J., Skorkovská J., Hanušová V., Tománková V., Anzenbacherová E., Lišková B., Anzenbacher P., Skálová L. * *Effect of defined green tea extract in various dosage schemes on drug-metabolizing enzymes in mice in vivo.* (2014) *Journal of Functional Foods* 10, pp. 327-335.

Boušová I.,* Matoušková P., Bártíková H., Szotáková B., Hanušová V., Tománková V., Anzenbacherová E., Lišková B., Anzenbacher P., Skálová L. *Influence of diet supplementation with green tea extract on drug-metabolizing enzymes in a mouse model of monosodium glutamate-induced obesity.* (2016) *European Journal of Nutrition* 55, pp. 361-371.

V těchto dvou publikacích jsme se zabývali vlivem katechinů ze zeleného čaje na biotransformační enzymy u normálních myší (první publikace) a u myší s obezitou navozenou MSG (druhá publikace). Zelený čaj je po vodě druhý nejčastější nealkoholický nápoj. Také výtažky ze zeleného čaje patří mezi populární potravní doplňky. Naše *in vivo* studie měly objasnit, zda mají katechiny ze zeleného čaje vliv na biotransformační enzymy a mohou tak případně ovlivnit metabolismus současně podávaných léčiv.

Definovaný extrakt ze zeleného čaje (Polyphenon, obsahující především katechiny) jsme myším podávali ve třech různých schématech. První skupina dostávala čtyři týdny stravu obohacenou o vysokou dávku Polyphenonu (0,1 %), druhá skupina dostávala 4 týdny nízkou dávku

(0,01 %) a třetí skupina dostávala vysokou dávku pouze tři dny. Po konci experimentu byly myši usmrceny, pro biochemickou analýzu byla odebrána krev a v plasmě byly změřeny hladiny insulinu a leptinu. Pro naše experimenty jsme použili játra a tenké střevo, pro měření enzymové aktivity a množství proteinu jsme připravili subcelulární frakce a pro měření hladin mRNA jsme z části tkání vyizolovali celkovou RNA.

U standardních myší ve skupině s dlouhodobou nízkou dávkou Polyphenonu, která simulovala pravidelné pití 2-3 šálků zeleného čaje denně, jsme zjistili v játrech mírné zvýšení aktivity některých isoform cytochromů P450 a také NQO1, která přeměňuje chinony na hydrochinony a snižuje oxidační stres, což může přispívat k chemopreventivnímu efektu zeleného čaje. Hubené myši konzumující vyšší dávku, simulující chronické předávkování doplňky obsahujícími extrakt ze zeleného čaje, měly v tenkém střevě u některých enzymů zvýšené aktivity (například CYP3A4) a naopak snížené aktivity jiných enzymů (například CBR1 či GST). Tyto efekty mohou ovlivnit dostupnost některých léčiv a jiných xenobiotik. Krátké podávání vysokých dávek výrazněji ovlivnilo enzymy z jater i tenkého střeva. Překvapivě byl účinek krátkého podávání výraznější než účinek dlouhodobého podávání, kdy zřejmě došlo k adaptaci organismu na neustálou vyšší dávku katechinů.

Jak je patrné z tabulky 3, vliv katechinů způsobil v některých případech změnu enzymové aktivity, které předcházela změna v množství mRNA a/nebo proteinů. Z těchto poznatků lze říci, že katechiny mohou ovlivňovat biotransformační enzymy na různých úrovních od transkripční či post-transkripční až po přímou modulaci enzymové aktivity.

Tabulka 3. Ukázka působení extraktu ze zeleného čaje na expresi vybraných cytochromů P450 v tenkém střevě hubených myší. (Převzato z Matoušková et al., 2015, Příloha X).

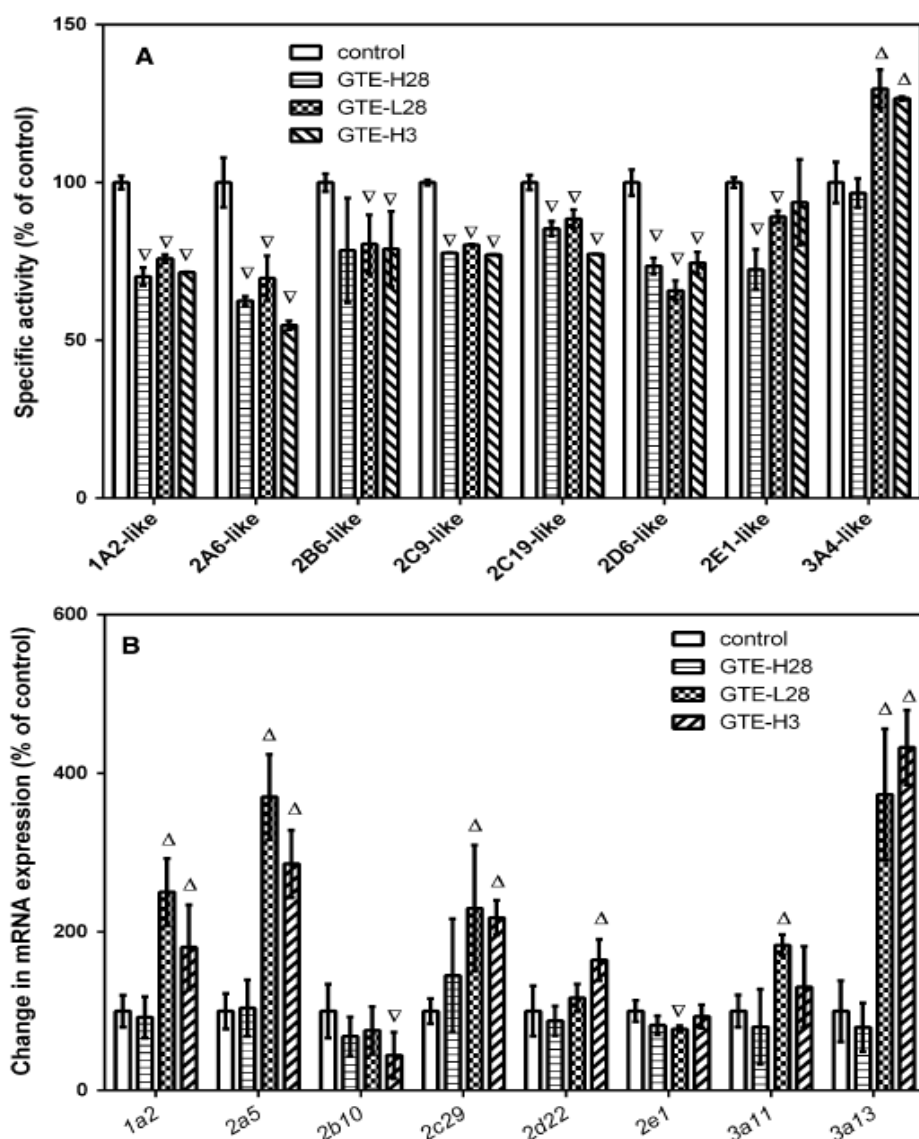
		Control	P-H28	P-L28	P-H3
CYP2A	Activity CYP2A6-like	100	280	148	209
	protein CYP2A6-like	100	128	233	225
	mRNA (<i>Cyp2a5</i>)	100 ± 22	40 ± 4▼	35 ± 6▼	17 ± 1▼
CYP2C	activity CYP2C19-like	100	97	101	177
	protein CYP2C19-like	100	87	39	233
	mRNA <i>Cyp2c29</i>	100 ± 37	88 ± 7	168 ± 33▲	228 ± 21▲
CYP3A	activity CYP3A4-like	100	446	102	19035
	protein CYP3A4-like	100	52	100	209
	mRNA <i>Cyp3a11</i>	100 ± 42	183 ± 33▲	229 ± 45▲	79 ± 10
	mRNA <i>Cyp3a13</i>	100 ± 29	62 ± 16▼	127 ± 30	47 ± 10▼

