

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

Klonování a příprava plasmidu pro expresi vybrané reductasy z vlasovky slezové

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Bc. Nikola Rychlá

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 2021

Bc. Nikola Rychlá

Tímto bych chtěla poděkovat doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za čas, trpělivost, a především podnětné rady a zkušenosti při psaní i realizování diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Dianě Dimunové za cenné rady a pomoc při experimentální práci a katedře biochemických věd, pod vedením prof. Ing. Vladimíra Wsóla, Ph.D., za možnost diplomovou práci uskutečnit.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Nikola Rychlá

Školitel: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Název diplomové práce: **Klonování a příprava plasmidu pro expresi vybrané reduktasy z vlasovky slezové**

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je patogenní, gastrointestinální, krev sající hlístice. Léková rezistence u *H. contortus* a s tím spojené haemonchózy malých přežvýkavců, jako jsou ovce a kozy, představují stále velký problém a jejich dopad jak biologický, tak ekonomický je rozsáhlý. Vzhledem k faktu, že anthelmintika stále patří ke zlatému standardu léčby, je jejich výzkum podstatný, a to nejen pro hospodářská zvířata, ale i člověka.

Právě karbonyl-redukující enzymy, jako jsou aldoketoreduktasy a dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem, patří mezi jedny z enzymů 1. biotransformační fáze xenobiotik, a podílí se tak na metabolismu léčiv a jejich zvýšené eliminaci. Zvýšená eliminace vede k snížení toxicity u *H. contortus* a snižuje účinnost léčiva u přežvýkavců. Studium nejen těchto enzymů tedy může významně napomoci v řešení lékové rezistence u *H. contortus* a přispět k vývoji nových farmak.

Cílem této diplomové práce je zpracování literární rešerše na dané téma týkající se vlasovky slezové, problematiky haemonchóz, anthelmintik a především karbonyl-redukujících enzymů. Experimentální část zahrnuje přípravu plasmidu nesoucí gen reduktasy, vybrané na základě kvantitativní analýzy genové exprese u tří kmenů *H. contortus* (ISE, IRE, WR). Plasmid s inzertovaným genem zájmu bude možné využít pro další studium funkce příslušného enzymu a jeho zapojení do lékové rezistence u *H. contortus*.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Nikola Rychla

Supervisor: Doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Title of diploma thesis: **Plasmid constuction for expression of selected reductase from *Haemonchus contortus***

Barber's pole worm (*Haemonchus contortus*) is a pathogenic, gastrointestinal, blood-sucking nematode. Drug resistance in *H. contortus*, and the associated haemonchosis of small ruminants such as sheep and goats, remain a major problem, and their biological and economic impacts are extensive. Given the fact that anthelmintics are still the gold standard of treatment, their reaserch is crucial, not only for farm animals but also for people.

Carbonyl-reducing enzymes, such as aldo-ketoreductases and short-chain dehydrogenases/reductases, belong to the enzymes of the first phase of xenobiotics biotransformation and thus participate in drug metabolism and their increased elimination. Increased elimination leads to decreased toxicity in *H. contortus* and reduced efficacy of drugs in ruminants. Research of these enzymes can help tackle with drug resistance in *H. contortus* and contribute to the development of new drugs in the future.

The aim of this diploma thesis is based on the construction of plasmid, which will be used for gene expression of selected reductase from *Haemonchus contortus*. The reductase was selected based on quantitative analysis of gene expression in three strains of *H. contortus* (ISE, IRE, WR). Plasmid with gene of interest is going to be used to further study the function of the respective enzyme and its involvement in drug resistance in *H. contortus*.

Obsah

1	Úvod	1
2	Teoretická část	2
2.1	<i>Haemonchus contortus</i>	2
2.1.1	Haemonchóza.....	3
2.1.1	Anthelmintika a léková rezistence u <i>Haemonchus contortus</i>	3
2.1.2	Terapie a prevence hemonchóz.....	6
2.2	Biotransformace xenobiotik.....	7
2.3	Karbonyl-redukující enzymy.....	8
2.3.1	Nadrodina aldo-ketoreduktas (AKR).....	8
2.3.2	Nadrodina dehydrogenas/reduktas s krátkými řetězci (SDR).....	14
3	Cíl práce	19
4	Experimentální část	20
4.1	Použitý biologický materiál, chemikálie a vybavení.....	20
4.1.1	Biologický materiál.....	20
4.1.2	Chemikálie, reagentie, kity.....	20
4.1.3	Technické vybavení.....	21
4.2	Metodika.....	22
4.2.1	Kvantifikace a výběr vhodných genů AKR a SDR ke klonování.....	22
4.2.2	Klonování.....	27
4.2.3	Příprava kolonií nesoucí transformovaný plasmid.....	33
4.2.4	Heterologní exprese plasmidu nesoucí gen zájmu.....	35
4.2.5	Statistika.....	42
5	Výsledky	43
5.1	Izolace RNA.....	43
5.2	Výsledky a analýza genové exprese.....	44
5.2.1	Stanovení a výpočet účinnosti primerů.....	44

5.2.2	Zpracování a vyhodnocení dat genové exprese	45
5.3	Klonování.....	47
5.3.1	Výsledky přípravného klonování.....	47
5.3.2	Výsledky heterologní exprese.....	53
6	Diskuse	55
7	Závěr	58
8	Seznam použitých zkratk	59
9	Seznam použité literatury	60
10	Seznam použitých obrázků	65
11	Seznam použitých tabulek	67
12	Přílohy	68
12.1	Příloha 1 - Sekvence použitých primerů v rámci klonování.....	68
12.2	Příloha 2 – Sekvence CDS – <i>SDR5</i>	69

1 Úvod

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*, nematoda) patří mezi patogenní, gastrointestinální hlístice parazitující především na malých přežvýkavcích, jako jsou ovce a kozy. Onemocnění (Haemonchóza) u malých přežvýkavců se stává čím dál větším problémem, a to nejen biologickým, ale i ekonomickým, a to především díky rozsáhlé lékové rezistenci na všechna anthelmintika. Studium lékové rezistence je stěžejním bodem pro řešení tohoto problému, neboť anthelmintika patří stále k léku volby úspěšné terapie. Mechanismus rezistence na různá léčiva u *H. contortus* je založen na mnoho příčinách od molekulárně genetických změn, až po kinetiku samotného léčiva (1; 2).

Mezi dostupná a široce studovaná anthelmintika patří benzimidazoly (albendazol, mebendazol, flubendazol). Právě karbonyl-redukující enzymy, jako jsou aldoketoreduktasy (AKR) a dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR), se jakožto enzymy 1. biotransformační fáze xenobiotik významně účastní na metabolismu flubendazolu (FLU). Tím urychlují jeho eliminaci a snižují toxicitu u hlístic. Současné studie potvrzují významné rozdíly v aktivitě a expresi genů karbonyl-redukujících enzymů u rezistentních kmenů vlasovky slezové k benzimidazolovým preparátům v porovnání s citlivými kmeny. Genom *H. contortus* obsahuje více než 90 různých karbonyl-redukujících enzymů, to poskytuje prostor pro vývoj nových farmak a získání dalších poznatků v této oblasti (1).

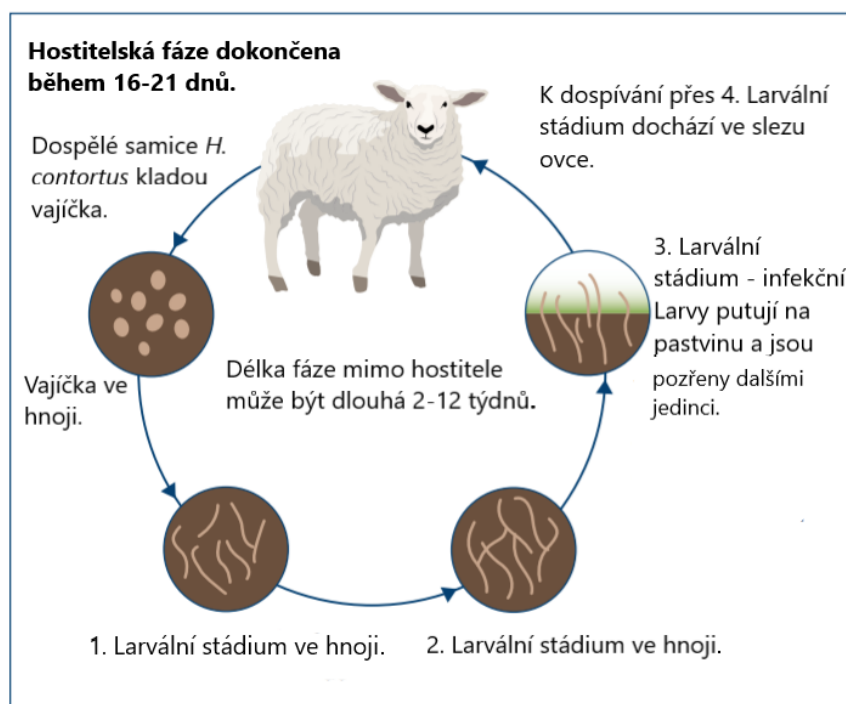
Teoretická část práce je zaměřena na základní pojmy týkající se vlasovky slezové, rezistence na anthelmintika a karbonyl-redukujících enzymů, patřící do skupiny enzymů 1. biotransformační fáze, významně podílející se na eliminaci léčiv u *H. contortus*. Experimentální část práce byla založena na využití molekulárně-biologických metod, vedoucí k přípravě plasmidu pro expresi vybrané reduktasy. Pomocí kvantitativní analýzy genové exprese byly sledovány vybrané geny u citlivého (ISE) a dvou rezistentních kmenů vlasovky slezové (IRE, WR). Pro další práci byla vybrána reduktasa se zvýšenou mírou exprese poukazující na zvýšenou eliminaci léčiva u rezistentního kmene vlasovky slezové (IRE). Gen zájmu byl získán pomocí izolace RNA z dospělých jedinců hlístic, převeden na cDNA pomocí reverzní transkripce, klonován a ligován do expresního vektoru pCI. Připravený plasmid nesoucí gen vybrané reduktasy bude možné použít pro další výzkum.

2 Teoretická část

2.1 *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus (vlasovka slezová) je gastrointestinální patogenní hlístice, která se řadí mezi *Strongylida*, třídy *Secernentea*, nadčeledi *Trichostrongyloidea*. Patří mezi hlavní parazity malých přežvýkavců, jako jsou ovce nebo kozy. Jejich výskyt je vázán na tropické, subtropické až mírné pásmo podnebí (3; 4).

Vlasovka slezová má přímý životní cyklus. Dospělí jedinci přežívají ve slezu (4. žaludek; *abomasum*), zde dospívají, páří se a dospělé samičky kladou vajíčka. Ta se poté dostávají do dalších pasáží gastrointestinálního traktu. S výkaly se vajíčka vylučují na pastvu, kterou další jedinci stáda pasou. V trusu následně dochází k líhnutí larev, které procházejí třemi vývojovými stádii. Třetí stádium je nejvíce odolné proti okolním vlivům a dokáže přežít ve vnějším prostředí. Požitím larev z pastvy dochází k infekci dalších jedinců či reinfekci, larvy putují opět do slezu, kde je jejich vývoj během 2-3 týdnů dokončen. Celý cyklus se opakuje. Dospělá samička vlasovky slezové dokáže naklásat až 10 000 vajec denně a jedno zvíře může být infikováno více jak 1000 jedinci vlasovky slezové (3; 4).



Obrázek 1- Jednoduché schéma životního cyklu *H. contortus* v ovci (upraveno a převzato z: (5)).

Morfologicky jsou jedinci rodu *Haemonchus contortus* nitkovitého vzhledu, velikost samic dosahuje průměrně 18 mm, samci jsou menšího vzrůstu okolo 12,5 mm. Na těle jsou patrná červená, krví vyplněná střeva, u samic poté i spirálovitá děloha. Na přední straně těla se nachází malá ústní dutina, která je opatřena kyjovitým zubem. U samců nacházíme cervikální papily a laterální paprsky *bursy copulatrix*, u samic vulvu překrytou chlopí (6).

2.1.1 Haemonchóza

Parazitární onemocnění vlasovkou slezovou (haemonchóza) je typické pro subtropické a tropické oblasti, neboť teplo a vlhko tvoří ideální podmínky pro rozvoj této infekce. Jedinci tohoto rodu jsou vysoce patogenní, snadno u nich vzniká rezistence na veškerá používaná anthelmintika a v neposlední řadě následný úhyn zvířat způsobuje i vysoké ekonomické ztráty (5).

Vlasovka slezová patří mezi krev sající hlístice, jeden zástupce dokáže průměrně vysát 0,05 ml – 0,17 ml, což při vysokém počtu hlístic může vést k poměrně vysokým ztrátám krve. Hlístice se při dosažení plnosti odlučují od sliznice, avšak krvácení přetrvává, neboť během sání krve dochází k produkci kalretikulinu, který svou vazbou vápenatých kationtů brání srážení krve. Chronicky se vysoké ztráty krve projevují anémií a hypoproteinémií, to vede obecnému neprospívání a může být snadno zaměněno za například špatnou skladbu stravy. V závažných akutních případech dochází k rozvoji hemoragických gastritid, edému v abdominální oblasti a úhynu především mladých jedinců. Typickou klinickou manifestací je pak bledost způsobená anémií, tachykardie, hypopnoe, vodnatá stolice, žízeň, slabost, letargie, ztráta chuti k jídlu (3; 5).

2.1.1 Anthelmintika a léková rezistence u *Haemonchus contortus*

Anthelmintika jsou léky využívající se k léčbě parazitárních onemocnění (např. motolice, tasemnice, hlístice) u člověka a zvířat. Široce užívaná anthelmintika můžeme dělit do 4 tříd. Jsou to benzimidazoly (albendazol, mebendazol), imidazothiazoly (levamisol), makrocyclické laktony (ivermektin a moxidectin) a deriváty aminoacetonitrilu (monepantel) (7; 8; 2).

Lékovou rezistencí rozumíme odolnost organismu proti takovým dávkám léčivého přípravku, který by organismus stejného druhu usmrtil. Rezistence skýtá obrovskou hrozbu v léčbě parazitárních onemocnění jak u zvířat, tak člověka. Problémem je omezené množství anthelmintik na trhu, také nízká úroveň vzdělání a dotace výzkumu v rozvojových státech tropických oblastí, kde dochází k masivním nákazám (7; 2).

Obecně *H. contortus* poskytuje výhodný model pro studium a vývoj anthelmintik, a to především díky velké reprodukci jedinců. Dospělá samice dokáže naklást až 10 000 vajíček denně, což vede k zisku dostatečného množství biologického i genetického materiálu. Produkce larválních stádií z trusu je poměrně snadná, taktéž je výhodná velikost samic, nicméně pro studium dospělců je možná pouze *ex vivo* kultivace, tj. získání dospělců z hostitele a následná kultivace v laboratorních podmínkách, ovšem s velmi omezenou životností (4; 7).

U *H. contortus* se rezistence na dosavadní anthelmintika charakterizuje jako vyšší než 95 %, avšak ne úplná. To dává prostor pro použití kombinací léků, či vybraných preparátů, které jsou schopny usmrtit i významný podíl hlístic. Spolu s režimovými opatřeními a prevencí může být taková léčba úspěšná (7; 8; 2).

Mechanismus rezistence u *H. contortus* se u každé třídy anthelmintik obecně liší. V rámci výzkumu mechanismů rezistence je vhodné vzít i v potaz podmínky, v kterých jsou jedinci chováni. Může docházet např. k rozdílům u laboratorně chovaných zástupců a jedinců volně žijících v prostředí. Taktéž může docházet k selekci a genetickým změnám u hlístic žijících v uzavřené skupině hostitele (7; 8; 2).

2.1.1.1 Benzimidazoly

Benzimidazoly (albendazol, mebendazol, febantel) patří mezi první široce zkoumaná anthelmintika v rámci rezistence u *H. contortus*. První výzkumné práce můžeme nalézt již okolo roku 1986 (Lacey and Prichard), které poukazovaly na významnou spojitost mezi BZ a β -tubulinem, což je cílová molekula působení těchto léčiv. Působením benzimidazolů dochází k inhibici β -tubulinu a vzniku ATP. V současné době je hlavním determinantem rezistence u *H. contortus* stanovena mutace genu pro β -tubulin F200Y. Jedná se o tzv. SNP (*single nucleotide polymorphism*; jednonukleotidový polymorfismus), kde v aminokyselinové sekvenci pro β -tubulin byl na 200. místě zaměněn fenylalanin za tyrosin. Mezi další významné

mutace patří F167Y a E198A, které ale nejsou světově rozšířené. Dochází taktéž ke vzniku více mutací zároveň (dvou nebo tří), avšak tyto kombinace se nenacházejí na stejné alele pro β -tubulin, což patrně naznačuje, že taková kombinace mutací je pro jedince letální (8; 2; 9).

2.1.1.2 Imidazothiazoly

Hlavním zástupcem imidazothiazolových preparátů je tzv. levamisol (dále Morantel, Pyrantel). Mechanismus působení tohoto léku spočívá ve vazbě na nikotinový cholinergní receptor (*nAChR*) *H. contortus*, čímž dochází k svalové paralýze a smrti. Modifikace tohoto receptoru poté vede k rezistenci. Podáním cholinergika (parasymptomimetika), jako je acetylcholin, u rezistentních kmenů *H. contortus* vedlo k vazbě s nízkou afinitou a prokázalo se tedy, že jedinci jsou na tyto látky méně citliví. Případný genetický přenos rezistence na levamisol je patrně polygenní. V současné době není objasněna jedna konkrétní příčina poškození *nAChR*, avšak jsou ustáleny 3 hlavní molekulární změny. Tyto změny vedou ke sníženému počtu *nAChR* u rezistentních kmenů, a tím dochází k omezené vazbě léčiva, a tedy i k výsledné rezistenci (8; 2; 10).

1. Zkrácené geny pro podjednotky *nAChR*

U rezistentních kmenů na levamisol byla analýzou DNA prokázána přítomnost zkrácených genů pro 2 podjednotky cholinergního receptoru u *H. contortus*, označovány jako *Hco-unc-63b* a *Hco-arc-8b* (2).

2. Snížená transkripce genů pro podjednotky *nAChR*

Snížená transkripce genů pro podjednotky *nAChR* byla nalezena u většiny rezistentních kmenů na levamisol. Dochází k tzv. *Down*-regulaci genů, která vede k významnému poklesu transkripce. Jednalo se o geny pro podjednotky: *Hco-unc-29.2*; *Hco-unc-29.3*; *Hco-unc-29.4*; *Hco-unc-26*, *Hco-unc-63a*, - *63b*, *Hco-arc-8a* (2).