Significantly ($P \leq 0.05$) increased (▲) or decreased (▼) in comparison to control.

Podobný experiment byl proveden s obézními myšmi, kde jsme testovali vliv Polyphenonu na hladiny insulinu a leptinu a 13 biotransformačních enzymů na úrovni hladin mRNA a aktivit. Testovali jsme aktivitu osmi isoform cytochromů P450, z nichž téměř všechny byly působením Polyphenonu snižované, kromě isoformy CYP3A4, která je zodpovědná za biotransformaci mnoha

léčiv. Expres mRNA cytochromů P450 byly naopak spíše indukované (Obr. 20). Je pravděpodobné, že opačný efekt může být způsoben přítomnými katechiny, které mohou mít indukční vliv na některé transkripční faktory a zvyšovat tak míru transkripce, která ale nemusí vždycky vyústit v translaci (v tomto experimentu však množství proteinů sledováno nebylo). Katechiny ale mohou také způsobovat přímou inhibici enzymů, což by se projevilo na snížení aktivit.

Obecně se věří, že přírodní potravní doplňky jsou bezpečné v jakémkoliv množství. My jsme prokázali, že normální dlouhodobá spotřeba zeleného čaje biotransformační enzymy nijak výrazně neovlivní u zdravých, váhově normálních jedinců. Jinak tomu může být u obézních jedinců, protože obezita může způsobit různé metabolické změny a organismus tak může reagovat odlišně. Jisté je, že nárazové vysoké dávky mohou způsobovat problémy a je zapotřebí i při užívání extraktu ze zeleného čaje věnovat pozornost doporučenému dávkování.



Obrázek 20. Vliv Polyphenonu na specifickou aktivitu (A) a hladiny mRNA (B) vybraných isoform cytochromů P450 v játrech obézních MSG myší. (Převzato z Boušová et al., 2016, Příloha XI).

3.3.2.3 Vliv extraktu z brusinek na biotransformační enzymy u myši

Boušová I., Bártíková H., Matoušková P., Lněničková K., Zappe L., Valentová K., Szotáková B., Martin J., Skálová L. Cranberry extract–enriched diets increase NAD(P)H:quinone oxidoreductase and catalase activities in obese but not in nonobese mice. (2015) Nutrition Research 35, pp. 901-909.*

V této studii jsme standardním a obézním myším podávali extrakt z brusinek. Brusinky jsou velmi často používaným doplňkem pro svoje blahodárné účinky především při problémech s močovým měchýřem. Prospěšné vlastnosti brusinek či extraktu jsou připisovány flavonoidům, především proanthokyanidinům, jejichž obsah je v brusinkách poměrně vysoký a jejich antioxidační vlastnosti jsou dobře prozkoumány. Chtěli jsme porovnat vliv působení brusinkového extraktu po čtyřtýdenním působení na myši standardní a obézní. Podávané množství brusinkového extraktu by u lidí odpovídalo přibližně 50 g sušených brusinek denně.

Sledovali jsme hladiny markerů oxidačního stresu organismu v plasmě a antioxidační enzymy v játrech a tenkém střevě z hlediska aktivity, hladin mRNA i proteinů. Z výsledků vyplynulo, že brusinkový extrakt neměl na antioxidační enzymy u standardních jedinců téměř žádný vliv ani v játrech, ani v tenkém střevě. V játrech obézních myši byla působením brusinkového extraktu zvýšená pouze NQO1 na úrovni enzymové aktivity a mRNA, protein zvýšen nebyl. V tenkém střevě obézních myši byla zvýšená aktivita katalasy, ale ani protein, ani mRNA změněné nebyly. Při porovnávání aktivit mezi hubenými a tlustými myši (kapitola 3.3.1. Příloha VI) jsme zjistili u obézních myši sníženou aktivitu katalasy, podávání brusinkového extraktu tedy toto snížení kompenzovalo. Oxidační status myši (sledováno různými oxidačními markery v plasmě) byl u hubených myši nezměněn, zatímco u tlustých myši podávání brusinkového extraktu snížilo hladiny malondialdehydu v erythrocytech, které byly díky obezitě zvýšené. V ostatních parametrech brusinkový extrakt na oxidační stav ani antioxidační enzymy nijak nepůsobil. Nelze ale vyloučit, že by při zatížení organismu nebo při nějakém onemocnění brusinky nebyly prospěšné, experiment by však na taková zjištění musel být nastaven jinak.

3.3.2.4 Vliv seskviterpenů na biotransformační enzymy u myši

Lněničková K., Svobodová H., Skálová L., Ambrož M., Novák F., Matoušková P., The impact of sesquiterpenes β -caryophyllene oxide and trans-nerolidol on xenobiotic-metabolizing enzymes in mice in vivo. (2017) Xenobiotica pp. 1-9.*

Seskviterpeny β -karyofylenoxid a *trans*-nerolidol se nacházejí v rostlinných silicích a jsou považovány za bioaktivní látky s pozitivním působením na lidský organismus. Avšak jejich potenciální toxicita, případně riziko jejich interakcí s léčivými, jsou přehlíženy nebo studovány velmi okrajově. V naší publikaci jsme se zaměřili na sledování jejich vlivu na biotransformační enzymy z jater a tenkého střeva u myši *in vivo* po jedné akutní dávce po 6 a 24 hodinách. Zjistili jsme zvýšenou aktivitu i hladiny mRNA cytochromů P450 v obou tkáních, v játrech byly také zvýšeny karbonyl-redukující enzymy (konkrétně CBR1 a AKR1C). Naopak snížená byla aktivita NQO1 v tenkém střevě. Konjugační enzymy z druhé fáze biotransformace víceméně ovlivněné nebyly.

3.4 Vysokokapacitní stanovení exprese genů

V této části jsou shrnuty tři publikace, ve kterých jsme stanovovali genovou expresi některou z vysokokapacitních („*high-throughput*“) metod, tedy jiným způsobem než metodou qPCR. Dvě obsahují data z RNA sekvenování a jedna z DNA čipů.

3.4.1 Tvorba feromonové směsi u lišaje tabákového

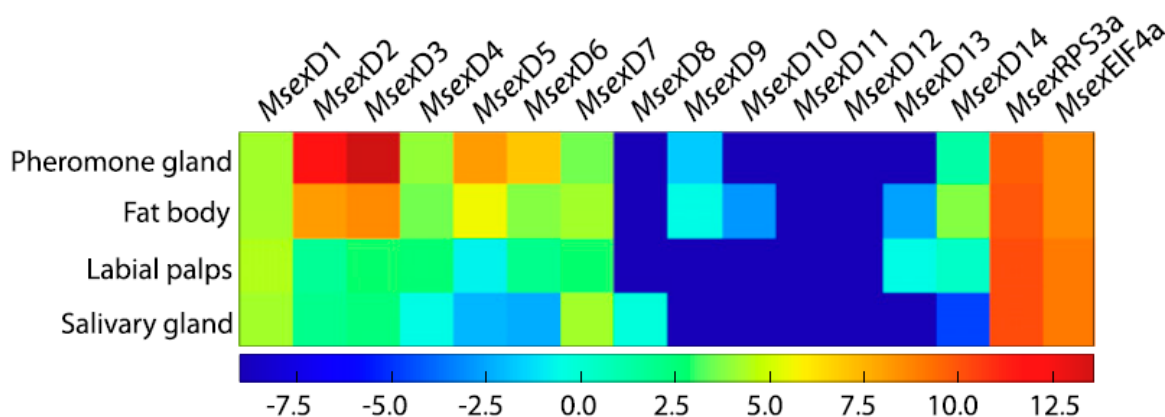
Buček A.¹, **Matoušková P.¹**, Vogel H., Šebest P., Ullrich J., Weissflog J., Svatoš A.*, Pichová I.*, *Evolution of moth sex pheromone composition by a single amino acid substitution in a fatty acid desaturase. (2015) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112(41), pp. 12589-12591.*

-1 autoři přispěli rovnocenným dílem

Tato publikace vychází z výsledků mé disertační práce a na jejím řešení jsem se dále podílela v průběhu půlroční postdoktorské stáže na Max Planck Institutu v Jeně v Německu. Zabývali jsme se desaturasami mastných kyselin z lišaje tabákového (*Manduca sexta*). Tyto enzymy vnáší dvojné vazby do alifatického řetězce mastných kyselin. U motýlů a mūr jsou důležité také při tvorbě sexuálních feromonových směsí. Konkrétně lišaj tabákový má velmi složitou směs feromonů, která obsahuje dlouhé (C16 a C18) alkoholy a aldehydy obsahující jednu nebo dvě až tři konjugované dvojné vazby. Unikátnost této směsi je právě v přítomnosti tří konjugovaných dvojných vazeb v alifatických aldehydech (C16). Relevantní k této habilitační práci je stanovení množství transkriptů jednotlivých desaturas ve čtyřech tkáních – feromonové žláze, tukové tkáni, labiálních palpách (oblast z antén, kde jsou feromonony detekovány) a slinných žlázách larev. Množství transkriptů jednotlivých desaturas bylo stanoveno RNA sekvenováním. Bylo identifikováno 14 transkriptů

desaturasy (jejich relativní množství je v Obr. 21 zobrazené spolu se dvěma referenčními geny na tzv. „heat“ mapě).

Čtyři desaturasy měly ve feromonové žláze zvýšenou hladinu oproti ostatním testovaným tkáním. Všechny čtyři desaturasy (*Msexd2*, *d3*, *d5* a *d6*) se povedlo funkčně otestovat v kvasinkovém heterologním systému. Zjistili jsme, že se všechny podílejí na tvorbě jednotlivých komponent feromonové směsi. Nejzajímavěji sejevily dva evolučně příbuzné enzymy, které se lišily pouze v několika aminokyselinách, ale jejich aktivita byla velmi odlišná. Desaturasa *Msexd2* tvořila pouze monoeny a konjugované dieny, zatímco desaturasa *Msexd3* tvořila konjugované trieny. Sériovou mutační analýzou, kde jsme rozdílné aminokyseliny vzájemně měnili, jsme zjistili, že za tvorbu trienů je zodpovědná jedna aminokyselina (izoleucin v pozici 224) v oblasti čtvrtého transmembránového helixu. Jednoduchá změna (*Ala224Ile*) v sekvenci, způsobující výraznou změnu ve výsledné feromonové směsi, naznačuje možnost skokového vývoje feromonového systému u motýlů při vývoji druhů, protože změna ve směsi feromonů samic musí být reflektována detekčním systémem samců.



Obrázek 21. „Heat“ mapa zobrazující množství transkriptů jednotlivých desaturas (*MsexD1*-*D14*) a dvou referenčních genů (*MsexRPS3a* a *EIF4a*) ve čtyřech tkáních lišaje tabákového. Množství je vyjádřeno jako normalizované hodnoty vůči milionu přečtených bazí (RPKM, *reads per kilobase of transcript per million mapped reads*) (Převzato z Buček et al., 2015, Příloha XIV).