3. Snížená transkripce genů pro pomocné proteiny

Předchozí studie dokazují také významnou *down*-regulaci genů (*Hco-unc-74*, -*50*; *Hco-ric-3.1*, -*3.2*) pro pomocné proteiny asociované s *nAChR*, a to napříč všemi vývojovými stádii *H. contortus* (2).

2.1.1.3 Makrocyclické laktony

Makrocyclické laktony řadíme mezi semi-syntetické deriváty avermectinu, který je produktem fermentace bakterie *Streptomyces avermitilis*. Mechanismus účinku spočívá ve vazbě na glutamátové receptory spojené s chloridovými kanály (GluCIRs), tím dochází k hyperpolarizaci membrány a inhibici neurotransmise. Smrt je navozena paralýzou hltanových svalů a prakticky vyhladověním jedince. Rezistence u *H. contortus* není v současné době definována konkrétní změnou cílového místa, avšak dosavadní studie poukazují na spojitost mezi mutacemi genu *GluCla3B*, či změnami v receptorech pro kyselinu gama-aminomáselnou (GABA) (7; 2).

2.1.1.4 Deriváty aminoacetonitrilu

Deriváty aminoacetonitrilu (monepantel) patří mezi nově zkoumaná léčiva v oblasti anthelmintik. Působí jako agonisté nikotinových acetylcholinových receptorů (*nAChR*). Jejich výhoda spočívá v nízké toxicitě pro savce, díky které jsou i vyšší dávky léčiva dobře tolerovány. Rezistence u *H. contortus* je spojována s mutacemi genů pro dvě podjednotky *nAChR* (*Hco-dec-2H*; *Hco-arc-23H*, označována též jako *Hco-mptl-1*). Mutace mají charakter delece či inserce vedoucí k nesprávnému sestříhu, či předčasnému ukončení translace proteinu (7; 2; 11).

2.1.2 Terapie a prevence hemonchózy

2.1.2.1 Farmakologická terapie

Základem úspěšné terapie je léčba širokospektrými anthelmintiky, jejichž použití komplikuje široce rozšířená rezistence. Na hypobiotické stádium larvy jsou v současné době účinná pouze některá dostupná anthelmintika (BZ, makrocyclické laktony a monepantel). U dospělých jedinců je možné díky hemofagii použití i dalších sloučenin, které jsou vázány na krevní proteiny (klosantel, nitroxynil). Tyto sloučeniny jsou ovšem vázané svou účinností na dospělého jedince, který má krmnou aktivitu. Komplikací je také toxicita sloučenin, z toho důvodu je nutné dodržovat úzkou terapeutickou dávku závislou na hmotnosti konkrétního zvířete. Pro úspěšnou léčbu je nutné zahrnout režimová opatření a vhodnou nefarmakologickou terapii (5; 12).

2.1.2.2 Nefarmakologická terapie a možnosti prevence

Nefarmakologická terapie a prevence je založena na celkovém „managementu“ pastvy zvířat. Základem jsou kontroly pastvy, čímž je zajištěno snížení příjmu infekčních larev, tak přejídání zvířat. Vedle kontrol je možné využívat pícnin s anthelmintickými účinky, jako je čekanka obecná. Správným dávkováním a skladbou bioaktivních krmiv může dojít výrazné podpoře vlastní imunologické odpovědi zvířat proti parazitární nákaze. Všechny tyto přístupy jsou vhodné především k prevenci a eventuální podpoře farmakologické léčby, která je základním pilířem úspěšné léčby (5; 12).

2.2 Biotransformace xenobiotik

Biotransformací xenobiotik rozumíme metabolickou změnu struktury xenobiotika (cizorodá látka přírodního i syntetického původu) za účelem snížení jeho toxicity a usnadnění eliminace z organismu. Výsledkem biotransformace jsou metabolity s odlišnou biologickou aktivitou, fyzikálně-chemickou strukturou, a tedy i často s odlišným působením v organismu. Základní metabolické reakce dělíme na transportní a biotransformační, které se dále dělí na reakce 1. a 2. fáze (13).

Mezi reakce 1. biotransformační fáze řadíme oxidaci, redukci, hydrolýzu, hydrataci a izomeraci, čímž dochází k změně struktury funkční skupiny xenobiotika. V 2. fázi pak dochází ke glukuronidaci, sulfonaci, methylaci, acetylaci a konjugaci s glutathionem či aminokyselinami. Základem reakcí jsou enzymy metabolizující xenobiotika. Jedná se o transportní proteiny a biotransformační enzymy, které katalyzují metabolické reakce. Samotnou biotransformaci ovlivňuje nejen struktura xenobiotika, ale také afinita a aktivita enzymů (13).

Regulace biotransformačních enzymů může být zvýšena podpořením rychlosti exprese daného genu (zvýšením syntézy mRNA) pomocí induktoru. Naopak snížení účinnosti enzymu může být docíleno inhibicí, použitím metabolického inhibitoru. Jedná se o specificky, či nespecificky se vázající, organické nebo anorganické sloučeniny, jejichž vazba vede k reversibilním či ireversibilním změnám, negativně ovlivňující aktivitu enzymu. (13)

Vzniklé metabolity jsou zpravidla více hydrofilní, čímž je usnadněna eliminace močí a fekáliemi. Některé látky mohou být taktéž eliminovány potem, dechem nebo mateřským mlékem. Lipofilní xenobiotika často nemusí podléhat biotransformaci, dochází poté k akumulaci a vzniku depositů v tukové tkáni. Podobný osud mohou mít i velmi reaktivní formy xenobiotik, které vytváření kovalentní vazby s biomakromolekulami (13).

2.3 Karbonyl-redukující enzymy

Karbonyl-redukující enzymy [EC.1.1.1 jsou NA(P)DH dependentní, monomerní a převážně cytosolické oxidoreduktasy, které se dělí do dvou hlavních proteinových nadrodin – AKR (aldo-ketoreduktasy) a SDR (reduktasy/dehydrogenasy s krátkým řetězcem). Jedná se o velmi početnou skupinu enzymů, které jsou spojeny především společným mechanismem reakce, tj. redukcí karbonylové skupiny, a to ztrátou kyslíku či adicí dvou vodíků (13; 14; 15).

Vzhledem ke skutečnosti, že karbonylová skupina je běžně přítomna u většiny eobiotických i xenobiotických substrátů a je zároveň zodpovědná za biologickou aktivitu těchto substrátů, tak často karbonyl-redukující enzymy regulují a kontrolují účinky těchto ligandů. Jejich role je také nenahraditelná v patofyziologických procesech, kde často dochází vlivem oxidačního stresu k vzniku reaktivních forem karbonylových skupin a jejich detoxikace je zajišťována právě enzymy této superrodiny. Mimo to jsou zapojeny do metabolismu léčiv, detoxikace, dále jsou spojovány s rezistencí na určitá léčiva, s mutagenezí a karcinogenezí (13; 14; 15).

2.3.1 Nadrodina aldo-ketoreduktas (AKR)

2.3.1.1 Charakterizace aldo-ketoreduktas

Nadrodina aldo-ketoreduktas obsahuje enzymy, které katalyzují redoxní reakce zapojené do různých biosyntéz a intermediárního metabolismu. Jedná se o více jak 190 zástupců z 16 podrodin. Vzhledem k jejich široké substrátové specifitě hrají důležitou roli v druhé fázi biotransformačních reakcích léčiv a dalších xenobiotik. Enzymy patřící do této nadrodiny jsou si strukturně a funkčně velmi podobné (13; 16; 17).

Aldo-ketoreduktasy (AKR) [EC.1.1.1.] patří mezi NA(P)DH dependentní oxidoreduktasy s širokou substrátovou specifitou pro karbonylové sloučeniny a představují nadrodinu cytosolických oxidoreduktas. Typické eobiotické substráty jsou AGE prekurzory, kortikosteroidní hormony, chinony, peroxidy, sulfoxidy, metabolity aldehydů a biogenních aminů. Xenobiotické substráty zahrnují daunorubicin, doxorubicin, oracin, NNK, akrolein a další. Aldo-ketoreduktasy nacházíme napříč všemi organismy a jsou tkáňově specifické dle své izoformy. Velikost všech aldo-ketoreduktas se pohybuje mezi 34 a 37 kDa a až na výjimky (AKR2, 6, 7) jsou monomerní. U člověka nacházíme 15 AKR (13; 18).

Tabulka 1 - Přehled lidských aldo-ketoreduktas (13).

Aldehydreduktasa	AKR1A1
Aldosareduktasy	AKR1B1 AKR1B10 AKR1B15
Hydroxy-steroiddehydrogenasy	AKR1C1 AKR1C2 AKR1C3 AKR1C4
Δ 4-3-ketosteroid-5- β -reduktasa	AKR1D1
Testis-specifický protein	AKR1E6
Kv β proteiny	AKR6A3 AKR6A5 AKR6A9
Aflatoxinreduktasy	AKR7A2 AKR7A3

Nomenklatura je dána zkratkou AKR (=aldo-ketoreduktasa), arabskou číslicí, která označuje enzymovou rodinu s 40% shodou aminokyselinové sekvence, písmeno označující podrodinu s 60% shodou aminokyselinové sekvence. Poslední arabská číslice poté udává unikátní sekvenci daného enzymu (13).

Aldo-ketoreduktasy jsou charakterizovány (β/α)₈ trifosfátisomerasovým soudkovým motivem a konzervativním vazebným místem pro pyridinový nukleotid. Tento motiv má široké funkční využití. Je důležitý pro oligomeraci v kvartérní struktury, nebo pro aktivaci kofaktorů. Typickým rysem je přítomnost aktivního místa na C-konci, které je pravděpodobně evolučním rysem (13; 16).



Obrázek 2 - Terciální krystalografická struktura aldo-ketoreduktasy s navázaným NADPH. Převzato z: (19).
(Rozlišení 1.94 Å, ID:2F2K)

Kanonická struktura $(\beta/\alpha)_8$ trifosfátisomerasového soudkového motivu obsahuje centrální vnitřní kruh skládající se z 8 paralelních β -skládaných řetězců, které jsou zabaleny do 8 vnějších α -helixů. Na schématu krystalografické struktury můžeme vidět i navázaný koenzym NADPH (barevně). Struktura obsahuje také 3 tzv. variabilní smyčky, které udávají substrátovou specifitu enzymu (13; 16).

2.3.1.2 Významní zástupci lidských aldo-ketoreduktas

AKR1A1

Vůbec první objevenou aldo-ketoreduktasou byla AKR1A1. Jedná se o cytosolickou NADPH dependentní oxidoreduktasu v podobě monomeru. Exprese v organismu je takzvaně ubikvitní, avšak nejvyšší hladiny nalézáme v proximálních tubulech ledvin. Má širokou substrátovou aktivitu a její afinita je podstatně vyšší k negativně nabitým karboxylovým skupinám v porovnání s ostatními substráty. Podobou afinitu má poté k aromatickým aldehydům nebo steroidním aldehydům. Patofyziologicky hraje roli v aktivaci různých prokarcinogenů jako jsou cyklické polyaromatické uhlovodíky nebo trans-dihydrodioly. Nevhodným modelem pro studium AKR1A1 se ukázal model hlodavců, u kterých je fyziologická role tohoto enzymu odlišná a vede ke vzniku kyseliny askorbové (13; 16; 20).

AKR1B1

Druhým široce studovaným zástupcem AKR nadrodiny je AKR1B1. Tento enzym je spojován s rozvojem sekundárních komplikací, spojených s hyperglykemií při diabetu melitu. Svým působením redukuje glukózu při hyperglykémii, což je spojováno s poškozením tkání. Následná inhibice AKR1B1 vedla minimálně ke zpomalení poškození vyvolaných vysokou hladinou krevního cukru. Taktéž se ukázalo, že AKR1B1 zasahuje do procesů zánětu příčině vyvolaného hyperglykemií. Přesný mechanismus působení AKR1B1 je však neznámý (13; 16; 21).

AKR1B10

Podobným enzymem je pak AKR1B10, který má obdobnou strukturu i substrátovou specifitu jako AKR1B1. Vyskytuje se především v tenkém střevě, a proto je někdy označována jako aldosareduktasa tenkého střeva. Mimo to se vyskytuje v thymu, játrech, kolonu nebo nadledvinkách. Role AKR1B10 tkví ve vysoké katalytické aktivitě k *all-trans*-retinalu a ketonům, ke kterým patří i léčiva jako daunorubicin nebo dolasetron. AKR1B10 také hraje roli v rozvoji nádorových onemocnění, a to díky své mitogenní aktivitě, která podporuje proliferaci nádorových buněk. Nadměrná exprese byla zjištěna u nádorů plic, dělohy a kolorektálního karcinomu. Fyziologicky se patrně účastní regulace biosyntézy mastných kyselin a chrání před elektrofilním poškozením tkání (13; 16; 22).

AKR1C1-C4

Hydroxysteroiddehydrogenasy (AKR1C1-C4) jsou enzymy s 86% genovou podobností. Jejich exprese je vázána na jaterní tkáň, avšak následná distribuce mimo játra je odlišná. Zástupce -C2 a -C3 pak nacházíme hlavně v prostatě a mléčné žláze. Mezi běžné substráty AKR1C1-C4 patří aldehydy, ketony, steroidy a prostaglandiny. Enzymy jsou známy také pod názvem dyhydrodiol dehydrogenasy, a to díky své schopnosti katalyzovat NADP⁺ vázanou oxidaci *trans*-dihydrodiolů aromatických uhlovodíků na katecholy. V rámci patofyziologie se enzymy této podrodiny účastní při vzniku a proliferaci estrogen a androgen-dependentních nádorových onemocnění (BHP, karcinom prostaty a prsu). Mimo jiné zastávají roli i v biotransformaci xenobiotik a zasahují do metabolismu např. protinádorových léčiv (doxorubicin, oracin) (13; 16; 23).

AKR1D1

AKR1D1 je jaterní enzym nezbytný pro 5 β -stereospecifické redukční reakce v rámci syntézy žlučových kyselin (kyselina cholová a deoxycholová). Dochází k redukci dvojné vazby u Δ 4-3-ketosteroidů za vzniku cis kruhové struktury. Dalšími substráty jsou steroidní hormony (testosteron, progesteron), kortizol, kortizon. Tkáňová specifita je vázána na mozek a urogenitální trakt. S velkou pravděpodobností se účastí degračních procesů v metabolismu pohlavních hormonů. Mutace genu pro AKR1D1 vedou k hepatitidám, neonatální cholestázy a jaternímu selhání (13; 16; 24).

AKR6 – Kv β proteiny

Tyto proteiny neplní funkce oxidoreduktas, ale jsou spojovány s napěťově řízenými draslíkovými kanály (Kv), a to prostřednictvím N-konce cytosolické domény T1 transmembránové α -podjednotky Kv kanálu. Jejich funkce spočívá v podpoře při tvorbě podjednotek endoplazmatického retikula a tvorbě proteinů, včetně jejich exprese na povrch buňky. Přestože proteiny AKR6 rodiny obsahují typické vazebné místo pro AKR enzymy, tak jejich afinita k běžným substrátům (aldehydy, ketony) je nízká. Hlavní role a důvod podobnosti těchto proteinů tedy zůstává nejasný (16).

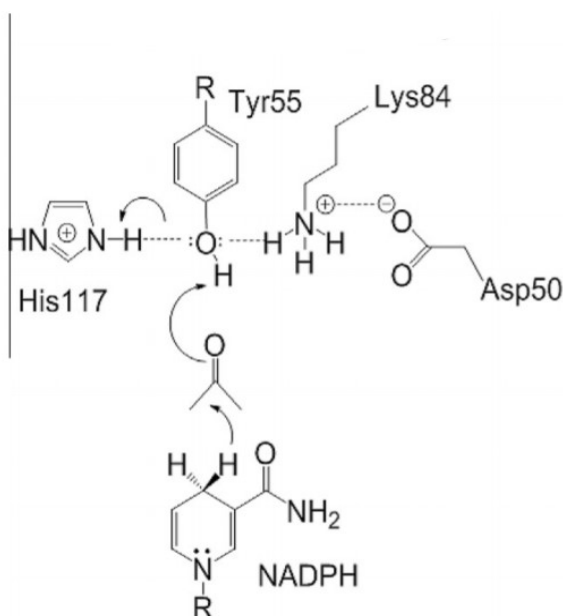
AKR7A2-A3

Aflatoxin reduktasy byly objeveny jako první u hlodavců, a to pro svou schopnost metabolizovat dialdehyd aflatoxin B1 na netoxický alkohol. Jedná se o funkční dimery. AKR7A2 má ubikvitní distribuci v extrahepatálních tkáních na rozdíl od enzymu 7A3, který má tkáňovou specifitu vázanou na pankreas, žaludek, ledviny a játra. Funkce AKR7A2 je spojována s metabolismem GABA (γ -aminomáselné kyseliny) (13; 16; 25).

2.3.1.3 Mechanismus reakce aldo-ketoreduktas

Většina proteinů z nadrodiny AKR jsou katalycky aktivní a jejich mechanismus reakce je založen na stereospecifické oxidaci nebo redukci za účasti koenzymu NA(P)DH. Redukce probíhá v bikinetickém mechanismu, tj. ve 2 souběžných nebo na sebe navazujících reakcích. Aktivní vazebné místo AKR obsahuje tzv. katalytickou tetradu složenou ze 4 aminokyselin (Tyr- 48, His-110, Lys-77, Asp-43 – číslování dle AKR1B1). pH optimum se pohybuje mezi 6,5 a 7,5 pro většinu enzymů této nadrodiny (16; 17).

Koenzym NA(P)DH se váže na terminální C-konec AKR, strukturně na spodní část $(\alpha/\beta)_8$ soudkové struktury, dojde ke stabilizaci vodíkovými a solnými můstky. Poté dochází k prostorové vazbě substrátu nad kofaktor a samotné chemické reakci, kdy během první reakce dochází k přenosu hydridového iontu z NA(P)DH na karbonylový substrát. V druhé reakci proton, z rozpouštědla využitého k redukci, dává vzniku produktu – alkoholu. Časový odstup reakcí určuje především rozsah vyvinutého náboje na karbonylové skupině během přechodového stavu. Mechanismus katalytické reakce je znázorněn na obrázku č. 3 (16; 17).



Obrázek 3 - Schéma katalytické reakce u AKR (převzato z: (17)).