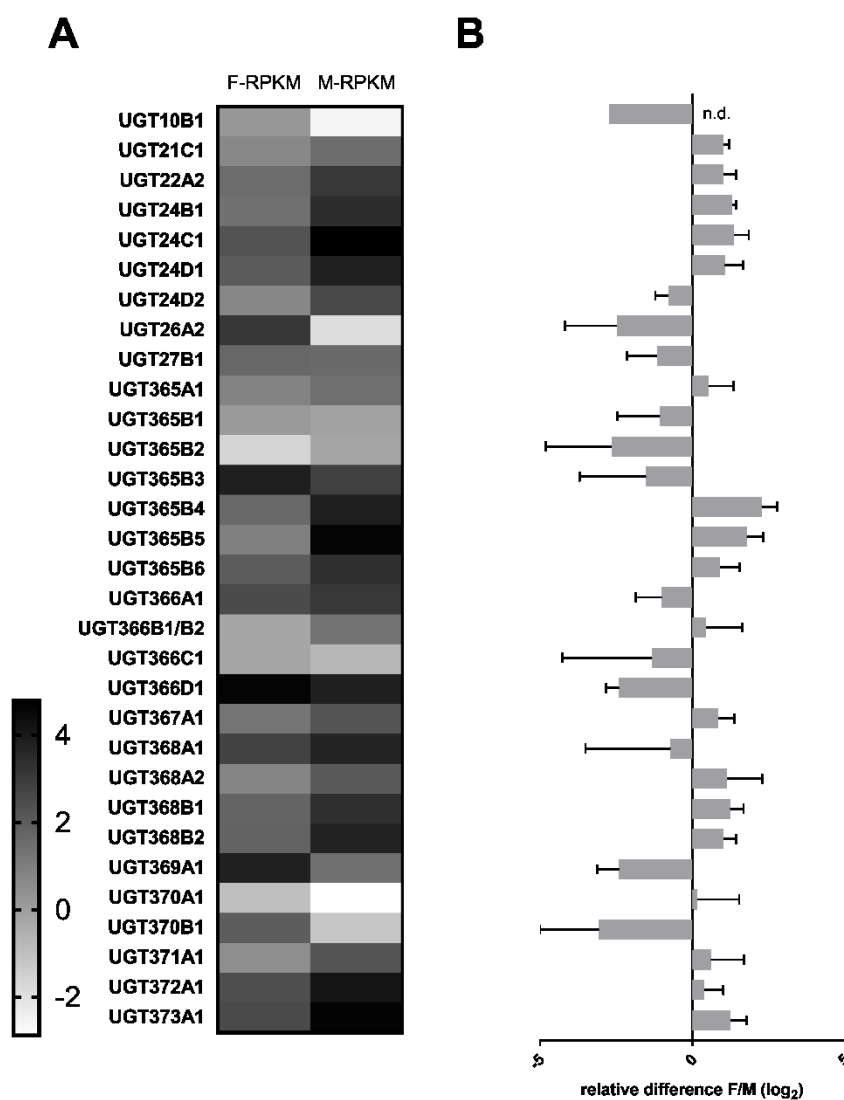
3.4.2 UDP-glykosyltransferasy vlasovky slezové

Matoušková P.*, Lecová L., Laing R., Dimunová D., Vogel H., Raisová Stuchlíková L., Nguyen L.T., Kellarová P., Vokřál I., Lamka J., Szotáková B., Várady M., Skálová L. *UDP-glycosyltransferase family in Haemonchus contortus: phylogenetic analysis, constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences.*

- v recenzním řízení ve stavu „Major revisions“ v časopise *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance.*

Tato publikace se zabývá UDP-glykosyltransferasami (UGT) z vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*). Tyto enzymy jsou hlavním předmětem mého juniorského projektu (GAČR 17-11954Y), kde se zabývám UGT a jejich zapojením do rezistence tohoto parazita. UGT jsou enzymy druhé fáze biotransformace, které katalyzují připojení cukerného zbytku na xenobiotika a usnadňují tak jejich vyloučení. U savců je nejčastějším cukerným zbytkem UDP-glukuronosid (proto UDP-glukuronosyltransferasy). U vlasovky bylo zjištěno, že je připojována UDP-glukosa nebo jiné UDP-monosacharidy (proto se v názvosloví používá UDP-glykosyltransferasy jako nadřazený pojem). V dřívějších experimentech jsme v naší laboratoři detekovali větší množství glykosylovaných metabolitů u rezistentních kmenů vlasovky. Proto jsme vyslovili hypotézu o účasti UGT v rezistenci tohoto parazita, kterou v současné době řešíme.

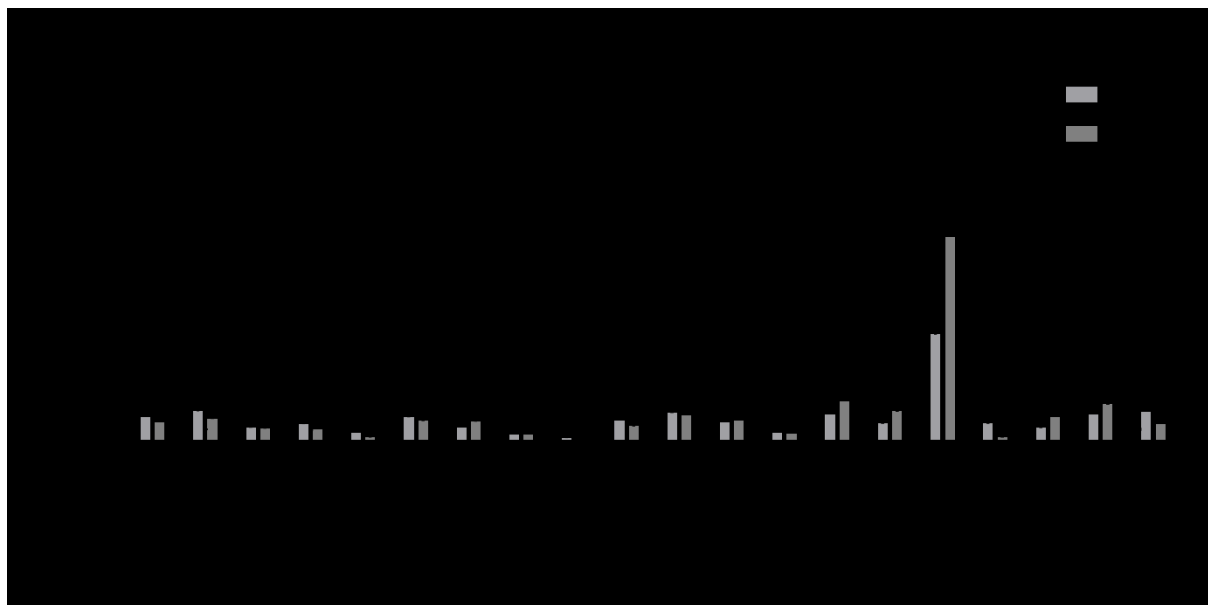
Využili jsme výsledků nedávno sekvenovaného genomu (z roku 2013) a především nově resekvenované verze (ftp://ngs.sanger.ac.uk/production/pathogens/Haemonchus_contortus), kde již jsou sekvence spojené do jednotlivých chromosomů. V genomu bylo nalezeno 32 potenciálních genů, jejichž přeložená sekvence obsahuje aminokyseliny organizované do domén typických pro UGT. Množství transkriptů všech genů jsme stanovili pomocí RNA sekvenování, kde jsme porovnávali množství jednotlivých transkriptů mezi pohlavími dospělců, což jsme ověřili qPCR experimentem (Obr. 22). Obecně jsme pozorovali velmi dobrou shodu mezi oběma typy stanovení.