2.3.2 Nadrodina dehydrogenas/reduktas s krátkými řetězci (SDR)

2.3.2.1 Charakterizace dehydrogenas/reduktas s krátkými řetězci

Nadrodina dehydrogenas/reduktas s krátkými řetězci obsahuje až 47 000 členů, čímž patří mezi jedny z nejpočetnějších. Jedná se o NAD(P)H dependentní oxidoreduktasy, které mají obdobné katalytické motivy, a tedy i podobné mechanismy reakcí. Jejich celková sekvenční podobnost je ovšem velmi nízká a pohybuje se okolo 15-30 % (13; 26).

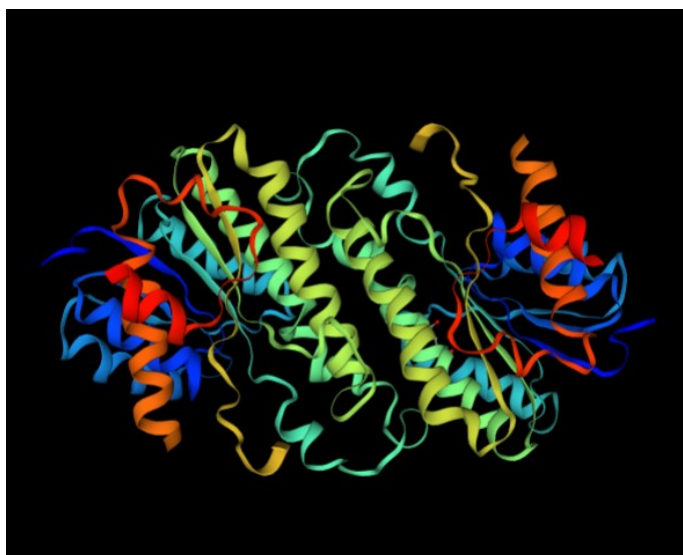
Dehydrogenasy/reduktasy s krátkými řetězci (SDR) [EC.1.1.1.] mají roli v metabolismu lipidů, aminokyselin, hormonů, sacharidů a xenobiotik. Mezi eobiotické substráty patří steroidy, retinoidy, nukleové sacharidy, polyoly aj. Běžně katalyzované xenobiotické substráty jsou doxorubicin, warfarin, daunorubicin, *o*-chinony, oracin aj (13; 26).

V lidském organismu bylo charakterizováno 48 rodin SDR a jejich lokalizace je převážně cytosolická, částečně jsou přítomny také v hladkém endoplazmatickém retikulu. V rámci tkáňové specifity jsou děleny dle jednotlivých izoform (13; 26).

Tabulka 2 - Významní zástupci lidských SDR.

Karbonylreduktasa 1	CBR1, <i>SDR21C1</i>
Karbonylreduktasa 3	CBR3, <i>SDR21C2</i>
Karbonylreduktasa 4	CBR4, <i>SDR45C1</i>
Reduktasa L-xylulózy	DCXR, <i>SDR20C1</i>
11 β -hydroxysteroid dehydrogenasa typ 1	11 β -HSD1, <i>SDR26C1</i>
Estradiol 17 β -dehydrogenasa 1	17 β -HSD1, <i>SDR28C1</i>
Retinol-dehydrogenasa 16	RHD16, <i>SDR9C8</i>

Nomenklatura dehydrogenas/reduktas s krátkými řetězci je dána zkratkou „SDR“ a číslem rodiny. Dále jsou u těchto enzymů určovány tzv. typy, mezi nejčastější patří klasický typ označovaný jako „*classical* = C“. Těchto zástupců v lidském genomu nacházíme 54. Druhým početným typem je 11 SDR označovaných jako rozšířené „*extended* = E“. Mimo tyto dva nejrozšířenější typy nacházíme další 4, méně často vyskytující se, které vykazují významnou sekvenční diverzitu, charakterizovanou nepravidelným motivem aktivního vazebného místa – „*intermediate* = I“; „*divergent* = D“; „*complex* = X“; „*atypical* = A“. Všechny ostatní jsou označovány jako neznámé „*unknown* = U“ (13; 26; 27).



Obrázek 4 – Terciální krystalografická struktura dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR1; rozlišení 1.80Å, ID: Q96LJ7), Převzato z: (27).

Vazebné místo SDR obsahuje katalyticky aktivní tetradu skládající se ze čtyř aminokyselin: Asn-Ser-Tyr-Lys. Prostorová struktura obsahuje typický Rossmannův motiv, důležitý pro vazbu NAD(P)H. Ten se skládá z 6-7 β -skládaných listů, které jsou obklopeny 3 α -helixy. Typické pro SDR je také variabilní C-terminální část, která je důležitá pro vazbu substrátu (28).

2.3.2.2 Významní zástupci lidských SDR

CBR1, SDR21C1

Jedná se o monomerní, cytosolickou karbonylreduktasu. Vyskytuje se ubikvitně ve všech tkáních a patří mezi jednu z nejdůležitějších reduktas v rámci metabolismu jak endogenních, tak xenobiotických substrátů (*o*-chinony, *p*-chinony, anthracykliny, warfarin aj.). Vyšší hladiny CBR1 byly stanoveny v jaterní tkáni, což poukazuje na významnou roli v detoxikaci toxických karbonylů. Fyziologicky se také účastní např. přeměny prostaglandinu E na prostaglandin F2- α , nebo se účastní metabolismu vitamínu K. Také se váže na glutathion, což vysvětluje zvýšenou afinitu k substrátům konjugovaných glutathionem (13; 29).

CBR3, SDR21C2

Obdobně jako CBR1 je CBR3 monomerní, cytosolická reduktasa, která se vyskytuje ve všech tkáních. Vyšší distribuce byla zaznamenána ve vaječnících a pankreatu. Oproti CBR1 vykazuje vyšší substrátovou selektivitu a její aktivita je poměrně nízká k 4-bentoylpyridinu a menadionu. Rozdíly v substrátové specifitě jsou dány především změnou struktury vazebných míst (13; 14; 30).

CBR4, SDR45C1

Karbonylreduktasa 4 je na rozdíl od výše popsaných zástupců heterotetramer s navázaným HSD117B8 (17 β -hydroxysteroiddehydrogenasa). Od ostatních zástupců karbonylreduktas/dehydrogenas s krátkým řetězcem se liší spektrem substrátů, které katalyzuje. CBR4 má především NADPH-dependentní reduktasovou aktivitu k *o*- a *p*- chinonům. Proteinová exprese byla detekována v játrech a ledvinách. Dosavadní zjištěná funkce CBR4 byla popsána v rámci mitochondriálního metabolismu mastných kyselin (13; 14; 31).

DCXR

Jedná se o reduktasu s typickou substrátovou specifitou, zajišťuje NAD(P)H dependentní redukcí L-xylyulózy, tetróz, pentóz, trióz a α -dikarboxylových sloučenin. Fyziologicky se účastní metabolismu kyseliny urátové a také se pravděpodobně podílí na intracelulární absorpci vody a osmoregulačních procesech buňky v proximálních tubulech ledvin, a to produkcí xylitolu jakožto osmoticky aktivní látky (32).

11 β -HSD1, SDR26C1

11 β -hydroxysteroid dehydrogenasa je široce exprimovaná, mikrosomální dehydrogenasa v podobě homodimeru. Nacházíme ji v játrech, mozku, adipocytech aj. Hraje zásadní roli v aktivaci a inaktivaci glukokortikoidních hormonů, a to reversibilní konverzí kortisolu na neaktivní metabolit kortizon. Dále katalyzuje také např. reversibilní konverzi

7-ketocholesterolu na 7- β -hydroxycholesterol. To činí 11 β -HSD1 významný terapeutický cíl v rámci léčby různých onemocnění (13; 33).

17 β -HSD1, *SDR28C1*

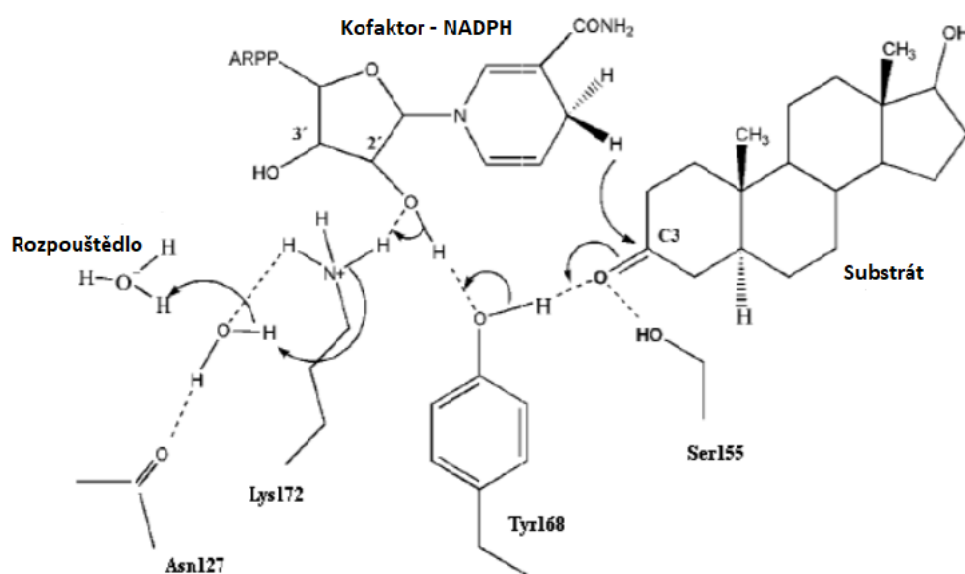
17 β -hydroxysteroid dehydrogenasa patří mezi cytoplazmatickou dehydrogenasu v podobě homodimeru. Její hlavní role spočívá v metabolismu pohlavních hormonů (estrogenů a androgenů). Zajišťuje například konverzi estronu E1 na více potentní estrogen (17 β -estradiol) E2 a ke svým reakcím preferenčně využívá NADH. Polymorfní varianty tohoto enzymu vedou pravděpodobně k zvýšené náchylnosti k hormon-dependentním nádorovým onemocněním. Mezi vysoce studovanou polymorfní variantou patří HSD17B1 Ser312Gly, avšak výsledky mnoha studií jsou prozatím nekonzistentní (34; 35).

RHD16, *SDR9C8*

Jedná se o oxidoreduktasu endoplazmatického retikula s preferencí ke kofaktoru NAD. Katalyzuje oxidaci All-trans-retinolu, 9-cis-retinolu, 11- a 13-cis-retinolu na odpovídající aldehydy. RHD16 má vyšší afinitu k retinolům vázaných na celulární proteiny (CRBP), než k volným retinolům. Tkáňová exprese je vázána především na jaterní tkáň, ale byla nalezena také v endometriu a kůži. Nové studie také poukazují na spojitost mezi RHD16 a hepatocelulárním karcinomem, kde u pacientů trpící HCC je potenciál k využití RHD16 jako prognostického biomarkeru (36; 37).

2.3.2.3 Mechanismus reakce dehydrogenas/reduktas s krátkými řetězi

Katalyticky aktivní tetráda (Asn-Ser-Tyr-Lys) poskytuje základ pro mnoho enzymatických reakcí, jedná se o oxidoreduktasy, epimerasy, lyasy, isomerasy, dehydratasy aj. Základem reakce je katalyticky aktivní aminokyselina – tyrosin, spolu se zbytky serinu, lysinu a asparaginu. Mechanismus reakce probíhá v po sobě jdoucích bifázických reakcích, kde v první reakci dochází k vazbě koenzymu NADPH a zároveň dochází k odstupu koenzymu jako posledního v reakci. Samotná redukce začíná odevzdáním protonu z -OH skupiny rozpouštědla na substrát a dojde k přenosu hydridového aniontu z kofaktoru na karbonylový uhlík. Lysin zajišťuje vazbu kofaktoru v blízkosti substrátu a serin pomáhá vazbě substrátu samotného. Asparagin zajišťuje stabilitu pozice lysinu (27; 28; 38).



Obrázek 5 - Mechanismus reakce SDR (17β-HSD10). Upraveno a převzato z: (38).

3 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je klonování a příprava plasmidu pro expresi vybrané reduktasy z vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*). V teoretické části byla provedena literární rešerše a seznámení s daným tématem. Experimentální část práce zahrnuje přípravu plasmidu pomocí molekulárně biologických metod (izolace RNA, reverzní transkripce, *qPCR*, ligace do vektoru, transformace, namnožení a izolace plasmidu, ověření sekvenací, transfekce) a následné zpracování dat.

4 Experimentální část

4.1 Použitý biologický materiál, chemikálie a vybavení

4.1.1 Biologický materiál

K experimentální části této práce byli použiti jako biologický materiál živí, dospělí jedinci z rodu *Haemonchus contortus* obou pohlaví, s různou citlivostí k anthelmintikům (ISE, IRE, WR). Po vyjmutí ze slezu experimentálně nakažených ovcí byli dospělci opláchnuti v roztoku PBS. Po mikroskopické separaci dle pohlaví bylo vybráno několik zástupců z každého kmene, kteří byli vloženi do roztoku TRIzolu a ihned zamrazeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.2 Chemikálie, reagentie, kity

- Agarosa – Serva
- *ECL Prime Western Blotting detection reagent* - Amersham
- DEPC – Sigma-Aldrich
- dNTP – Eurogentec
- DTT – Sigma-Aldrich
- *E. Coli* – kmen TOP10 – Life Sciences
- Ethanol 99% - Sigma-Aldrich
- Chloroform – Sigma-Aldrich
- Isopropanol – Sigma-Aldrich
- Loading dye 6x (BioLabs.Inc. New England, USA)
- Lipofectamin – Life Sciences
- NaCl – Sigma-Aldrich
- PBS – Sigma-Aldrich
- LB medium (*Luria-Bertani*) s agarem – VWR Biochemicals
- Primární protilátka anti – His Tag – Abcam
- SW480 – ATCC

- Q5® High-Fidelity DNA Polymerase – New England BioLabs
- qPCR kit – Xceed qPCR SG Mix – Lo-ROX – Institute of Applied Biotechnologies
- RT – ProtoScript II – New England BioLabs
- Sekundární protilátka – anti-mouse – Abcam
- Specifické klonovací primery – Generi biotech
- SYBR safe – Thermo Fisher Scientific
- T4 DNA polymerasa – Life Sciences
- LB medium (*Luria-Bertani*) – VWR Biochemicals
- TRI reagent – Molecular Research Center

4.1.3 Technické vybavení

- Automatické pipety – Research Plus, Eppendorf
- Centrifuga – Biofuge stratus Heraeus, Thermo Fisher Scientific
- Kuličkový homogenizátor – FastPrep24, M.G.P.
- Laminární box – AURA 2000, M.A.C, BioAir
- Laminární box – UVC/T-AR, BioSan
- Minicentrifuga – Sprout, Heathrow Scientific
- Mrazičí boxy – Vxe Series Jouan, Thermo Fisher Scientific
- NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific
- QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR System – Thermo Fisher Scientific
- Real-Time PCR analyzátor – QuantStudio6, Applied Biosystems
- Thermocycler TAdvanced with High-Performance Smart Lid – Biometra
- Vortex – Vortex V-1, BioSan
- Mikroskop – Nikon Eclipse TS 100
- Uvitec Alliance Q9 Advanced - Baria

4.2 Metodika

4.2.1 Kvantifikace a výběr vhodných genů AKR a SDR ke klonování

4.2.1.1 Izolace RNA

Izolace RNA je specifická především svými nároky na čistotu, neboť RNAsy degradující řetězce RNA jsou všudypřítomné. Svým působením snižují integritu, a tedy i kvalitu výtěžku RNA. Z tohoto důvodu je nutné dodržovat specifické zásady, jako je práce v laminárním boxu, častou výměnu rukavic, použití sterilních zkumavek ideálně zbavených RNAs, DNAs a proteinů.

K homogenizaci biologického materiálu v 1ml TRIzolu (= směs fenolu a guanidin isothiokyanátu), který zajišťuje uchování integrity RNA v rámci izolace, byly použity kovové a skleněné kuličky o různé velikosti, které byly pomocí odměrky přidány do zkumavek s bezpečnostními víčky. Zkumavky byly poté vloženy do kuličkového homogenizátoru. Po dokončení homogenizace a inkubačním čase 5 minut při laboratorní teplotě bylo ke vzorkům přidáno 200 μ l chloroformu, vzorky byly promíchány třepáním po dobu 15 s. K oddělení vodné a organické fáze byly vzorky centrifugovány 15 min při 12,000 x g a 4 °C.

Po centrifugaci došlo k oddělení vodní fáze s obsahem RNA, která byla pečlivě odpipetována do sterilní 1,5 ml zkumavky tak, aby nedošlo ke kontaminaci genomovou DNA a proteiny z mezifáze a organické fáze. K vodní fázi bylo přidáno 500 μ l isopropanolu a roztok byl inkubován při laboratorní teplotě 10 min. Vzorky byly centrifugovány ve vychlazené centrifuze na 4 °C při 12,000 x g po dobu 10 min. Je vhodné zkumavky v této fázi označit a srovnat stejným směrem tak, aby bylo možné odhadnout, kde bude peleta RNA usazena. K odsátí supernatantu byly použity skleněné pipety s protáhlou špičkou, u kterých nehrozí tak snadné odsátí pelety. Peleta byla omyta 1 ml 75% ethanolem, který byl čerstvě naředěn DEPC vodou, a stočena při 7500 x g, 4 °C, 5 min.

Po odsátí supernatantu byly pelety nechány na vzduchu cca 10 min. Takto připravená RNA byla poté rozpuštěna v 20-100 μ l DEPC vodě (podle velikosti pelety RNA), promíchána a skladována při - 80 °C.

4.2.1.2 Stanovení koncentrace RNA, DNA

K stanovení koncentrace nukleových kyselin lze použít v současné době již několik metodik od klasické spektrofotometrické po fluorimetrické. V našem případě bylo k stanovení koncentrace RNA/DNA použita spektrofotmetrická metoda v podobě NanoDropu.

Vzorky v objemu 2 μl byly změřeny proti blanku (destilovaná voda) při 260 nm, 280 nm a 230 nm. V rámci výsledků získáme nejen hodnotu koncentrace RNA/DNA v $\text{ng}/\mu\text{l}$, ale také poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm, udávající čistotu výtěžku, eventuální kontaminaci fenolem či proteiny.

V případě více koncentrovaných vzorků ($>1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) je vhodné vzorky před samotným měřením 10x zředit DEPC vodou, např. 27 μl DEPC vody + 3 μl rozpuštěné RNA.

4.2.1.3 Reverzní transkripce

Izolovaná RNA není vhodná k další práci především díky své vysoké nestabilitě. Z tohoto důvodu je nutné molekuly RNA převést na jedno řetězcovou cDNA (komplementární DNA) pomocí metody „reverzní transkripce“. V rámci této metody je RNA převedena pomocí tzv. reverzní transkriptasy za použití náhodných hexamerů, oligo(dT)₁₈ nebo specifických primerů. Metoda je prováděna v laminárním boxu za použití sterilních nástrojů.

Nejprve bylo nutné izolovanou RNA naředit tak, aby její množství vstupující do reakce odpovídalo 2000 ng, k takto připravenému materiálu byl přidán 1 μl náhodných hexamerů. Směs byla inkubována po dobu 5 min při 65 °C. Poté bylo k směsi přidáno 11 μl mastermixu, který byl v mezičase připraven spolu se sadou pro kontrolu, noRT reakci, tj. směs bez enzymu. Množství mastermixu bylo připraveno dle počtu vzorku.

Složení mastermixu:

Tabulka 3 - Složení mastermixu pro RT

Vzorky – RT	noRT
4 µl Pufr pro RT (5x)	4 µl Pufr pro RT (5x)
2 µl DTT	2 µl DTT
2 µl dNTPs	2 µl dNTPs
0,5 µl Reverzní transkriptasy	-
2,5 µl H ₂ O	3,0 µl H ₂ O

Reakce probíhala v thermocykléru za příslušného programu, u kterého je klíčové dodržet podmínky: při použití náhodných hexamerů nejdříve směs zahřát 10 min na 25 °C, u syntézy cDNA – zahřívání na 42 °C po dobu 50 min a 5 min denaturace při 80 °C. Po dokončení syntézy cDNA byly vzorky naředěny 5x redestilovanou vodou (tj. + 80 µl ddH₂O).

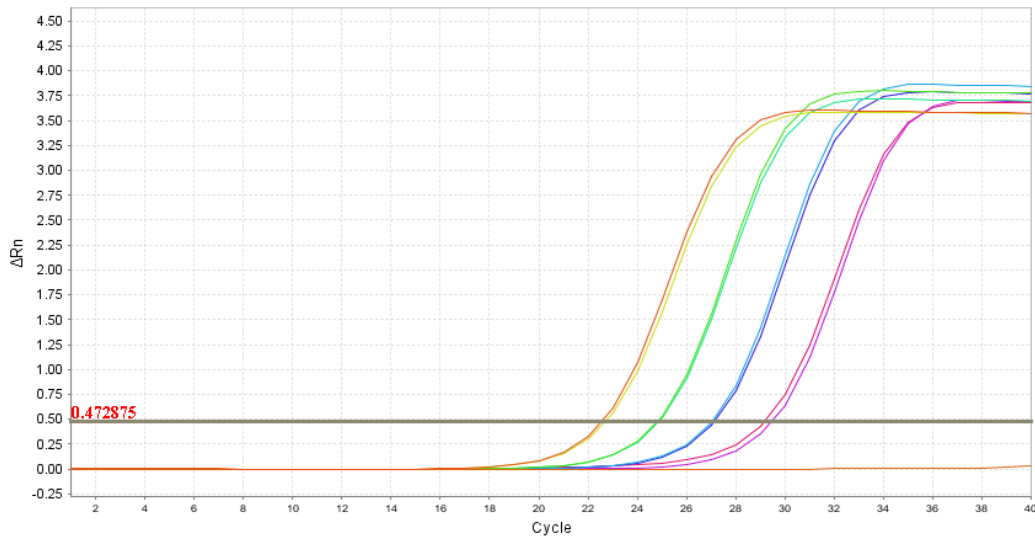
4.2.1.4 Real-time PCR (*qPCR*)

Stanovení účinnosti primerů

Před použitím navržených primerů je nutné jednotlivé primery ověřit, tj. stanovit účinnost a při každém měření provést NTC kontrolu neboli reakci bez templátu, aby došlo k zjištění případných amplifikací v rámci samotných primerů, která není žádoucí.

K stanovení byla použita směsná cDNA sériově ředěna tzv. pětkovou řadou v celkovém objemu 50 µl. Celkem byly provedeny 4 ředění, koncentrovaný vzorek a 1x NTC. Z takto naředěných vzorků bylo odebráno 5 µl a přidáno 15 µl mastermixu (viz tab. 3) každý vzorek byl připraven v duplikátu.

Příklad stanovení účinnosti:



Obrázek 6 - Amplifikační graf – stanovení účinnosti primerů pro gen AKR3.

Na grafu pozorujeme na ose x hodnotu „Ct“ tj. počet cyklů, ve kterých došlo k amplifikaci. Na ose y se nachází hodnota „ΔRn“, což je normalizovaná hodnota fluorescence reportéru. První červeně označené vzorky jsou vzorky s nejvyšší koncentrací, hodnota Ct se pak zvyšuje se snižující se koncentrací vzorku. Červeně označený vzorek je NTC s nulovou amplifikací.

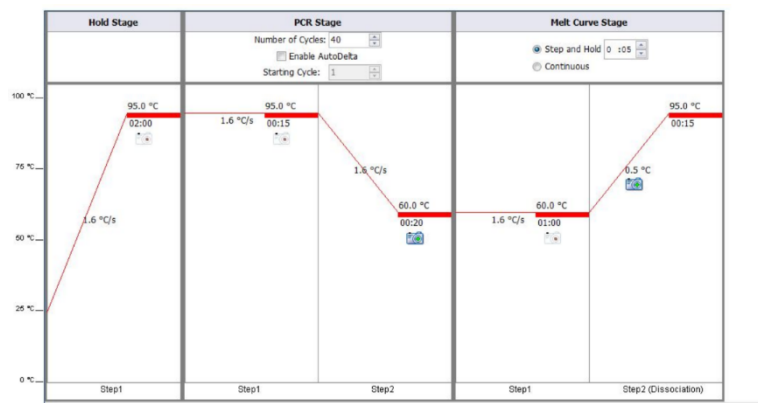
Kvantifikace genů

Kvantifikace genů byla provedena metodou kvantitativní PCR (*qPCR*), tj. PCR v reálném čase. Veškeré primery pro cílové i referenční geny byly navrženy doc. Ing. Petrou Matouškovou, Ph.D. Jako vnitřní kontrola byly použity referenční geny kódující glycerinaldehyd- 3-fosfát-dehydrogenasu (GAPDH) a geny pro komplex proteinů vázajících nukleární čepičku pre-mRNA (NCBP). K práci byl použit komerční SYBR qPCR kit, který zahrnoval: 2x koncentrovaný roztok SYBR green I (DNA polymerasa, dNTPs, pufr, SGI, Mg²⁺).

Tabulka 4 - Složení mastermixu pro qPCR.

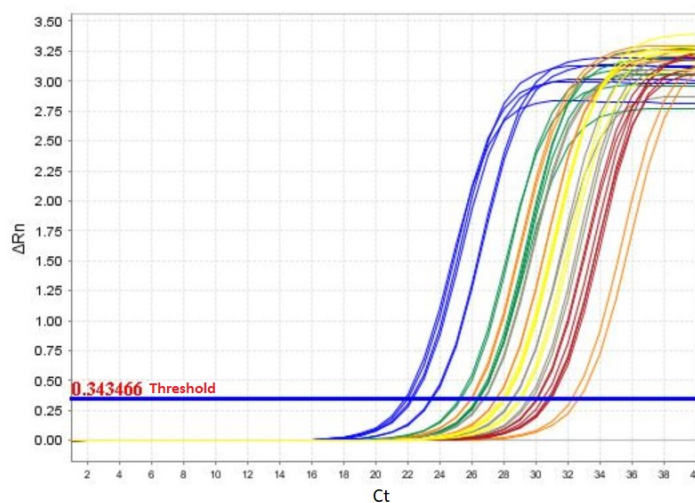
SYBR Green qPCR kit	1x vzorek [μl]
ddH ₂ O	4,20
2 x SYBR Green mix	10
F Primer (5μM)	0,4
R Primer (5μM)	0,4
cDNA (ředěná 1:4)	5
celkem	20

1. Do 0,5 ml zkumavky byl připraven mastermix pro příslušný počet vzorků, směs byla připravena tak, aby výsledná koncentrace primerů byla 100 nM.
2. Do stripu určeného k qPCR bylo napipetováno 15 μ l mastermixu.
3. Ke směsi bylo přidáno 5 μ l naředěné cDNA, u NTC kontroly byla použita voda.
4. Takto připravený strip byl zapečetěn folií, aby nedošlo k odpaření vzorků během reakce.
5. Vzorky byly promíchány a krátce centrifugovány.
6. Vzorky byly umístěny do PCR cykléru a v programu Quant Studio 6 (ThermoFisher) byly nastaveny parametry reakce rozvržení vzorků a cílových genů.

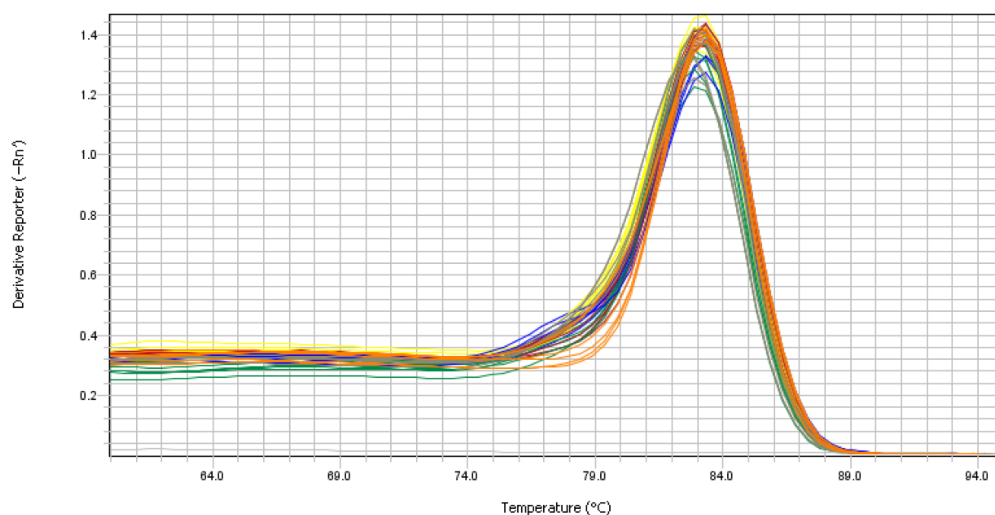


Obrázek 7 - Parametry použitého programu qPCR.

Příklad výstupu amplifikace:



Obrázek 8 - Příklad amplifikace genu SDR5.



Obrázek 9 - Křivka tání – gen SDR5.

Výpočet komparativní metody:

$$ct = 2^{-\Delta Cq}$$

$$\Delta Cq = Cq(\text{Target Gene}) - Cq(\text{Reference Gene})$$

4.2.1.5 Výběr genů pro klonování

Vyhodnocení dat a statistiky bylo provedeno pomocí komparativní metody v programu MS Excel. Pro další práci byly výsledky zpracovány v podobě grafů a byly vybrány geny, jejichž hodnota byla alterována ([viz 5.2.2](#)).

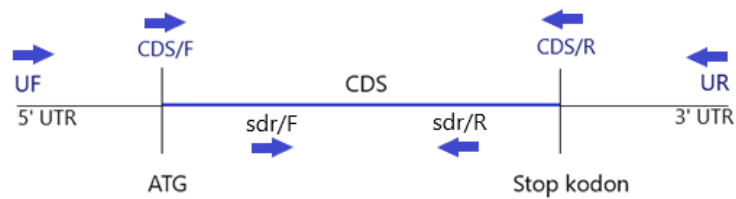
4.2.2 Klonování

4.2.2.1 Reversní transkripce

Pro samotné klonování byly použity vzorky po ošetření DNAsou I. K naředěné cDNA byl přidán místo náhodných hexamerů, 1 μ l primeru uniHCO, který obsahuje poly(T) úsek, komplementární k poly(A) úseku mRNA a mastermix byl obohacen o inhibitor RNAs. Dále již proběhla reverzní transkripce dle obdobného návodu výše ([viz 4.2.1.3](#)).

4.2.2.2 Namnožení vzorku

Ke klonování námi vybraného genu (*SDR5*) bylo navrženo několik primerů, které byly použity v prvním kole amplifikace. Primery byly navrženy doc. Ing. Petrou Matouškovou Ph.D. Byly připraveny reakce, které zahrnovaly všechny možné kombinace, tak aby bychom zajistili amplifikaci kýženého úseku CDS mRNA, případně vyloučili nefunkční primery.



Obrázek 10 - Schéma mRNA s místy nasedání použitých primerů.

Tabulka 5 - Kombinace použitých primerů ke klonování.

Kombinace použitých primerů	
1	UF-UR
2	UF-CDS/R
3	UF-SDR/R
4	UR-CDS/F
5	CDS/F-CDS/R
6	SDR/R-CDS/F
7	SDR/F-CDS/R
8	SDR/F-UR

Ke klonování byla použita Q5® High-Fidelity DNA Polymerasa a opět byl připraven mastermix pro odpovídající množství vzorků dle následujícího návodu (primery byly pipetovány dle tabulky 5 až do výsledných vzorků):

Tabulka 6 - Složení mastermixu pro PCR – klonování.

PCR master mix – klonování	1x vzorek [μ l]
5X Q5 Reakční pufr	5
10 mM dNTPs	0,5
10 μ M F+R Primer	(2+2)
Q5 High-Fidelity DNA Polymerasa	0,25
Templát	1
DEPC H ₂ O	14,25

PCR program:

Tabulka 7 – Program PCR – klonování.

Počáteční denaturace	98 °C	30 s
Annealing - 30 cyklů	98 °C	10 s
	55 °C	20 s
	72 °C	2 min
Elongace	72 °C	2 min
	16 °C	∞

4.2.2.3 Agarosová elektroforéza

K ověření a zjištění amplifikovaných úseků byla použita horizontální agarosová elektroforéza, na základě které byly vybrány vzorky, u kterých došlo k namnožení požadovaného úseku.

Byl připraven 1% agarosový gel, a to odvážením 0,4 g agarosy na předvážkách a rozpuštěním v 40 ml 1x TAE pufru v 250 ml Erlenově baňce. Po zchlazení gelu bylo přidáno 0,5 μ l SYBR safe interkalačního barviva pro UV vizualizaci DNA. Gel byl nalit do sestavené aparatury a ponechán při laboratorní teplotě. Po zatuhnutí byl zcela ponořen do 1x TAE pufru. Vzorky byly nanášeny po smíchání s nanášecí barvou (6x loading dye) v objemu 5 μ l do jednotlivých jamek. Tím byla zajištěna vizuální detekce a usazení vzorku

do jamek gelu. Do první jamky byl nanesen *DNA ladder*-marker o velikosti 1 kbp. Elektroforéza probíhala cca 30 min na 90 V. Výsledné bandy amplifikovaných vzorků byly vizualizovány pomocí UV transluminátoru a gel byl vyfocen pro pozdější analýzu.

Složení 10x TAE pufru:

- 0,4 M Tris/0,2 M kyselina octová/10 mM EDTA

4.2.2.4 Izolace a přečištění DNA

K přečištění byl použit kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. Jedná se o komerčně dodávaný kit, s již zahrnutými reagensy a adsorpčními mikrokolonami určené k izolaci využitím centrifugace.

1. Upravení objemu vzorku. Vzhledem k objemu reakční směsi pro PCR reakci (<30 µl) bylo nutné, dle návodu, upravit objem pro přečištění. Objem byl upraven na 50 µl *pcr grade* vodou. K takto připravenému vzorku byly přidány 2 objemy DNA vázajícího NTI pufru (součást pufru).

2. Vazba DNA na křemíkovou kolonku. Vzorek byl nanesen na kolonku, která byla umístěna do mikrozkušavky a centrifugován při 11,000 x g, 30 s. Po centrifugaci byla spodní část zkumavky vyprázdněna.

3. Promytí křemíkové kolonky. Membrána byla 2x promyta promývacím NT3 pufrům s obsahem ethanolu. Na kolonku bylo naneseno 700 µl pufru a byla provedena centrifugace při stejných podmínkách. Postup opakován po vyprázdnění zkumavky.

4. Vysušení křemíkové kolonky. Kolonka byla se vzorkem centrifugována po dobu 1 min při 11,000 x g. Tím bylo docíleno odstranění zbytků promývacího pufru, který by mohl kontaminovat výslednou eluci a vzorek.

5. Eluce DNA. Kolonka byla umístěna do nové 1,5 ml zkumavky a na membránu kolonky bylo naneseno 30 µl elučního pufru NE. Kolonka byla inkubována 1 min při pokojové teplotě a následně byla centrifugována o dobu 1 min při 11,000 x g. U takto připraveného vzorku byla stanovena koncentrace DNA pomocí Nanodropu.

4.2.2.5 Amplifikace vybraných úseků

U přečištěných produktů bylo následně provedeno druhé kolo amplifikace s kombinací primerů „CDS/F-CDS/R“, tedy pro kódující oblast daného genu (*SDR 5*). PCR reakce obsahovala stejné reagensie a opisovala stejný postup jako v případě prvního PCR ([viz 4.2.2.2](#)).

Amplifikované úseky byly opět ověřeny agarosovou elektroforézou, zda jsou produkty přítomny a odpovídají teoretické délce. Elektroforéza proběhla stejně dle již popsaného návodu ([viz 4.2.2.3](#)). Poté byly produkty přečištěny.

4.2.2.6 Enzymatická restrikce

Před samotnou ligací bylo nutné provést štěpení pomocí restrikčních endonukleáz, k našemu štěpení byly vybrány restriktasy EcoRI-HF a XbaI (jejichž cílová místa byla přidána pomocí primerů). Ke štěpení byly připraveny následující reakce v celkovém objemu 10 μ l:

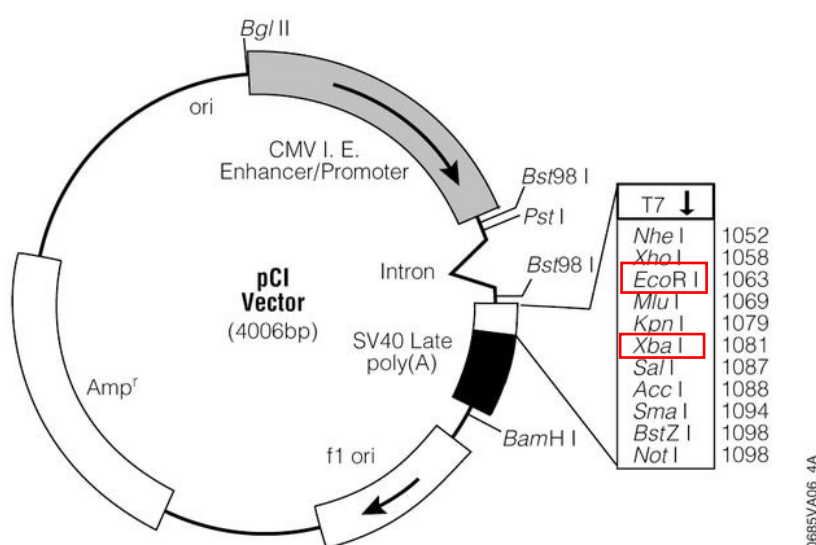
Tabulka 8 - Směs k enzymatické restrikci

	PCR Produkty [μ l]	Plasmid pCI [μ l]
Smartcut pufr	1	1
EcoRI-HF (G \downarrow AATTC)	0,5	0,5
XbaI (T \downarrow CTAGA)	0,5	0,5
ddH ₂ O	2	-
Templát	6	8

Připravené směsi byly inkubovány po dobu 2 hodin při teplotě 37 °C, následovala inaktivace enzymů při 65 °C po dobu 20 min a závěrečné zahřátí na 80 °C po dobu 3 min. Pro výpočet množství ligovaného inzertu byla u vzorků stanovena koncentrace a takto upravené vzorky byly připraveny k následné ligaci do vektoru pCI a transformaci do kompetentních buněk *E.coli* TOP10.