Obrázek 22. Porovnání konstitutivní exprese UGT mezi samci a samicemi dospělců vlasovky slezové. A) výsledky RNA sekvenování - množství transkriptů vyjádřené jako relativní množství detekovaných sekvencí (log₂ RPKM), B) výsledky qPCR - relativní exprese UGT mRNA (vyjádřeno jako relativní log₂ změna mezi množstvím transkriptů nalezených u samců vůči samicím). (Převzato z Matoušková et al., odesláno, Příloha XV).

Dále jsme zjišťovali konstitutivní expresi jednotlivých transkriptů pomocí qPCR porovnáním mezi třemi kmeny vlasovky s různou rezistencí vůči anthelmintikům; v citlivém ISE kmeni a dvou rezistentních kmenech, v IRE - inbredním kmenu vyvinutém selekčním tlakem thiabendazolu, a WR - geneticky odlišným multirezistentním kmenu izolovaném v Austrálii. Stanovovali jsme pouze geny s vyšší hladinou identifikované v předchozím experimentu. Nalezli jsme několik změn v expresích mezi jednotlivými kmeny. Nejvíce zvýšená byla UGT368B2 u obou rezistentních kmenů obou pohlaví

(Obr. 23). Touto UGT se budeme do budoucna dále zabývat, abychom zjistili, zda může být zodpovědná za tvorbu většího množství glykosylovaných metabolitů u rezistentních jedinců.



Obrázek 23. qPCR stanovení UGT transkriptů u samic vlasovky v různých kmenech. (Převzato z Matoušková et al., odesláno, Příloha XV).

3.4.3 Vliv fenbendazolu na transkriptom a proteom huseníčku rolního.

Syslová E., Landa P., Raisová Stuchlíková L., **Matoušková P.**, Skálová L., Szotáková B., Navrátilová M., Vaněk T., Podlipná R.*, *Effect of anthelmintic drug fenbendazole on Arabidopsis thaliana transcriptome and proteome.*

- odesláno k recenznímu řízení do *Plant Journal*.

Vliv anthelmintik v prostředí je málo prostudovaná kapitola v rámci ekotoxikologie i přesto, že se ročně použijí tuny veterinárních léčiv. Jejich zbytky se mohou nacházet v prostředí jako parentní látky, případně jako metabolity, které se do prostředí dostanou spolu s exkrementy zvířat. Mohou mít vliv nejen na půdní a vodní organismy v prostředí, v nichž se tyto kontaminanty nacházejí, ale také na přítomné rostliny.

Kromě vlastního metabolismu fenbendazolu (FBZ) jsme v této publikaci sledovali vliv tohoto anthelmintika na proteom a transkriptom modelové rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Množství RNA transkriptů bylo stanoveno pomocí „*microarray*“ čipů (Agilent

technologies). Analyzovali jsme vzorky z kořenů a listů rostlin vystavených FBZ po dobu 24 a 72 hodin. Obecně jsme našli více změn v kořenech vystavených kratšímu působení FBZ. Mezi zvýšenými transkripty bylo například šest genů kódujících cytochromy P450, v listech byl zvýšen pouze jeden. Tyto výsledky naznačují, že oxidace či hydroxylace FBZ se odehrává především v kořenech, čemuž odpovídá i vyšší množství nalezených metabolitů v kořenech. Naopak v listech byly zvýšené čtyři, respektive osm glykosyltransferas po 24 a 72 hodinách, čemuž opět odpovídá vyšší množství glykosidů v nadzemních částech rostliny. Další identifikované změněné transkripty byly mezi geny kódující proteiny stresové odpovědi rostlin, naopak snižené byly některé geny účastníci se fotosyntézy a syntézy jasmonové kyseliny, regulátoru stresové odpovědi rostlin. K validaci získaných změn jsme použili qPCR analýzu vybraných snížených a zvýšených genů. Výsledky obou metod byly velmi dobře porovnatelné (Tab. 4).

Tabulka 4. Validace výsledků získaných čipem pomocí qPCR. (Převzato ze Syslová et al., odesláno. Příloha XVI)

Gene name	Annotation	Microarray fold change (log ₂)	qPCR fold change (log ₂)
PER20	Peroxidase 20	1.89	1.93
ABC	ABC transporter I family member 21	1.83	2.65
CYP86A1	cytochrome P450 86A1	1.70	1.01
TAC1	TAC1-mediated telomerase activation pathway protein BT2	-2.30	-2.22
bZIP1	basic leucine-zipper 1	-2.09	-0.71
SaMT	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	-1.28	-0.91

3.5 Stanovení genové exprese v jiných projektech

Tato část stručně shrnuje výsledky tří publikací z různých tematicky jinak nesouvisejících projektů, na jejichž řešení jsem se většinou podílela stanovením genové exprese, návrhem primerů pro tato stanovení, výběrem referenčních genů a analýzou dat.

*Stuchlíková L., **Matoušková P.**, Bártíková H., Vokřál I., Lamka J., Štolcová T., Pětníková H., Szotáková B., Kubíček V., Skálová L. *, Monepantel induces hepatic cytochromes p450 in sheep in vitro and in vivo. (2015) *Chemico-Biological Interactions* 227, pp. 63-68.*

Monepantel (MOP) je širokospektré anthelmintikum uvedené v r. 2010 na trh jako Zolvix® (Novartis) pro léčbu gastrointestinálních hlístic u ovcí. Jedná se o aminoacetonitrilový derivát interagující se specifickou podjednotkou nikotin-acetylcholinového receptoru pro hlístice Hco-MPTL-1, který není přítomen u savců, a tudíž neovlivňuje hostitelský organismus. Navázání MOP na tento receptor způsobí otevření iontových kanálů a znemožnění jejich opětovnému uzavření, to způsobí depolarizaci svalových buněk, čímž dojde k paralýze a následné smrti parazita. Vzhledem k tomu, že i proti tomuto anthelmintiku hlístice (konkrétně například vlasovka slezová) získaly poměrně rychle odolnost, přistupuje se k podávání směsí anthelmintik. Benzimidazolová anthelmintika indukují několik isoform cytochromů P450, rozhodli jsme se tedy zjistit, zda u ovcí také toto léčivo nebude indukovat vybrané cytochromy P450, aby se případně předcházelo možnému vzniku lékových interakcí.