4.2.2.7 Ligace inzertu do vektoru pCI

Klonování genu vybrané reductasy bylo provedeno do expresního vektoru pCI. Jedná se o plasmid pro expresi v savčích buňkách o celkové délce 4006 bp, který obsahuje gen kódující rezistenci k antibiotiku Ampicilin, díky kterému je zajištěna jednoduchá následná selekce kolonií v *E. coli*, CMV promotor a klonovací místo s rozpoznávacími sekvencemi pro různé restriční endonukleasy.



Obrázek 11 - Schéma pCI vektoru (převzato z: (39)).

K inserci štěpených produktů do pracovního vektoru pCI byla připravena směs pro vzorky + 1x kontrola bez templátu. Do směsi byly přidány 2 μ l štěpeného plasmidu pCI, 1 μ l T4 DNA ligasy, 1 μ l ligačního pufru a 6 μ l PCR produktů. Takto připravená reakce byla inkubována 1 h při 16 °C.

Množství vkládaného inzertu bylo vypočteno na základě rovnice (40) :

$$\text{množství inzertu (v ng)} = \text{velikost inzertu (v kb)} \times \text{množství vektoru (v kb)} / \text{velikost vektoru (v kb)}$$

4.2.2.8 Transformace teplotním šokem

K transformaci zaligovaného plasmidu byly použity kompetentní buňky *E.Coli* TOP10 uchovávané při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Buňky byly po vyndání ponechány na ledu, suspenzi nijak nezahříváme, nevortexujeme ani nepipetujeme, aby nedošlo k poškození buněk, které jsou velmi náchylné k mechanickému poškození, pracujeme v sterilním prostředí se sterilizovanými nástroji, špičkami.

K 250 μl buněčné suspenze byl přidán celý obsah ligační směsi (10 μl) a směs byla promíchána krouživými pohyby pipetovací špičkou. Buňky byly poté inkubovány 30 min na ledu. Teplotní šok byl proveden umístěním zkumavek s buňkami na 90 s do $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, následně byly buňky okamžitě přemístěny na led a inkubovány 1-2 min. K buňkám byl přidán 1 ml předem zahřátého SOC media a suspenze byla inkubována na třepačce 60 minut při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 220 rpm. Následně byly buněčné suspenze s plazmidem rozetřeny na předehřáté plotny s LB agarem obsahujícím ampicilin.

4.2.3 Příprava kolonií nesoucí transformovaný plasmid

4.2.3.1 Příprava kultivačních medií a zaočkování transformovaných buněk

Ke kultivaci kompetentních buněk obsahující plasmid s genem zájmu bylo použito pevné LB médium s obsahem agaru. Bylo připraveno 300 ml směsi rozpuštěním 10,5 g suché směsi LB média s agarem v destilované vodě. Pro zaočkování potenciálně narostlých kolonií bylo poté připraveno i tekuté LB médium, které vzniklo rozpuštěním 1,55 g média v 100 ml destilované vody. Obě média byla před použitím sterilizována v autoklávu při $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Po vychlazení medií bylo do roztoku přidáno antibiotikum Ampicilin v konečné koncentraci 25 mg/ml, aby byla docílena selekce bakterií. V takovém případě dojde k růstu pouze těch buněk, které obsahují zaligovaný plasmid, jenž obsahuje gen kódující rezistenci k tomuto antibiotiku.

Do Petriho misek byla poté tato směs nalita v tloušťce cca 0,5 cm a ponechána ztuhnout. Na takto připravené misky byla pak rozetřena kultura buněk *E.Coli* pomocí sterilní hokejky.

Byly připraveny 2 plotny pro každý vzorek, 1x 100 µl suspenze, 1 x veškerý obsah suspenze + 1 x kontrola. Plotny byly umístěny do inkubátoru na 37 °C přes noc do druhého dne.

4.2.3.2 Colony PCR

Pro selekci transformovaného plasmidu s cílovým genem (*SDR5*) byla provedena „Colony PCR“ a následná agarosová elektroforéza. Jedná se o modifikaci PCR, kde jsou jako templát použity vykultivované kolonie. Na zobrazeném gelu by pak měly být opět amplifikovány produkty v požadované délce bp. Buňky z kolonií byly sterilní špičkou vypíchnuty, jemně resuspendovány v 10 µl H₂O. Tato směs byla zahřáta na 95 °C, krátce zchlazena a poté bylo přidáno 10 µl mastermixu pro Colony PCR (tabulka 9).

Tabulka 9 - Mastermix pro Colony PCR

Colony PCR [µl]	
Reakční pufr	4
dNTPs	0,5
Primery CDS/F + CDS/R	0,5 + 0,5
Taq polymerasa	0,1
H ₂ O	4,4
Templát	10
Celkem	20

Po dokončení amplifikace byl připraven 1% gel pro agarosovou elektroforézu ([viz 4.2.2.3](#)). Po vizualizaci gelu UV lampou byly vybrány ty vzorky, které obsahovaly produkty požadované délky, a tedy u nich proběhla transformace úspěšně.

Příslušné kolonie byly označeny a sterilní špičkou vypíchnuty do 3 ml tekutého LB média obsahujícího ampicilin, buňky byly kultivovány do druhého dne na mechanické třepačce při 37 °C a 220 rpm.

4.2.4 Heterologní exprese plasmidu nesoucí gen zájmu

4.2.4.1 Izolace plasmidové DNA

Izolace namnoženého plasmidu z kultury kompetentních buněk *E. Coli* byla provedena komerčním kitem NucleoSpin Plasmid. Bylo postupováno dle přiloženého postupu.

- 1. Centrifugace kultury.** Buňky byly zbaveny supernatantu centrifugací při 11,000 x g, 30 s.
- 2. Lýza buněk.** Peleta buněk byla resuspendována v 250 μ l pufru (A1) tak, aby byla plně rozptýlena v roztoku před přidáním lyzačního pufru. K resuspendované kultuře bylo přidáno 250 μ l lyzačního pufru (A2) a směs byla promíchána překlápěním 6-8x a inkubována 5 min při pokojové teplotě. Směs intenzivně nemícháme, aby nedošlo k poškození genomové DNA, a tím kontaminaci požadovaných plasmidů. Nakonec bylo přidáno 300 μ l (A3) pro vysrážení proteinů.
- 3. Odstranění precipitátu.** Směs byla centrifugována 5-10 min při 11,000 x g, pokud lyzát není projasněný můžeme tento postup opakovat.
- 4. Vazba DNA na silikátovou kolonku.** Kolonka přiložená v kitu byla umístěna do mikrozkušavky a bylo nanášeno až 750 μ l lyzátu. Následně byla provedena centrifugace při 11,000 x g, 1 min. Supernatant byl odstraněn.
- 5. Promývání silikátové kolonky.** Membrána kolonky byla promyta nejprve 500 μ l AW promývacího pufru a centrifugována po dobu 1 min při 11,000 x g, supernatant byl odstraněn a postup byl opakován s pufrem s obsahem etanolu (A4).
- 6. Sušení silikátové kolonky.** Prázdna kolonka byla centrifugována 2 min při 11,000 x g.
- 7. Eluce plasmidové DNA.** Eluce byla provedena elučním pufrem (AE), který byl nanášen v objemu 30 μ l na membránu kolonky. Následně byla kolonka inkubována 1 min a centrifugována po dobu 1 min při 11,000 x g.

U vzorku plasmidové DNA byla stanovena spektrofotometricky koncentrace a byla uchována při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

4.2.4.2 OneTaq PCR

Ověření přítomnosti zaklonovaného plasmidu obsahující gen zájmu bylo provedeno pomocí OneTaq PCR v celkovém objemu 25 μ l. Jako templát byla použita izolovaná plasmidová DNA z kultury kompetentních buněk. Dle počtu vzorků byl připraven mastermix. K separaci a vizualizaci daného úseku byla opět použita agarosová elektroforéza dle obdobného postupu ([viz 4.2.2.3](#)).

Tabulka 10 - OneTaq PCR.

OneTaq Quick-Load polymerase kit	1x vzorek [μ l]
5 x OneTaq Quick-Load pufr	5
10 mM dNTPs	0,5
10 μ M F + R primer	0,5 + 0,5
OneTaq Quick-Load DNA Polymerasa	0,125
Template DNA	1
ddH ₂ O	17,375

4.2.4.3 Příprava vzorku k sekvenaci

K výslednému ověření zaklonovaného úseku bylo nutné nechat vzorky tzv. osekvenovat. Sekvence byla provedena komerčně v Eurofins Genomics (<https://eurofinsgenomics.eu/>) Sangerovou metodou.

K úspěšné sekvenaci je nutné, aby byl vzorek připraven alespoň v koncentraci 100 ng/ μ l. Pokud tato podmínka není dodržena, může dojít k nekompletní sekvenaci, či k vzniku tzv. šumu v rámci sekvence, který ji může učinit nečitelnou.

Z připraveného vzorku izolovaného plasmidu bylo odebráno 5 μ l, ke kterému bylo přidáno 5 μ l primeru (CDS/F pro gen *SDR5*). K tomuto vzorku byl připraven druhý, obsahující 5 μ l primeru pro pCI/F plasmid. Vzorky byly opatřeny štítky a odeslány.

4.2.4.4 Příprava plasmidu ve vysokém počtu kopií

Po úspěšné sekvenaci bylo vhodné pro další experimentální práci připravit požadovaný plasmid ve vyšší koncentraci. Izolovaná plasmidová DNA (5 μ l) byla transformována do kompetentních buněk *E. Coli* pomocí metody teplotního šoku ([viz 4.2.3.3](#)). Transformované buňky, které byly inkubovány v SOC mediu, byly poté zaočkovány do 50 ml tekutého LB média s obsahem ampicilinu (25 mg/ml). Kultura byla inkubována do druhého dne při 37 °C a 220 rpm.

Následující den byla kultura stažena a centrifugována při 2000 x g, 5 min. Došlo k oddělení kultury a supernatantu, který byl odstraněn do příslušného odpadu. K izolaci plasmidové DNA byl použit ZymoPURE II Plasmid Midiprep kit. Bylo postupováno dle následujícího návodu přiloženého v kitu.

1. Resuspendace buněčné kultury. Kultura byla resuspendována v 8 ml chlazeného ZymoPure™ pufru (P1) vortexováním či pipetováním.

2. Lýza buněčné kultury. K homogenní směsi buněk bylo přidáno 8 ml lyzačního pufru ZymoPure™ (P2). Směs byla promíchána překlápěním 5-6x a nechána inkubovat 2-3 min při laboratorní teplotě. Poté bylo přidáno 8 ml ZymoPure™ pufru P3 a směs byla promíchána opět překlápěním, tak abychom zabránili poškození genomické DNA z buněk.

3. Filtrace lyzátu a odstranění balastních látek. Lyzovaná směs byla nanášena na filtr stříkačky přiložené v kitu (nutné ujistit se, zda šroubovací ventil je v tomto kroku uzavřen). Směs byla ponechána 5-8 min odstát, aby došlo k oddělení tekutého lyzátu a balastních látek, které jsou na povrchu tekutiny. Poté byl do stříkačky umístěn píst a do čisté 50 ml falkony byl lyzát přefiltrován. Zbytek balastních látek byl odstraněn a umístěn do odpovídajícího odpadu.

5. Vazba DNA na kolonku. K filtrátu bylo přidáno 8 ml ZymoPure™ binding (pufr vázající DNA na kolonku) pufru a směs byla jemně promíchána překlápěním. Do nové 50 ml falkony byla umístěna kolonka přiložená v kitu, na tu bylo nanášeno 10 ml filtrátu a byla provedena centrifugace při 500 x g 2 min. Byl odstraněn supernatant a opakován postup, dokud nebylo nanášeno veškeré množství vzorku.

6. Promývání kolonky. Na kolonu byly naneseny 2 ml promývacího pufru č. 1. Byla provedena centrifugace při 500 x g 5 min. Celý proces byl zopakován 2x s promývacím pufrům č. 2 s obsahem etanolu.

7. Eluce. Kolonka byla přenesena z falkony do mikrozkuhavky a centrifugována 2 min při 11.000 x g, tím byly odstraněny zbytky promývacího pufru. Poté bylo na kolonu naneseno 200 µl elučního pufru a byla inkubována cca 2 min. Eluce byla provedena centrifugací po dobu 1 min při 11.000 x g.

4.2.4.1 Kultivace a pasážování buněčné linie SW480

Pasážování buněk

Ke zkušební heterologní expresi genu zájmu zaklonovaného do pracovního vektoru pCI byla použita buněčná linie SW480 kvůli optimalizované transfekci těchto buněk využívané pro jiné účely. Jedná se adherentní buňky lidského adenokarcinomu tlustého střeva (3-4 nádorové stádium) rostoucí na povrchu kultivační lahve/mikrotitrační destičky. Pasážování buněk je klíčové k udržení buněk v požadované koncentraci tak, aby nedocházelo k „přerůstání“ buněk a jejich vzájemnému kontaktu vedoucí k inhibici reakce.

Ke kultivaci bylo použito DMEM médium, s obsahem 10% FBS séra (*Fetal Bovine serum*), s přísávkem HEPES (pufrující roztok) a antibiotik penicilinu a streptomycinu. Pasážování buněk bylo prováděno 2x týdně. Před manipulací s buňkami bylo nutné zahřát PBS, médium a trypsin ve vodní lázni na 37 °C, připravit kulturu do laminárního boxu ošetřeného minimálně 20 min UV zářením.

Jako první bylo sterilně odsáto staré kultivační médium a buňky byly opláchnuty 2 x 6 ml PBS. K oddělení kultury od kultivační lahve bylo přidáno 1,5 ml trypsinu. Směs byla inkubována po dobu 5 minut při 37 °C. Kultura byla zkontrolována pod mikroskopem, zda opravdu došlo k oddělení buněk od povrchu a bylo přidáno 5 ml kultivačního média, čímž se zastavilo další štěpení trypsinem. Kultura byla promíchána a byl odebrán cca 1 ml kultury do nové kultivační lahve doplněné 12 ml média. Takto připravená pasáž byla popsána a uložena do inkubátoru.

Pro stanovení počtu buněk v kultuře byla použita Bürkerova komůrka. Byl stanoven počet buněk v 9 velkých čtvercích a počet v 1 ml dopočítán dle vzorce:

$$c = \frac{x}{9} \cdot z \cdot 10^4$$

C = počet buněk v 1 ml suspenze

x/9 = počet v jednom čtverci

z = ředění

Příklad výpočtu z rovnice:

Stanovený počet buněk v 9 čtvercích Bürkerovy komůrky = 52,63.

$$c = \frac{52,63}{9} \cdot 1 \cdot 10^4$$

$$c = \mathbf{585\ 000\ c/ml}$$

Pro následnou transfekci byly buňky nasazeny do 24 jamkové destičky o objemu 500 μ l a koncentraci buněk 50 000 buněk na jamku. Destička byla označena a umístěna do inkubátoru (37 °C). Potřebný objem byl vypočten dle vzorce:

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1}$$

V₁ = objem buněk nutný k transfekci

C₂ = počet buněk na 1 ml nutný k transfekci

V₂ = celkový objem vzorku (např. 14 ml pro 24 j. destičku)

C₁ = koncentrace buněk po výpočtu z Bürkerovy komůrky

4.2.4.2 Transfekce

Ke zkušební transfekci byly připraveny 2 sady o 4 jamkách buněčné kultury, kde v první sadě proběhla transfekce kontrolního plasmidu s GFP a v druhé plasmidu *pCI* s genem *SDR5*. Plasmid s *GFP* (*green fluorescein protein*) byl použit k ověření účinnosti transfekce, u kterého v případě úspěšné transfekce pozorujeme pod fluorescenčním mikroskopem fluorescenci. Jako

transfekční činidlo byl použit lipofectamin. Pro transfekci bylo činidlo lipofectamin naředěno v Opti-MEM médiu (25 μ l + 0,75 μ l) pro příslušný počet jamek. Obdobně DNA (Plasmid obsahující *SDR5/GFP* o koncentraci 500 ng/ μ l) byla naředěna v Opti-MEM médiu a byl přidán reagent P3000 určený pro transfekci (25 μ l + 1 μ l + 1 μ l). Směs činidla a rozpuštěné DNA byla smíchána v poměru 1:1 (25 μ l + 25 μ l) a inkubována 15 min při laboratorní teplotě.

Následně byla směs jemně nakapána na kultivované buňky SW480 na mikrotitrační destičce, u kterých bylo předem odsáto médium s obsahem FBS séra a nahrazeno 450 μ l média bez séra. Destička byla umístěna do inkubátoru (37 °C) a buňky byly kultivovány 2 dny. Průběžně byla kontrolována eventuální přítomnost fluorescence u buněk transfekovaných genem *GFP*. Poslední den byly buňky sklizeny a dále zpracovány.

4.2.4.3 Příprava buněčného lyzátu a stanovení bílkovin metodou BCA

Složení použitých pufrů

- Lyzační pufr s obsahem inhibitorů proteas: 20 mM Tris-HCl/ pH 7.5/ Inhibitory PMSF
- TBST – 8,77g NaCl/ 3ml Tween 20/ 100 ml TRIS

Izolace proteinu

Z transfekovaných jamek bylo odsáto médium a do každé jamky bylo přidáno 50 μ l lyzačního pufru s inhibitory proteas. Po dvou minutách inkubace na ledu byly buňky seškrabány a postupně přeneseny s veškerým lyzačním pufrům do mikrozkušavky, dále byly vzorky inkubovány na ledu 30 min. Homogenizace lyzátu byla provedena pomocí injekční stříkačky. Homogenizát byl centrifugován 10 min při 13,000 x g a 4 °C a následně byl odebrán supernatant pro další práci.

Stanovení proteinů metodou BCA

Stanovení bílkovin bylo provedeno pomocí BCA metody, která je založena na reakci proteinů a Cu^{2+} v alkalickém prostředí. Měď ve formě Cu^{1+} reaguje v pH 10 s bicinchoninovou kyselinou a vytváří modrofialový komplex, u kterého můžeme stanovit absorbanci při 562 nm. Intenzita zbarvení je poté přímo úměrná množství proteinu ve vzorku.

K sestavení kalibrační křivky byl použit 0,2 % BSA standard (2000 µg/ml) naředěný 1:1 na výchozí koncentraci 1000 µg/ml (0,1 %).

Tabulka 11 - Kalibrační křivka – BCA.

	Výsledná koncentrace BSA [µg/ml]	Objem 0,1 % BSA [µl]	Objem des. H ₂ O [µl]
1	0	0	100
2	200	20	80
3	400	40	60
4	600	60	40
5	800	80	20
6	1000	100	0

Vzorky byly připraveny ředěním 20x a 10x. Takto připravené vzorky byly napipetovány do mikrotitrační destičky v objemu 10 µl a bylo přidáno 200 µl pracovního roztoku, který byl připraven smícháním roztoku A (NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH) a roztoku B (4% CuSO₄.6 H₂O) v poměru 50:1. Destička byla inkubována 30 min při 37 °C a následně bylo provedeno spektrofotometrické stanovení při 562 nm.

4.2.4.4 Ověření transfekce pomocí metody dot blot

Ověření transfekce bylo provedeno pomocí imunodetekční metody dot blot. Jedná se o variaci western blotu, jenž nezahrnuje elektroforetickou separaci proteinů, ale přímé nanesení denaturovaných vzorků na nitrocelulóзовou či PVDF membránu a jejich následnou detekci pomocí protilátek.

Před nanesením vzorků byla membrána kondicionována redestilovanou vodou a následně byly naneseny vzorky v různých koncentracích, minimální koncentrace by měla být 10 µg/µl. Po zaschnutí vzorků byla membrána blokována 2 h 5% roztokem mléka v 0,05 % TBST pufru. Mléko bylo slito a membrána osušena na papíře. Následovala inkubace přes noc s primární protilátkou anti-His tag. Druhý den byla primární protilátka odpipetována a membrána byla promývána TBST pufrem (4x15 min). Po oplachu membrány byla provedena 1h inkubace se sekundární protilátkou s křenovou peroxidasou. Po uplynutí doby byla membrána opět promyta TBST pufrem (4x15 min). Pro chemiluminiscenční detekci byl použit roztok

Amersham ECL Prime Western Blotting detection reagent – A (roztok luminolu) + B (roztok peroxidu) v poměru 1:1. Membrána byla rovnoměrně roztokem pokryta a inkubována ve tmě po dobu 5 min. Následná detekce byla provedena pomocí chemiluminiscenčního systému Uvitec Alliance Q9 Advanced.

4.2.5 Statistika

Změny exprese vybraných genů byly počítány v MS Excel komparativní metodou (viz [4.2.1.4](#)) na základě získaných hodnot Ct. Hodnoty byly normalizovány vůči referenčnímu GAPDH a dále byly hodnoty relativně porovnávány k hodnotám u citlivého kmene. Statisticky byly hodnoty zpracovány v programu GraphPad Prism 9.1.0 pomocí nepárového mnohonásobného T-testu bez vzájemné korekce. Za statisticky významné byly považovány rozdíly hodnot od hladiny významnosti $P \leq 0,05$.

Obdržené sekvence byly ve dvou dostupných formátech-textovém, který obsahoval čistou sekvenci a formátu „ab1“ přímo ze sekvenátoru. Sekvence byla vytažena z formátu „ab1“ a zkontrolována.

5 Výsledky

5.1 Izolace RNA

Izolace byla opakována u dvou sad vzorků, u obou bylo dosaženo izolace přibližně stejného množství RNA s obdobnou čistotou, hodnoty koncentrací byly stanoveny spektrofotometricky pomocí Nanodropu.

Tabulka 12 - Výsledky izolace RNA fenol-chloroformovou metodou.

Vzorky	ng/μl	2000 ng (μl)	čistota		
			H ₂ O	260/280	260/230
ISEM4	361,4	5,5	2,5	1,98	2,1
ISEM5	1485,9	1,3	6,7	2,07	1,6
ISEM6	787,4	2,5	5,5	2,06	1,72
ISEF4	1522,0	1,3	6,7	2,08	1,7
ISEF5	2316,5	0,9	7,1	2,08	2,23
WRM4	855,5	2,3	5,7	2,05	1,34
WRM5	1000,8	2	6	2,04	0,96
WRM6	851,6	2,3	5,7	2,08	1,69
WRF4	2434,1	0,8	7,2	2,06	2,12
WRF5	2720,0	0,7	7,3	2,03	1,9
WRF6	1948,4	1	7	2,09	2,15
IREM4	683,7	2,9	5,1	2,01	1,85
IREM5	205,3	9,7	0	1,94	1,98
IREM6	582,2	3,4	4,6	1,91	1,67
IREF4	2080,7	1	7	2,08	1,88
IREF5	671,0	3	5	1,97	1,73
IREF6	1413,5	1,4	6,6	2,08	1,84

Tabulka obsahuje údaje o výtěžku RNA v ng/ul, množství vzorku odpovídající 2000 ng (pro RT), množství vody pro další reakci a informace o čistotě. (označení vzorků: kmen dle rezistence + M = male, F = female)

Standardně u samičích (F) vzorku bylo izolováno větší množství RNA, což vychází ze samotné anatomie jedinců, kde samičky rodu *Haemonchus contortus* jsou robustnější. U všech vzorků se poměr absorbance 260/280 nm a 260/230 nm blíží hodnotě 2, což poukazuje na vysokou čistotu a kvalitu extrakce bez kontaminace proteiny.

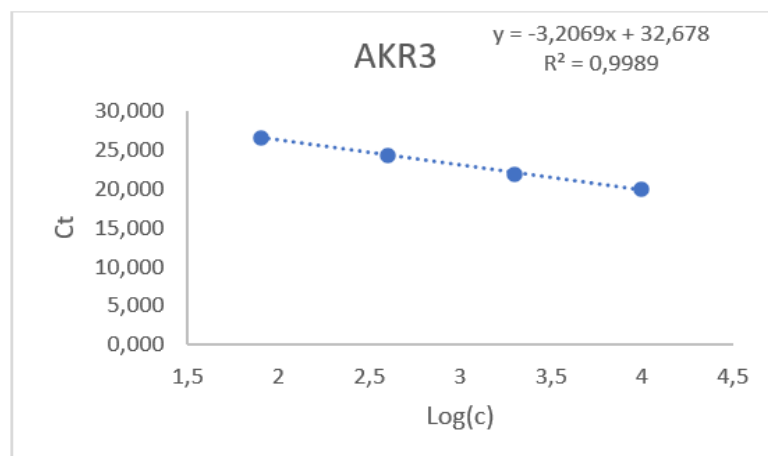
5.2 Výsledky a analýza genové exprese

5.2.1 Stanovení a výpočet účinnosti primerů

Před použitím navržených primerů je důležité stanovit účinnost, ta byla stanovena dle návodu ([viz 4.2.1.4](#)). Vyhodnocení dat z kvantitativní PCR bylo provedeno pomocí výpočtů v programu MS Excel. Hodnoty Ct z dané amplifikace byly získány z programu jako čistá data, průměrné hodnoty duplikátů byly zaneseny do grafu s lineární regresí. V ideálním případě by se efektivita použitých primerů měla blížit k hodnotě 1 (100 %).

Tabulka 13 - Hodnoty Ct – stanovení účinnosti.

Vzorek	Průměrné hodnoty Ct
1	19,94
2	21,95
3	24,33
4	26,62



Obrázek 12 - Grafické znázornění výpočtu efektivity pro primery genu AKR3.

Hodnoty lineární regrese byly použity k výpočtu účinnosti dle vzorce:

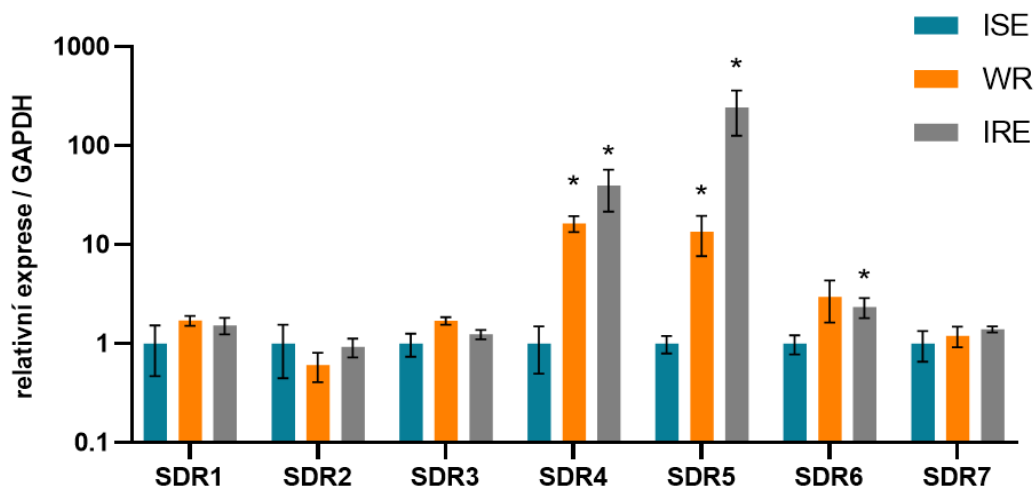
$$eff = 10^{\frac{1}{-3,2069}} - 1$$

$$eff = 105\%$$

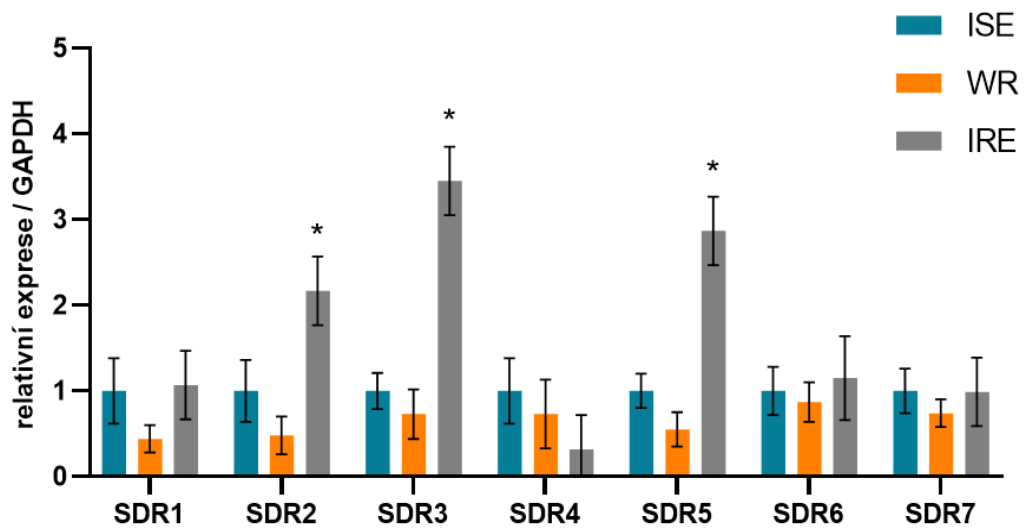
5.2.2 Zpracování a vyhodnocení dat genové exprese

V rámci stanovení genové exprese vybraných genů *AKR* a *SDR* bylo provedeno kvantitativní stanovení pomocí metody *qPCR*. Vyhodnocení dat bylo provedeno na základě komparativní metody s následnou úpravou v programu MS Excel a GraphPad.

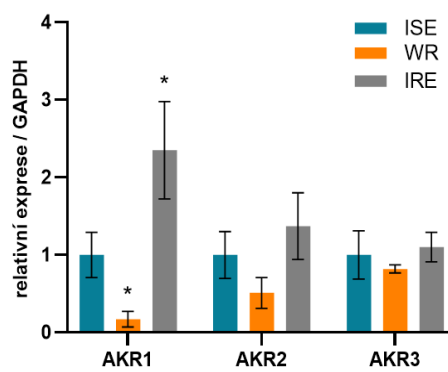
Srovnávány byly hladiny genové exprese zástupců tří kmenů *H. contortus* (ISE, IRE, WR) a to s důrazem na kmen IRE (kmen rezistentní na benzimidazolová anthelmintika). Pro další experimentální práci byly sledovány hladiny genů se zvýšenou hodnotou, poukazující na vyšší účast na metabolismu léčiva a jeho rychlejší eliminaci. Signifikantně zvýšené hladiny u obou pohlaví byly zaznamenány u genu *SDR5* (obr. 13 a 14), který byl vybrán pro klonování. Pro další práci by bylo vhodné zvažovat i využití genu *AKR1*, u kterého byla také vyšší exprese u obou pohlaví kmene IRE (obr. 15 a 16).



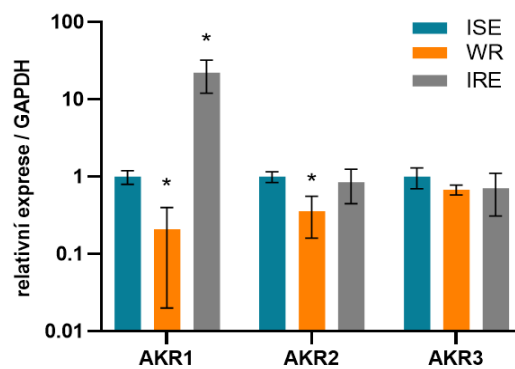
Obrázek 13 - Graficky zpracované výsledky genové exprese – geny *SDR* – kmene ISE, IRE, WR Female.



Obrázek 14 - Graficky zpracované výsledky genové exprese – geny SDR – kmeny ISE, IRE, WR Male.



Obrázek 15 - Graficky zpracované výsledky genové exprese – geny AKR – kmeny ISE, IRE, WR Female.

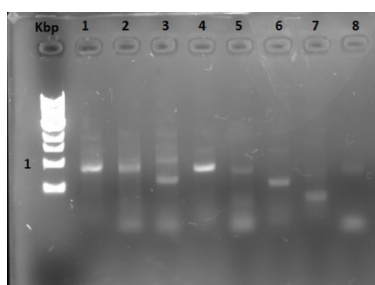


Obrázek 16 - Graficky zpracované výsledky genové exprese – geny AKR – kmeny ISE, IRE, WR Male.

5.3 Klonování

5.3.1 Výsledky přípravného klonování

Přípravné klonování zahrnovalo PCR reakce se všemi kombinacemi primerů tak, abychom zajistili amplifikaci CDS úseku mRNA pro gen *SDR5* a eventuálně vyloučili nefunkční kombinace primerů. Vzorky byly nanесeny na 1% agarosový gel a byla provedena elektroforéza, která nám umožnila vizualizaci daných úseků (Obr.17).



Obrázek 17 - Gelová elektroforéza – přípravné klonování.

V první jamce byl nanесen 1 kbp velký DNA marker. Od druhé jamky jsou nanесeny vzorky 1-8 pro gen *SDR5* s jednotlivými kombinacemi primerů (viz tab.č. 14).

Tabulka 14 - Tabulka s kombinacemi použitých primerů s délkou výsledného produktu

Kombinace použitých primerů	Délka produktu (bp)	
1	UF-UR	948
2	UF-CDS/R	885
3	UF-SDR/R	661
4	UR-CDS/F	896
5	CDS/F-CDS/R	868
6	SDR/R-CDS/F	616
7	SDR/F-CDS/R	316
8	SDR/F-UR	404

Na základě gelové elektroforézy byly vybrány pro další amplifikaci vzorky 1 (*SDR5* – UF-UR) a 5 (*SDR5* – CDS/F-CDS/R), u kterých proběhla amplifikace produktů v požadované délce 948 a 868 bp. U těchto vybraných vzorků byla provedena druhá amplifikace v podobě PCR s primery pro kódující oblast (CDS) mRNA požadovaného genu *SDR*. Tím bylo docíleno dostatečné namnožení požadovaného úseku pro další práci. Spolu s amplifikovaným fragmentem byl přečištěn i vzorek plasmidu *pCI*, který byl použit k expresi. U všech vzorků byla spektrofotometricky stanovena koncentrace.

Tabulka 15 - Koncentrace amplifikovaných vzorků k restričnímu štěpení.

Vzorek	Koncentrace [ng/μl]	Čistota (260/280)
Plasmid <i>pCI</i>	71,8	1,91
<i>SDR 5 (1)</i>	51,2	1,84

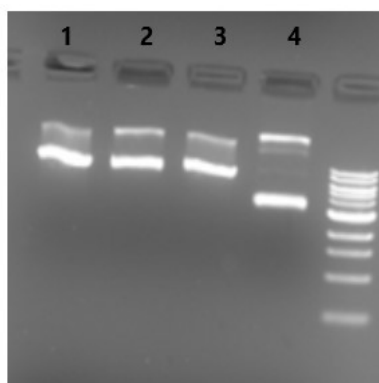
5.3.1.1 Enzymatická restrikce

Takto připravené vzorky bylo po přečištění možné štěpit RE, jejichž rozpoznávací místo bylo přidáno k sekvenci v rámci použitých CDS-primerů.

Koncentrace použitých vzorků po enzymatické restrikci:

Tabulka 16 Koncentrace štěpených vzorků.

Vzorek + použité RE	Koncentrace [ng/μl]	Čistota (260/280)
Plasmid <i>pCI</i> (EcoRI + Xba)	70,2	1,87
<i>SDR5 (1)</i> (EcoRI + Xba)	35,6	1,80

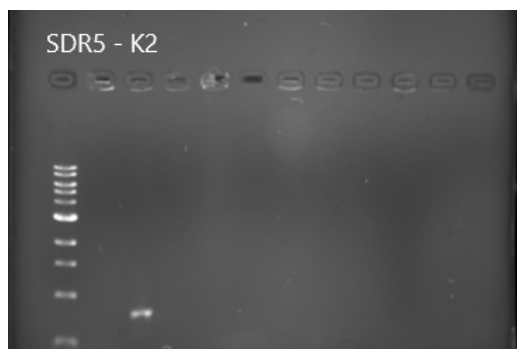


Obrázek 18 - Gel s produkty po kontrolní enzymatické restrikci plasmidu V první jamce je nanosen plasmid *pCI* neštěpený, v druhé jamce byl nanosen vzorek po reakci s EcoRI – HF, v jamce č. 3 byl nanosen vzorek po reakci s restriktasou XbaI. V jamce č. 4 je poté vzorek plasmidu po štěpení oběma restriktasama. Jamka č.5 – marker 1kbp.