V této publikaci jsme sledovali vliv MOP na hladiny mRNA různých CYP isoform a aktivity odpovídající ovčím jaterním cytochromům pomocí typických substrátů (ethoxyresorufin, methoxyresorufin, midazolam apod.). Zjistili jsme, že všechny substráty CYP byly po podání MOP aktivněji metabolizovány. Z hladin mRNA byla zvýšená pouze jedna isoforma a to CYP3A24. Vzhledem k tomu, že se jedná o isoformu z rodiny CYP3A, která patří mezi hlavní biotransformační enzymy, hrozí riziko lékových interakcí při podávání monepantelu společně s jinými anthelmintiky.

Krbal L., Hanušová V, Soukup J., John S., **Matoušková P.**, Ryška A., Contribution of in vitro comparison of colorectal carcinoma cells from primary and metastatic lesions to elucidation of mechanisms of tumor progression and response to anticancer therapy. (2016) *Tumor Biology* 37, pp. 9565-9578.*

*Skarková V. *, Králová V., Krbal L., **Matoušková P.**, Soukup J., Rudolf E., Oxaliplatin and irinotecan induce heterogenous changes in the EMT markers of metastasizing colorectal carcinoma cells. (2018) *Experimental Cell Research* 369, pp. 295-303.*

Tyto dvě publikace vznikly ve spolupráci s Ústavem lékařské biologie a genetiky Lékařské fakulty UK v Hradci Králové. Pracovníci tohoto ústavu se zabývají studiem kolorektálního karcinomu a epiteliálně-mesenchymální tranzicí (EMT) v rámci projektu GAČR (17-10331S).

V první publikaci jsme se zabývali mechanismy nádorové progresy u čtyř párových buněčných linií odvozených z primárního karcinomu střeva a jeho metastáz do lymfatických uzlin získaných od stejných pacientů. Výsledky jsme porovnali s korespondujícími imortalizovanými nádorovými buněčnými liniemi SW480 a SW620. Testovali jsme jednak schopnost těchto buněk migrovat a dále expresi vybraných markerů zapojených do adhezivity a invazivity nádoru na úrovni mRNA i proteinů. Sledovali jsme také expresi několika mikroRNA, které mají dle literatury souvislost s těmito procesy. Podle očekávání jsme zjistili, že linie odvozené z lymfatických uzlin migrují agresivněji a zároveň mají vyšší expresi adhezních molekul, jako je mezibuněčná adhezní molekula 1 (ICAM-1), adhezní molekula epiteliálních buněk (EpCAM) nebo N-kadherin. Buňky odvozené z primárních karcinomů měly naopak vyšší hladiny metaloproteinů (MMP) 2 a 9 a vyšší expresi miR-21, miR-29a a miR-200a. Na jedné kolorektální a jedné metastatické primární kultuře byl navíc sledován vliv vybraných chemoterapeutik a monoklonálních protilátek s cílem otestovat základní citlivost a vybrat nejvhodnější léčivo. V těchto prvotních experimentech bylo zjištěno, že irinotekan a oxaliplatin mají největší potenciál v léčbě tohoto konkrétního pacienta.

Z výsledků první publikace jsme vycházeli v další publikaci, kde jsme se zabývali právě těmito dvěma léčivy a jejich schopností indukovat markery EMT. EMT je popisována jako klíčový proces při maligním bujení, vyšší agresivitě, invazivitě a schopnosti nádorů metastazovat. V šesti primárních buněčných kulturách od tří pacientů s diagnostikovaným metastatickým kolorektálním karcinomem jsme testovali hladiny exprese E- a N-kadherinů, MMP2 a 9, vimentinu a tří mikroRNA (miR-21, miR-29a a miR-200a). Pro porovnání jsme opět použili korespondující imortalizované nádorové buněčné linie SW480 a SW620. Zajímavé výsledky jsme získali zejména z hlediska korelací mezi jednotlivými parametry, nikoliv však plošně mezi stejnými typy vzorků. Například miR-29a byla zvýšená u třech metastatických linií (včetně SW620) a naopak u jedné byla výrazně snížena, MMP9 mRNA, popsána jako cílový gen miR-29a, byla naopak u této jedné linie výrazně snížena, zatímco u ostatních byla zvýšená. Na základě stanovených hodnot střední inhibiční koncentrace IC_{50} se působení oxaliplatinu a irinotekanu lišilo mezi všemi liniemi poměrně výrazně. Pouze u jednoho pacienta byla buněčná kultura odvozená od primárního karcinomu rezistentnější vůči působení obou léčiv než buněčná kultura metastatická. Také vlivy na jednotlivé markery byly poměrně variabilní. Variabilita může mít mnoho příčin, důvodem může být různý stupeň diferenciacie tumorů, ze kterých byly primární kultury odvozeny, obecná heterogenita připravených primárních kultur, dynamika EMT nebo interindividuální rozmanitost jednotlivých pacientů. Výsledky této studie však částečně přispěly k porozumění nádorové progresy a úlohy chemoterapeutik v procesu EMT.

3.6 Seznam dalších publikací

Zde pouze krátce komentuji zajímavé publikace, na jejichž řešení jsem se v průběhu své dosavadní vědecké kariéry také podílela, ale neobsahují žádné stanovení genové exprese. Jedná se o čtyři přehledové články a čtyři původní publikace.

Matoušková P.*, Hanousková B., Skálová L. *MicroRNAs as potential regulators of glutathione peroxidases expression and their role in obesity and related pathologies. (2018) International Journal of Molecular Sciences 19(4), 1199.*

V této publikaci jsme provedli bioinformatickou analýzu, abychom identifikovali mikroRNA, které by mohly regulovat všechny isoformy lidských glutathionperoxidas (GPX). Prohledáním dostupné literatury o těchto identifikovaných mikroRNA jsme hledali souvislosti mezi GPXs, mikroRNA a některými nemocemi souvisejícími s obezitou a oxidačním stresem.

Matoušková P., Vokřál I., Lamka L., Skálová L.* *The Role of Xenobiotic-metabolizing enzymes in anthelmintic deactivation and resistance in helminths. (2016) Trends in Parasitology 32(6), pp. 481-491.*

Tato přehledová práce shrnuje dostupné informace o biotransformačních enzymech u helmintů. Postupně se ukazuje, že by tyto enzymy mohly hrát nějakou roli v rezistenci. Například u skupiny benzimidazolových anthelmintik je dobře popsán mechanismus rezistence, kdy dochází k mutaci cílové molekuly - tubulinu. Ale ukazuje se, že například UDP-glykosyltransferasy se na rezistenci také podílejí.