Také bylo provedeno kontrolní štěpení použitého plasmidu, jednak oběma restričními enzymy dohromady, tak každým zvlášť pro případné odhalení nefunkčního enzymu. Po přečištění štěpených vzorků (amplifikovaného fragmentu a plasmidu) byla provedena ligace a transformace do kompetentních buněk *E. coli*.

5.3.1.2 Colony PCR

Po úspěšné transformaci a kultivaci kolonií nesoucí plasmid s cílovým genem byla provedena tzv. „colony PCR“. Jedná se o modifikaci PCR, která nám umožnila ověřit přítomnost transformovaného plasmidu ([viz 4.2.3.2](#)) rovnou v koloniích bez nutnosti čištění plasmidu. Vizualizace byla provedena agarosovou elektroforézou (Obr. 19).

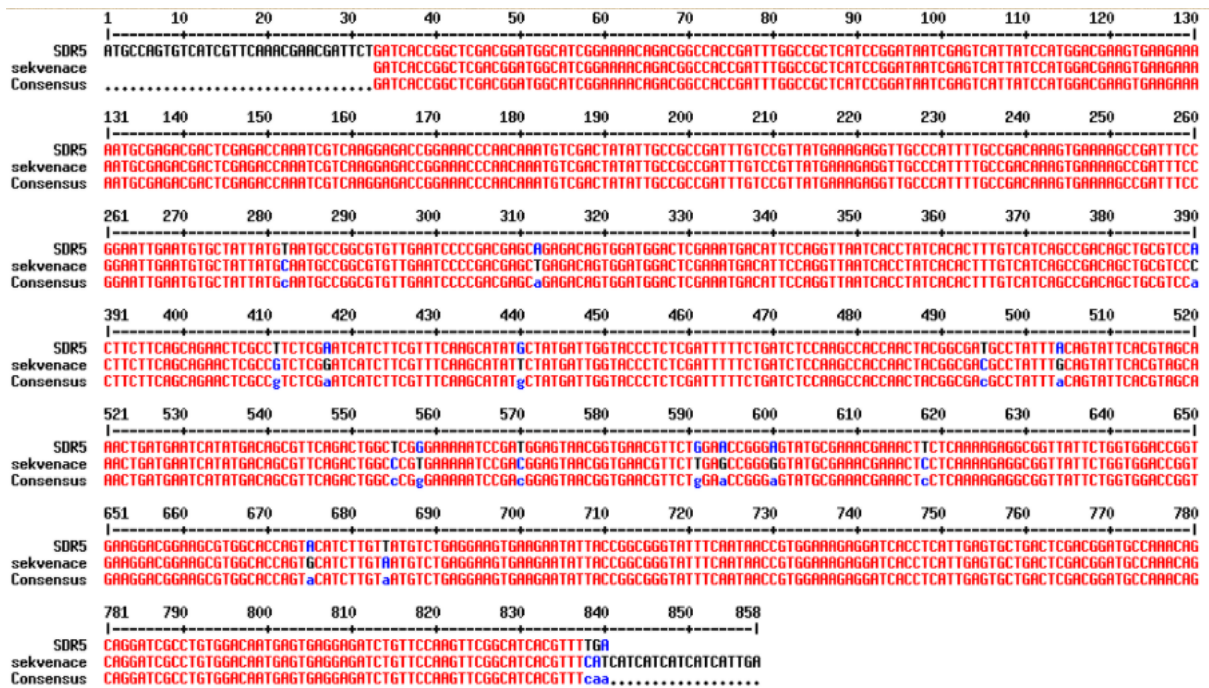


Obrázek 19 - Colony PCR – gel.

Na gelech je jasně vidět amplifikace u vzorku – kolonie č. 2 (*SDR5*) o délce 868 bp v porovnání k 1kbp dlouhému markeru. Tato kolonie byla zaočkována do 3 ml tekutého kultivačního média. Následující den byla provedena izolace plasmidu ([viz. 4.2.4.1](#)) a stanovení koncentrace.

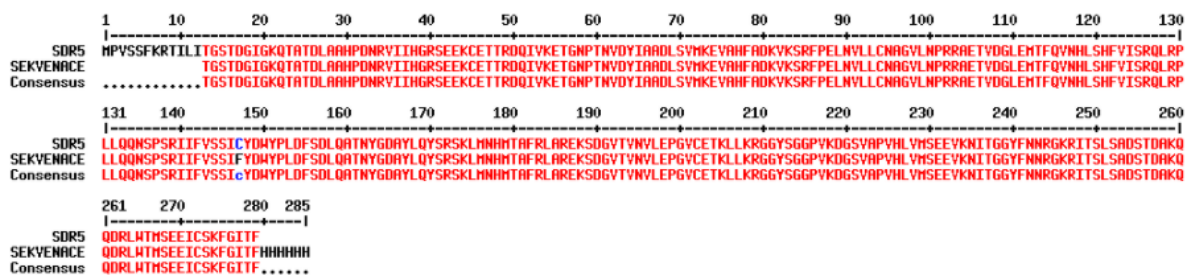
Tabulka 17 Výsledná koncentrace izolovaného plasmidu.

Vzorek	Koncentrace [ng/μl]	Čistota (260/280)
<i>SDR5</i> – K-2	113	1,83



Obrázek 22 - Výsledná sekvence genu SDR5 v porovnání s obdobným genem databáze.

Po získání čisté sekvence genu SDR5 bylo možné naši sekvenci porovnat se sekvencí v databázi, a provést tak ověření. Vidíme, že začátek nebyl úplně osekvenovaný (kvůli použití CDS_F primeru). Na konci vidíme sekvenci prodlouženou o odpovídající úsek kódující připojený His-tag (viz obr. 23). Rozdílně identifikované nukleotidy odpovídají sekvenční variabilitě a přítomnosti různých jednonukleotidových změn (*SNP*), které jsou u vlasovky poměrně časté (41).



Obrázek 23 - Translace nukleotidové sekvence do sekvence aminokyselinové.

Podíváme-li se na přeloženou sekvenci proteinu, vidíme, že většina těchto změn se v aminokyselinové sekvenci neprojevila díky degenerovanému genetickému kódu, a jsou tedy na třetí pozici kódujících tripletů. Jedinou pozorovanou změnou je mutace C147F. Na konci sekvence můžeme vidět již zmíněný připojený 6x His-tag.

Local query sequence

Protein Classification
 SDR family oxidoreductase (domain architecture ID 10143176)
 SDR (short-chain dehydrogenase/reductase) family NAD(P)-dependent oxidoreductase similar to human dehydrogenase/reductase SDR family member on chromosome X (DHRSX), a novel non-classical secretory protein associated with starvation induced autophagy, and to plant Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis

Graphical summary Zoom to residue level [show extra options](#)

List of domain hits

Name	Accession	Description	Interval	E-value
retinol-DH_like_SDR_c_like	cd05327	retinol dehydrogenase (retinol-DH). Light dependent Protochlorophyllide (Pchlide)...	7-265	3.16e-95

Obrázek 24 - Výsledek určení konzervativních úseků sekvence sekvenovaného genu SDR5.

Další potvrzující analýzu sekvence jsme provedli pomocí databáze *Conserved Domain* z portálu NCBI ([Home - Conserved Domains - NCBI \(nih.gov\)](http://Home - Conserved Domains - NCBI (nih.gov))), která určuje to, zda sekvence obsahuje potřebné konzervativní úseky a zda se tedy jedná opravdu o dehydrogenasu, což bylo potvrzeno nálezem typického Rossmannova motivu.

Motiv Rossmannova záhybu

```

1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
CBR1(H,Sapiens) M5SGIHVALVTGGNKIGLAIVRDL CRLFSGDVYLTRDVRGQA
DHRS3(H,Sapiens) M5SGIHVALVTGGNKIGLAIVRDL CRLFSGDVYLTRDVRGQA
DHRS7(H,Sapiens) M5SGIHVALVTGGNKIGLAIVRDL CRLFSGDVYLTRDVRGQA
SDR_(C,elegans) M5SGIHVALVTGGNKIGLAIVRDL CRLFSGDVYLTRDVRGQA
SDR_(S,ratt.) M5SGIHVALVTGGNKIGLAIVRDL CRLFSGDVYLTRDVRGQA
SDR5(H,co) M5SGIHVALVTGGNKIGLAIVRDL CRLFSGDVYLTRDVRGQA
SDR_(C,remanei) M5SGIHVALVTGGNKIGLAIVRDL CRLFSGDVYLTRDVRGQA
Consensus .....vvl.tg..GIG...a..la.....v!l.g.r.e..l..

131 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260
CBR1(H,Sapiens) IYVQQLQREGLSPRFHQI---DIDDLQSTRALRDLRKEYYGGLOVLYNNGGIAFKYADPTPFHTQREY---TAEVNFSTEDVYCTELPLI---KPGQRVYNSSTISYVRALKSCSPELQKFRSEITTEEL
DHRS3(H,Sapiens) IYVQQLQREGLSPRFHQI---DIDDLQSTRALRDLRKEYYGGLOVLYNNGGIAFKYADPTPFHTQREY---TAEVNFSTEDVYCTELPLI---KPGQRVYNSSTISYVRALKSCSPELQKFRSEITTEEL
DHRS7(H,Sapiens) IYVQQLQREGLSPRFHQI---DIDDLQSTRALRDLRKEYYGGLOVLYNNGGIAFKYADPTPFHTQREY---TAEVNFSTEDVYCTELPLI---KPGQRVYNSSTISYVRALKSCSPELQKFRSEITTEEL
SDR_(C,elegans) IYVQQLQREGLSPRFHQI---DIDDLQSTRALRDLRKEYYGGLOVLYNNGGIAFKYADPTPFHTQREY---TAEVNFSTEDVYCTELPLI---KPGQRVYNSSTISYVRALKSCSPELQKFRSEITTEEL
SDR_(S,ratt.) IYVQQLQREGLSPRFHQI---DIDDLQSTRALRDLRKEYYGGLOVLYNNGGIAFKYADPTPFHTQREY---TAEVNFSTEDVYCTELPLI---KPGQRVYNSSTISYVRALKSCSPELQKFRSEITTEEL
SDR5(H,co) IYVQQLQREGLSPRFHQI---DIDDLQSTRALRDLRKEYYGGLOVLYNNGGIAFKYADPTPFHTQREY---TAEVNFSTEDVYCTELPLI---KPGQRVYNSSTISYVRALKSCSPELQKFRSEITTEEL
SDR_(C,remanei) IYVQQLQREGLSPRFHQI---DIDDLQSTRALRDLRKEYYGGLOVLYNNGGIAFKYADPTPFHTQREY---TAEVNFSTEDVYCTELPLI---KPGQRVYNSSTISYVRALKSCSPELQKFRSEITTEEL
Consensus t...i.....v..d..d..s.....v..g.....lvnng.....#.....N..g.....IP.....g..!..sSII.....g..sk.....

261 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390
CBR1(H,Sapiens) VGLMNFYEDTKGVHAKGEPSSRYGVTKIGVTLSRIHARKLSEQRKQDKILLNACCPGAVRTOHAGPKATKSPEEGAETPYVALLLPPDREAGPHGQFVSEKRVQD
DHRS3(H,Sapiens) VGLMNFYEDTKGVHAKGEPSSRYGVTKIGVTLSRIHARKLSEQRKQDKILLNACCPGAVRTOHAGPKATKSPEEGAETPYVALLLPPDREAGPHGQFVSEKRVQD
DHRS7(H,Sapiens) VGLMNFYEDTKGVHAKGEPSSRYGVTKIGVTLSRIHARKLSEQRKQDKILLNACCPGAVRTOHAGPKATKSPEEGAETPYVALLLPPDREAGPHGQFVSEKRVQD
SDR_(C,elegans) VGLMNFYEDTKGVHAKGEPSSRYGVTKIGVTLSRIHARKLSEQRKQDKILLNACCPGAVRTOHAGPKATKSPEEGAETPYVALLLPPDREAGPHGQFVSEKRVQD
SDR_(S,ratt.) VGLMNFYEDTKGVHAKGEPSSRYGVTKIGVTLSRIHARKLSEQRKQDKILLNACCPGAVRTOHAGPKATKSPEEGAETPYVALLLPPDREAGPHGQFVSEKRVQD
SDR5(H,co) VGLMNFYEDTKGVHAKGEPSSRYGVTKIGVTLSRIHARKLSEQRKQDKILLNACCPGAVRTOHAGPKATKSPEEGAETPYVALLLPPDREAGPHGQFVSEKRVQD
SDR_(C,remanei) VGLMNFYEDTKGVHAKGEPSSRYGVTKIGVTLSRIHARKLSEQRKQDKILLNACCPGAVRTOHAGPKATKSPEEGAETPYVALLLPPDREAGPHGQFVSEKRVQD
Consensus ..l..l.....
    
```

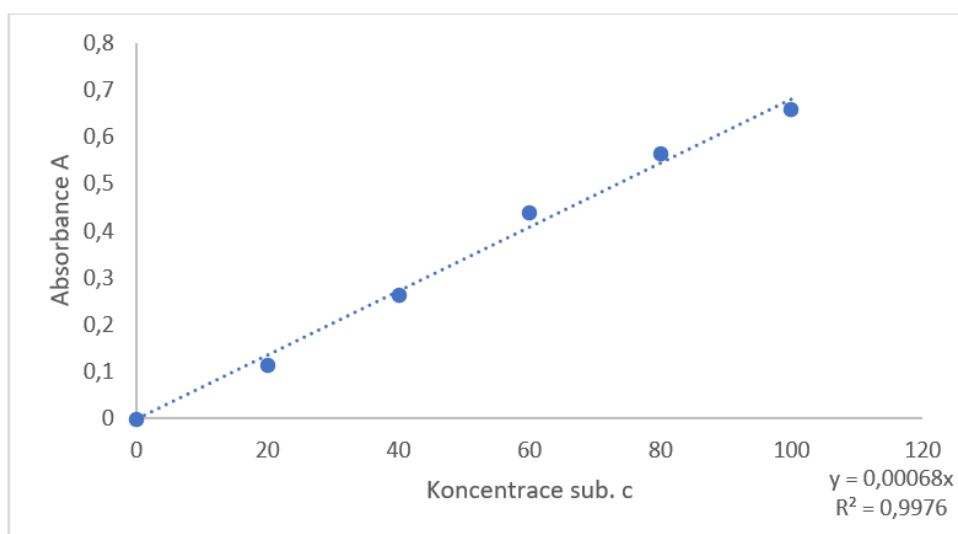
Obrázek 25 - Srovnání sekvence konzervativního motivu dalších SDR ze zástupců obdobné rodiny.

Při porovnání cílového genu přeloženého do proteinu s několika typickými zástupci této rodiny (např. lidské SDR a SDR *Caenorhabditis elegans/remanei*) vidíme několik vysoce konzervovaných motivů, jinak velmi variabilních sekvencí. Z katalytické tetřady typické pro dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (Asn-Ser-Tyr-Lys) vidíme pouze dvě velmi konzervované aminokyseliny, (Asn (N) a Ser (S) – označeny červeně), další dvě se u různých dehydrogenas liší.

5.3.2 Výsledky heterologní exprese

5.3.2.1 Výsledky stanovení proteinů metodou BCA

Pro první ověření a vyzkoušení exprese naklonované SDR5 byl plasmid společně s kontrolním plasmidem obsahujícím GFP transfekován do buněk SW480. Po 48 h byla úspěšnost transfekce potvrzena přítomností fluorescence v fluorescenčním mikroskopu. Koncentrace izolovaných proteinů byla stanovena metodou BCA.



Obrázek 26 - Kalibrační křivka – stanovení proteinů – BCA.

Na základě stanovených absorbancí byla sestavena kalibrační křivka, tj. závislost naměřené absorbance (A) na koncentraci substrátu (c). Křivka byla proložena lineární regresí a z rovnice byla vypočtena koncentrace ve stanovovaném vzorku.

Tabulka 18 - Výsledky naměřené absorbance – stanovení proteinů - BCA.

	20x	10x
1	0,19942	0,37882
2	0,18082	0,38242
3	0,17132	0,33182
4	0,19062	0,32862
\bar{x}	0,185545	0,35542

Příklad výpočtu z rovnice:

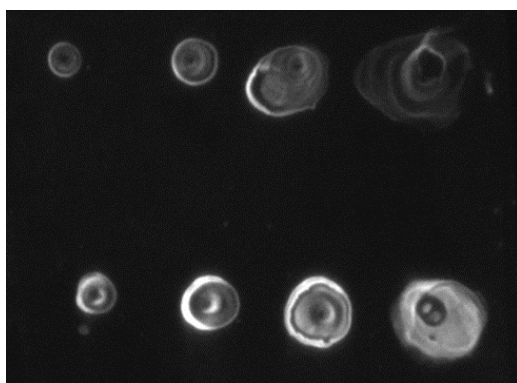
$$y = 0,00068x$$

$$x = \frac{0,00068}{0,185545}$$

$$x = 272,9 \cdot 20 = 5457,2 \mu\text{g/ml}$$

5.3.2.2 Výsledky ověření transfekce metodou Dot Blot

Kontrolní ověření přítomnosti exprimovaného proteinu z kultury SW480 bylo provedeno imunodetekční metodou dot blot, kde pomocí specifické anti-his tag protilátky byl detekován protein zájmu (*SDR5*) produkovaný buněčnou linií. Vzorky byly nanášeny od minimální koncentrace 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. U vzorku *SDR5* byla detekována zvýšená chemiluminiscence značící pravděpodobnou pozitivitu a úspěšnost transfekce. Pro další analýzu je nutná optimalizace postupu, příprava proteinu ve vyšší koncentraci a provést ověření znovu, ideálně celý postup western blotu včetně elektroforetické separace pro ověření i správné velikosti vznikajícího proteinu.



Obrázek 27 - Ověření přítomnosti proteinu pomocí metody Dot Blot. V prvním řádku byla nanášena kontrola GFP v objemu (2, 5, 10, 15 μl). V druhém řádku je protein zájmu *SDR5* (2, 5, 10, 15 μl).

6 Diskuse

Rezistence u *H. contortus* k benzimidazolovým a dalším preparátům je celosvětovým problémem spojeným s rozsáhlými parazitárními infekcemi hospodářských zvířat vlasovkou slezovou. Vzhledem k faktu, že anthelmintika stále patří k jediné možnosti úspěšné léčby, je studium mechanismu rezistence a vývoj farmak hlavním prostředkem k řešení.