Boušová I., Skálová L., Souček P., **Matoušková P.***, *The modulation of carbonyl reductase 1 by polyphenols. (2015) Drug Metabolism Reviews 47(4), pp. 520-533.*

V této přehledové práci jsme shrnuli dostupné informace o regulačních mechanismech karbonylreduktasy 1 (CBR1), biotransformačním enzymu, který se spolupodílí na kardiotoxicitě anthracyklinů. Zaměřili jsme se na možné působení přírodních látek, především polyfenolů, v regulaci CBR1. Polyfenoly způsobují hlavně přímou inhibici aktivity CBR1 a zároveň nepřímou aktivaci působením na různé transkripční faktory.

Hanušová v., Skálová L., Králová V., **Matoušková P.***, *Potential anti-cancer drugs commonly used for other indications. (2015) Current Cancer Drug Target 15(1), pp. 35-52.*

Zavedení nového léku do praxe včetně provedení všech klinických studií je velmi zdlouhavé. Možnost přesunout známé a schválené léky do jiné indikační skupiny by mohlo výrazně zrychlit celý proces. V této přehledové práci jsme se zaměřili na několik lékových skupin (mimo chemoterapeutika) a dostupné informace o jejich protirakovinném působení. Například u flubendazolu (zástupce benzimidazolových anthelmintik) se ukázalo, že tlumí proliferaci buněk zastavením buněčného cyklu. Objevení jeho protirakovinných účinků bylo zcela náhodné. Po přeléčení myši nakažených helminty flubendazolem byly tyto myši použity pro experimenty, kde jim byly injikovány nádorové buňky a poté se měřila velikost vznikajícího nádoru. Ukázalo se, že nádory u flubendazolem přeléčených myší jsou významně menší.

Sambles C., Middelhaufe S., Soanes D., Kolak D., Lux T., Moore K., **Matoušková P.**, Parker D., Lee R., Love J., Aves S.J. *Genome sequence of the oleaginous yeast Rhodotorula toruloides strain CGMCC 2.1609. (2017) Genomics Data 13, pp. 1-2.*

Tato publikace začala vznikat v průběhu mé postdoktorské stáže na univerzitě v Exeteru, ve Velké Británii, kde jsem se zabývala různými mikroorganismy, které mají schopnost tvořit oleje. Jedním z nich byla kvasinka *Rhodotorula toruloides*, u které jsme sekvenovali genom. Můj podíl zahrnoval především stanovení velikosti genomu a přípravu sekvenační knihovny.

Raisová Stuchlíková L., **Matoušková P.**, Vokřál I., Lamka J., Szotáková B., Sečkařová A., Dimunová D., Vogel H., Nguyen L.T., Várady M., Skálová L.* *Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in Haemonchus contortus adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. (2018) International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 8(1), pp. 50-58.*

Tato publikace vznikla v rámci mého juniorského projektu GAČR, který se zabývá UDP-glykosyltransferasami. U dvou kmenů vlasovky slezové s odlišnou citlivostí vůči anthelmintikům jsme stanovovali metabolismus benzimidazolových anthelmintik a zaměřili jsme se

především na glykosylované metabolity. Zjistili jsme významné rozdíly jak mezi pohlavími, tak mezi oběma kmeny.

Matoušková P., Svatoš A., Pichová I. *, *Functional characterization of a desaturase from the tobacco hornworm moth (Manduca sexta) with bifunctional Z11- and 10,12-desaturase activity. (2007) Insect Biochemistry and Molecular Biology 37(6), pp. 601-610.*

Matoušková P., Luxová a., Matoušková J., Jiroš P., Svatoš A., Valterová I., Pichová I. *, *A Delta(9) desaturase from Bombus lucorum males: Investigation of the biosynthetic pathway of marking pheromones. (2008) CHEMBIOCHEM 9(15), pp. 2534-2541.*

Tyto dvě publikace vznikly v rámci mé disertační práce. Obě se zabývají desaturasami. To jsou enzymy, které vnášejí dvojnou vazbu do alifatického řetězce dlouhých mastných kyselin za vzniku nenasycených mastných kyselin, případně vícenenasycených mastných kyselin. Tyto enzymy jsem studovala u více živočišných druhů, především u lišaje tabákového (*Manduca sexta*), který jak bylo zmíněno výše má velice komplikovanou směs sexuálních feromonů, na jejichž tvorbě se právě desaturasy podílejí. Druhá publikace je na podobné téma, tentokrát ale byly desaturasy zkoumány u čmeláka hájového (*Bombus lucorum*). V obou případech se povedlo postupně izolovat celý gen, což byl v nepřítomnosti genomu celkem zdlouhavý proces, a obě desaturasy se také povedlo funkčně otestovat v kvasinkovém (*S. cerevisiae*) heterologním systému.

4 Souhrn

Během své dosavadní vědecké kariéry jsem se zapojila do různých projektů, které většinou zahrnovaly také stanovení genové exprese v různých experimentálních modelech. Můj zájem se týká především správného postupu při takovém stanovení, s hlubším náhledem na jednotlivé kroky provedení. Při zavedení nového modelu, v němž chceme sledovat vlivy různých látek na genovou expresi, je nutné vytipovat vhodné referenční geny a ověřit stabilitu jejich exprese při konkrétním experimentu. Tyto kroky umožní standardizaci postupů při kvantitativním stanovení genové exprese.

Takto jsme zavedli qPCR stanovení pro model MSG-navozené obezity u myši, na kterém jsme vyzkoušeli podávání různých přírodních doplňků a jejich vliv na aktivitu a expresi biotransformačních a antioxidantních enzymů. Standardizovali jsme také použití referenčních genů u vlasovky slezové po působení různých anthelmintik a ověřili referenční geny u huseníčku rolního po zalévání roztokem flubendazolu. V současnosti pracujeme na podobném projektu, kde zhodnotíme referenční geny u ultratenkých lidských jaterních řezů jak pro stanovení mRNA, tak pro stanovení mikroRNA.

I díky zavedení kvalitního stanovení genové exprese jsme získali celou řadu výsledků, které byly publikovány v impaktovaných časopisech a prezentovány na odborných konferencích. Svůj význam má i předávání zkušeností mladým vědeckým pracovníkům. Tuto metodiku si již osvojila řada pregraduálních i postgraduálních studentů.

Můj výzkum byl a je finančně podporován Grantovou agenturou České republiky (17-11954Y, P303/12/G163, 18-07724S, 15-05325S) a Univerzitou Karlovou (PRIMUS/17/SCI/4).

Další výzkum chci zaměřit především na působení anthelmintik v prostředí a na mechanismy rezistence vlasovky slezové a zapojení mikroRNA do regulace enzymů účastnících se vzniku této rezistence, jak naznačuje náplň aktuálně řešených grantů na katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty UK a recentní publikace.

5 Přílohy

1.

Lněničková K., Skálová L., Raisová Stuchlíková L., Szotáková B., Matoušková P*.
Induction of xenobiotic-metabolizing enzymes in hepatocytes by beta-naphthoflavone: Time-dependent changes in activities, protein and mRNA levels.
(2018) Acta Pharmaceutica 68(1), pp. 75-85.

II.

Hornáková D.¹, Matoušková P.¹, Kindl J., Valterová I., Pichová I. Selection of reference genes for real-time polymerase chain reaction analysis in tissues from *Bombus terrestris* and *Bombus lucorum* of different ages. (2010) *Analytical Biochemistry* 397(1), pp. 118-120.



Matoušková P.*, Bártíková H., Boušová I., Hanušová V., Szotáková B., Skálová L.,
Reference genes for real-time PCR quantification of messenger RNAs and microRNAs
in mouse model of obesity. (2014) PLOS ONE 9(1), e86033.

.

IV.

Lecová L., Růžičková M., Laing R., Vogel H., Szotáková B., Prchal L., Lamka J., Vokřál I., Skálová L., Matoušková P.*, Reliable reference gene selection for quantitative real time PCR in *Haemonchus contortus*. (2015) *Molecular and Biochemical Parasitology* 201, pp. 123-127 .

.

V.

Matoušková P.*, MicroRNAs and reference gene methodology. (2017) Handbook of Nutrition, Diet, and Epigenetics, Springer int. P. pp. 1-17.

VI.

Lněničková K., Procházková E., Skálová L., Matoušková P., Bártíková H., Souček P., Szotáková B.*, Catechins variously affect activities of conjugation enzymes in proliferating and differentiated Caco-2 cells. (2016) *Molecules* 21, 1186.

VII.

Zárybnický T., Matoušková P., Lancošová B., Šubrt Z., Skálová L., Boušová I.*, Inter-individual variability in acute toxicity of R-pulegone and R-menthofuran in human liver slices and their influence on miRNA expression changes in comparison to acetaminophen. (2018) International Journal of Molecular Sciences 19(6), 1805.

VIII.

Matoušková P.*, Bártíková H., Boušová I., Levorová L., Szotáková B., Skálová L. Drug-metabolizing and antioxidant enzymes in monosodium L-glutamate obese mice. (2015) Drug Metabolism and Disposition 43, pp. 258-265.

IX.

Boušová I.,* Košťáková Š., Matoušková P., Bártíková H., Szotáková B., Skálová L.
Monosodium glutamate-induced obesity changed the expression and activity of
glutathione S-transferases in mouse heart and kidney. (2017) *Pharmazie* 72, pp. 257-
259.

X.

Matoušková P., Bártíková H., Boušová I., Szotáková B., Martin J., Skorkovská J., Hanušová V., Tománková V., Anzenbacherová E., Lišková B., Anzenbacher P., Skálová L.* Effect of defined green tea extract in various dosage schemes on drug-metabolizing enzymes in mice in vivo. (2014) *Journal of Functional Foods* 10, pp. 327-335.

XI.

Boušová I.,* Matoušková P., Bártíková H., Szotáková B., Hanušová V., Tománková V., Anzenbacherová E., Lišková B., Anzenbacher P., Skálová L. Influence of diet supplementation with green tea extract on drug-metabolizing enzymes in a mouse model of monosodium glutamate-induced obesity. (2016) *European Journal of Nutrition* 55, pp. 361-371.

XII.

Boušová I.*, Bártíková H., Matoušková P., Lněničková K., Zappe L., Valentová K., Szotáková B., Martin J., Skálová L. Cranberry extract–enriched diets increase NAD(P)H:quinone oxidoreductase and catalase activities in obese but not in nonobese mice. (2015) Nutrition Research 35, pp. 901-909.

XIII.

Lněničková K., Svobodová H., Skálová L., Ambrož M., Novák F., Matoušková P.*, The impact of sesquiterpenes β -caryophyllene oxide and trans-nerolidol on xenobiotic-metabolizing enzymes in mice in vivo. (2017) *Xenobiotica* p. 1-9.

XIV.

Buček A.¹, Matoušková P.¹, Vogel H., Šebest P., Ullrich J., Weissflog J., Svatoš A.*,
Pichová I.*, Evolution of moth sex pheromone composition by a single amino acid
substitution in a fatty acid desaturase. (2015) Proceedings of the National Academy
of Sciences of the United States of America 112(41), pp. 12589-12591.

XV.

Matoušková P.* , Lecová L., Laing R., Dimunová D., Vogel H., Raisová Stuchlíková L., Nguyen L.T., Kellerová P., Vokřál I., Lamka J., Szotáková B., Várady M., Skálová L. UDP-glycosyltransferase family in *Haemonchus contortus*: phylogenetic analysis, constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences.

(2018)-odesláno do International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance

XVI.

Syslová E., Landa P., Raisová Stuchlíková L., Matoušková P., Skálová L., Szotáková B., Navrátilová M., Vaněk T., Podlipná R.*, Effect of anthelmintic drug fenbendazole on *Arabidopsis thaliana* transcriptome and proteome.

(2018)-odesláno do The Plant Journal

XVII.

Stuchlíková L., Matoušková P., Bártíková H., Vokřál I., Lamka J., Štolcová T., Pětníková H., Szotáková B., Kubíček V., Skálová L.*, Monepantel induces hepatic cytochromes p450 in sheep in vitro and in vivo. (2015) *Chemico-Biological Interactions* 227, pp. 63-68.

XVIII.

Krbal L., Hanušová V*, Soukup J., John S., Matoušková P., Ryška A., Contribution of in vitro comparison of colorectal carcinoma cells from primary and metastatic lesions to elucidation of mechanisms of tumor progression and response to anticancer therapy. (2016) *Tumor Biology* 37, pp. 9565-9578.

XIX.

Skarková V.*, Králová V., Krbal L., Matoušková P., Soukup J., Rudolf E., Oxaliplatin and irinotecan induce heterogenous changes in the EMT markers of metastasizing colorectal carcinoma cells. (2018) *Experimental Cell Research* 369, pp. 295-303.