V rámci České republiky proběhl pouze jeden výzkum zabývající se současnou situací rezistence u *H. Contortus* na farmách, a to pouze na kozích. Bylo sledováno celkem 24 farem se zaměřením na benzimidazolová anthelmintika a ivermektin. Rezistence proti benzimidazolovým preparátům, hodnocena především na základě *egg hatch testu*, byla potvrzena u 18 farem (75 %), přičemž úroveň rezistence byla u 4 farem hodnocena jako vysoká. Vedle rezistence na benzimidazolová anthelmintika byla sledována rezistence také na ivermektin, která byla potvrzena u 13 farem (54 %), z toho 8 farem bylo vyhodnocených jako vysoce rezistentních. Jedenáct farem (46 %) bylo zároveň vyhodnoceno jako rezistentní k benzimidazolovým preparátům i ivermektinu (42).

Bylo potvrzeno riziko rozvoje rezistence na anthelmintika spojené s chovem velkého počtu jedinců ve stádu a nedostatečným dodržováním opatření při léčbě anthelmintiky. Na většině farem nedocházelo k vážení jednotlivých zvířat ke stanovení účinné dávky anthelmintika a také pouze 14 (58 %) z dotazovaných chovatelů posílalo vzorky fekálií na další analýzu účinnosti léčiva. Bylo zjištěno že účinnost léčiva se v České republice po léčbě anthelmintiky běžně vůbec nesleduje. Studie zahrnovala i dotazník zaměřený na chovatele, farmáře. Bylo sledováno dosažené vzdělání farmářů a dosavadní zkušenosti s chovem, které mohou souviset rozvojem rezistence např. díky neodbornému zacházení s léčivy. Většina dotázaných chovatelů (věkový medián 45 let) dovršila pouze základního vzdělání, či vzdělání druhého stupně (71 %), počet chovatelů se vzděláním v zemědělském oboru byl pouze 33 %. Spolu s Českou republikou sdílí problém s lékovou rezistencí u *H. Contortus* i další evropské země (Slovenko, Dánsko, Francie, Švýcarsko) (42).

Studium mechanismu rezistence proti benzimidazolovým preparátům probíhá již po mnoho let a známou cílovou molekulou je β -tubulin, u které dochází k vzniku SNP (*Single nucleotide polymorphism*, 167, 198, 200). Změny vedou k snížené vazbě léčiva a k nízké afinitě benzimidazolových preparátů k cílové molekule (β -tubulin). Další mechanismy zahrnují např. zvýšenou eliminaci benzimidazolových preparátů u rezistentních kmenů (IRE) oproti citlivým

kmenům (ISE), a to díky zvýšeným hladinám biotransformačních enzymů u *H. contortus*, jako jsou právě AKR, SDR a jiné (1; 43).

Předchozí studie byly prováděny především na třech zástupcích této lékové skupiny, a to na albendozalu, ricobendazolu a flubendazolu. Právě redukce karbonylu pomocí karbonylreduktas (AKR, SDR), je hlavní cestou 1. biotransformační fáze xenobiotik, při které dochází k deaktivaci flubendazolu u *H. contortus*. Studie byly založeny na porovnání metabolismu těchto anthelmintik mezi kmeny ISE a IRE u samičích a samčích zástupců *H. contortus*. Byla provedena kultivace živých jedinců *ex vivo* s a bez anthelmintika, následně byly vzorky zpracovány a analyzovány pomocí HPLC/MS/MS, kde byly sledovány jednotlivé metabolity a jejich hladiny (1).

Studie potvrzují patrné rozdíly mezi metabolismem léčiva u samičích a samčích zástupců IRE kmenu, kde samičí jedinci dosahovali vyšší eliminace léčiva, než samčí a také celkově vyšší eliminace oproti citlivému kmenu ISE. V rámci 2. biotransformační fáze flubendazolu u *H. contortus* se účastní eliminace především mikrosomální UDP - glukosyltransferasy, což bylo potvrzeno na základě detekce vyššího množství glukosylovaných metabolitů u kmene IRE. Navíc byly taktéž potvrzeny zvýšené hladiny exprese UDP – glukosyltransferas v rámci rezistentního kmene IRE. Zvýšenou tvorbu redukovaného flubendazolu u rezistentních kmenů by také mohly objasnit i výsledky genové exprese v rámci této diplomové práce, kde byly zjištěny výrazně vyšší hladiny genu *SDR5* u samičích zástupců kmenu IRE a to mnohonásobně. Vyšší hladiny byly stanoveny také u genu *AKR1* obou pohlaví kmenu IRE (1; 43).

Porovnáním cest metabolismu jednotlivých léčiv u kmenu IRE a ISE se potvrdil nejen fakt, že aktivita/exprese enzymů u IRE kmenu je vyšší než u kmenu ISE, ale také že do eliminace jsou zapojeny jak enzymy 1. biotransformační fáze (oxidasy, reduktasy, hydrolasy), tak enzymy 2. biotransformační fáze (glykosidasy, acetylasy). Toto zjištění tedy potvrzuje, že na vzniku rezistence u *H. contortus* se podílí enzymy 1. i 2. biotransformační fáze, a poskytuje tak prostor pro další studie (1; 43).

Jakožto možné řešení zvýšené eliminace léčiva u *H. contortus* se jeví na základě stanovení enzymatických aktivit využití metabolických inhibitorů (např. menandion, pyridinkarboxaldehyd, naloxon aj.). Dosavadní experimentální práce (Vokřál a kol. 2012) dokládají důkazy o možném využití právě menandionu, či pyridinkarboxaldehydu, jakožto účinného inhibitoru reduktas v metabolismu flubendazolu u *H. contortus*. To dává prostor pro

vývoj nových farmak, která by prodloužila eliminaci flubendazolu, a tím tedy prodloužila i jeho působení (43).

Základem experimentální části této diplomové práce bylo po provedení izolace RNA, reverzní transkripce a následná analýza genové exprese pomocí *qPCR* u vybraných jedinců vlasovky slezové. Pro další experimentální práci byl vybrán gen *SDR5*, u kterého byla hodnota genové exprese významně zvýšena (obr. 13). Jednalo se o gen samičího zástupce *H. contortus* z kmene IRE (kmen rezistentní na benzimidazolová anthelmintika). Významným faktorem pro výběr genu byl fakt, že kmen IRE, u kterého byly zjištěny alterované hodnoty genové exprese genu *SDR5*, vznikl genetickým tlakem z kmene ISE (kmen citlivý na všechna anthelminitika), tudíž sdílí stejný genetický základ. Na rozdíl od kmene WR (kmen rezistentní na všechna anthelminitika), který byl připraven izolací z prostředí (White River, Jižní Afrika). Gen *SDR5* se podařilo amplifikovat ve velkém množství pomocí PCR reakce s příslušnými primery a následně zaklonovat do pracovního vectoru *pCI*. Plasmid byl namnožen v kompetentních buňkách *E. Coli* TOP10, díky čemuž bylo možné získat vysoký počet kopií připraveného plasmidu pro další studium a expresi rekombinantního genu *SDR5*.

7 Závěr

V rámci diplomové práce byla zpracována literární rešerše na dané téma, týkající se současného stavu haemonchóz, anthelmintik, biotransformací xenobiotik a vybraných enzymů ze superrodiny karbonyl-redukujících enzymů.

V experimentální části byl připraven plasmid nesoucí gen vybrané reductasy *SDR5*, a to pomocí molekulárně biologických metod (izolace RNA, reversní transkripce, *qPCR*, ligace do vektoru, transformace, namnožení a izolace plasmidu, ověření sekvenací, transfekce). Připravený plasmid s genem zájmu bude možné využít pro další studium karbonyl-redukujících enzymů, jakožto enzymů podílejících se na metabolismu anthelmintik.

8 Seznam použitých zkratek

- ABZ – Albendazol
- AKR – Aldoketoreduktasy
- BHP – Benigní hyperplazie prostaty
- BZ – Benzimidazoly
- CBR – *Carbonyl reductase*
- CDS – *Coding Sequence* – kódující sekvence genu
- CMV – Cytomegalovirus
- DEPC voda – Voda bez nukleáz, ošetřená diethyl pyrokarbonátem
- FLU – Flubendazol
- GABA – Gama-aminomáselná kyselina
- GAPDH – Glyceraldehyd 3-fosfát dehydrogenasa
- GFP – *Green fluorescent protein*, fluorescenční protein z medúz
- IRE – Kmen rezistentní na benzimidazolová anthelmintika
- ISE – Kmen citlivý na všechna anthelmintika
- LB medium – *Luria-Bertani* medium
- NADPH – Nikotinamidadeninukleotidfosfát, koenzym
- NCBP – *Nuclear cap-binding protein complex*
- NNK – *Nicotine-derived nitrosamine ketone*, Specifický karcinogenní keton z tabáku
- NTC – *No template control*
- PCR – *Polymerase chain reaction*
- PEI – Polyethylenimin
- RCB – Ricobendazol
- RE – Restrikční endonukleasy
- RT – Reverzní transkripce
- SDR – *Short-chain dehydrogenase/reductase*
- SNP – *Single nucleotide polymorphism*; jednonukleotidový polymorfismus
- SOC médium – *Super Optimal Broth medium*
- TBE – Tris-Borát-EDTA pufr
- TBST – *Tris-buffered saline + Tween 20* - pufr
- WR – Kmen rezistentní na všechna anthelmintika

9 Seznam použité literatury

1. RAISOVÁ, STUHLÍKOVÁ, Lucie, a další. Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *Elsevier. IJP: Drugs and Drug Resistance*, 2018, Sv. 8, 50-58, doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.01.005.
2. KOTZE, A.C. a RICHARD, R.K. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. *Elsevier. Advances in Parasitology*, 2016, Sv. 93, 9, doi:10.1016/bs.apar.2016.02.012 .
3. EMERY, David L., W., HUNT Peter a JAMBRE Leo F, Le. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *Elsevier. International Journal for Parasitology*, 2016, Sv. 46, 12, doi: 10.1016/j.ijpara.2016.07.001.
4. LAING, R., KIKUCHI a další. The genome and transcriptome of *Haemonchus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology*. 2013, Sv. 14, 8, <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-8-r88>.
5. CRILLY, James, Patrick, a další. Haemonchosis: dealing with the increasing threat of the barber's pole worm. *LiveStock*. 2020, Sv. 25, 5, doi:10.12968/live.2020.25.5.237.
6. WIDIARSO, Budi, P., a další. Morphology and morphometry of *Haemonchus contortus* exposed to *Gigantochloa apus* crude aqueous extract. *Veterinary World*. 2018, Sv. 11, 7, doi: 10.14202/vetworld.2018.921-925.
7. HOLDEN-DYE, Lindy a WALKER, Robert J. Anthelmintic drugs. *WormBook*. The *C. elegans* Research, 2007.
8. ZAJÍČKOVÁ, Markéta, a další. Anthelmintics in the future: current trends in the discovery and development of new drugs against gastrointestinal nematodes. *Elsevier. Drug Discovery Today*, 2019, Sv. 25, 2, doi:10.1016/j.drudis.2019.12.007 .
9. BALTRUŠIS, Paulius, a další. Assessment of the F200Y mutation frequency in the β tubulin gene of *Haemonchus contortus* following the exposure to a discriminating concentration of thiabendazole in the egg hatch test. *Elsevier. Experimental Parasitology*, 2020, Sv. 217, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.107957>.

10. MORENO-GUZMÁN, M.J., a další. Levamisole binding sites in *Haemonchus contortus*. *Elsevier. International Journal for Parasitology*, 1998, Sv. 28, 3, [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00198-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00198-7).
11. KAMINSKY, Ronald, DUCRAY, Pierre a JUNG, Martin. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*. 2008, Sv. 452, 13, doi: 10.1038/nature06722.
12. BESIÉ, Kahn, L.P. a SARGISON, N.D. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Elsevier. Advances in Parasitology*, 2016, Sv. 93, 181-238, <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.024>.
13. SKÁLOVÁ, Lenka, BOUŠOVÁ, Iva a kolektiv, a. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Praha : Karolinum, 2011. stránky 5-48. 978-80-246-1917-0.
14. MALÁTKOVÁ, Petra, MASER, Edmund a WSÓL, Vladimír. Human Carbonyl Reductases. *Current Drug Metabolism*. 2010, Sv. 11, 8, 639-658, doi: 10.2174/138920010794233530.
15. FOREST, A.L. a GONZALEZ, B. Carbonyl reductase. *Elsevier. Chem Biol Interact*, 2000, Sv. 129, 1-2, doi: 10.1016/s0009-2797(00)00196-4.
16. BARSKI, A., TIPPARAJU, SRINIVAS m., BHATNAGAR, Aruni. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Informa, health care. Drug Metabolism Reviews*, 2008, Sv. 40, 4, DOI: 10.1080/03602530802431439.
17. PENNING, A. TREVOR. The aldo-keto reductases (AKRs): Overview. *Elsevier. Chemico-Biological Interactions*, 2015, Sv. 234, 5, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.09.024>.
18. BOHREN, M.K., a další. The Aldo-Keto Reductase Superfamily - cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases*. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology. The Journal of Biological Chemistry*, 1989, Sv. 264, 15, 264:9547-9551.
19. SEHNAL, D., a další. Aldose reductase tertiary complex with NADPH and DEG. *RCSB PDB*. [Online] 2018. [Citace: 20. 2 2021.] <https://www.rcsb.org/structure/2F2K>. 10.2210/pdb2F2K/pdb.

20. UNIPROTKB, Consortium. UniProtKB - P14550 (AK1A1_HUMAN). *UniProtKB*. [Online] 2002-2021. [Citace: 20. 2 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/P14550>.
21. UNIPROTKB, Consortium. UniProtKB - P15121 (ALDR_HUMAN). *UniProtKB*. [Online] 2002-2021. [Citace: 20. 2 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/P15121>.
22. UNIPROTKB, Consortium. UniProtKB - O60218 (AK1BA_HUMAN). *UniProtKB*. [Online] 2002-2021. [Citace: 20. 2 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/O60218>.
23. UNIPROTKB, Consortium. UniProtKB - Q04828 (AK1C1_HUMAN). *UniProtKB*. [Online] 2002-2021. [Citace: 20. 2 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/Q04828>.
24. UNIPROTKB, Consortium. UniProtKB - P51857 (AK1D1_HUMAN). *UniProtKB*. [Online] 2002-2021. [Citace: 20. 2 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/P51857>.
25. UNIPROTKB, Consortium. UniProtKB - O43488 (ARK72_HUMAN). *UniProtKB*. [Online] 2002-2021. [Citace: 21. 2 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/O43488>.
26. BRAY, James, E., MARSDEN, Brian, D. a Oppermann, Udo. The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: A bioinformatics summary. *Elsevier. Chemico-Biological Interactions*, 2009, Sv. 178, 1-3, doi: 10.1016/j.cbi.2008.10.058.
27. KAVANAGH, K. L., a další. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Springer Open Choice. Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, Sv. 65, 24, doi: 10.1007/s00018-008-8588-y.
28. RNDr. Lucie ZEMANOVÁ, Ph.D. Význam enzymů z nadrodin AKR a SDR u člověka. *Habilitační práce*. Hradec Králové : Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2018.
29. UNIPROTKB, Consortium. UniProtKB - P16152 (CBR1_HUMAN). *UniProt*. [Online] 2002-2021. [Citace: 15. 3 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/P16152#function>.
30. UNIPROTKB, Consortium. UniProtKB - O75828 (CBR3_HUMAN). [Online] 2002-2021. [Citace: 21. 3 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/O75828>.
31. UNIPROTKB, Consortium. UniProtKB - Q8N4T8 (CBR4_HUMAN). *UniProtKB*. [Online] 2002-2021. [Citace: 21. 3 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/Q8N4T8#expression>.

32. UNIPROTKB, Consortium. UniProtKB - Q7Z4W1 (DCXR_HUMAN). *UniProtKB*. [Online] 2002-2021. [Citace: 24. 3 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/Q7Z4W1>.
33. UNIPROTKB, Consortium. UniProtKB - P28845 (DHI1_HUMAN). *UniProtKB*. [Online] 2002-2021. [Citace: 24. 3 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/P28845>.
34. UNIPROTKB Consortium. UniProtKB - P14061 (DHB1_HUMAN). *UniProtKB*. [Online] 2002-2021. [Citace: 28. 3 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/P14061>.
35. SHI, Lijun, a další. Polymorphism of HSD17B1 Ser312Gly with Cancer Risk: Evidence from 66,147 Subjects. *Meta-analysis*. Twin Research and Human Genetics, 2016, Sv. 19, 2, stránky 136-145, doi: 10.1017/thg.2016.6.
36. UNIPROTKB, Consortium. UniProtKB - O75452 (RDH16_HUMAN). *UniProtKB*. [Online] 2002-2021. [Citace: 28. 3 2021.] <https://www.uniprot.org/uniprot/O75452>.
37. ZHU, Ying-Hui, L, JIAN-BIAOI a Wu, Rui-Yan. Clinical significance and function of RDH16 as a tumor-suppressing gene in hepatocellular carcinoma. *The Japan Society of Hepatology*. Hepatology Research, leden 2020, Sv. 50, 1, doi: 10.1111/hepr.13432, stránky 110-120.
38. FILLING, C., BERNDT, K. D., BENACH, J., KNAPP, S., PROZOROVSKI, T., NORDLING, E., ... OPPERMANN, U. Critical Residues for Structure and Catalysis in Short-chain. *Journal of Biological Chemistry*. 2002, Sv. 277, 28, doi: 10.1074/jbc.M202160200, stránky 25677–25684.
39. SCIENTIFIC, THERMOFISHER. Promega pCI and pCI-neo Mammalian Expression Vectors. *Fisher Scientific*. [Online] ThermoFisher Scientific. [Citace: 9. 2 2021.] <https://www.fishersci.com/shop/products/promega-pci-pci-neo-mammalian-expression-vectors-pci-neo-mammalian-expression-20-g/pre1841>.
40. LABGUIDE. Ligace inzertu do vektoru. *LabGuide*. [Online] 2014-2019. [Citace: 4. 1 2021.] <https://labguide.cz/vypocty/vypocet-mnozstvi-inzertu-ligovaneho-do-vektoru/>.
41. SALLE, G., Doyle, S. R.. a kol., a. The global diversity of *Haemonchus contortus* is shaped by human intervention and climate. *Nature Communications*. 2019, Sv. 10, 4811.

42. VADLEJCH, Jaroslav, a další. Resistance of strongylid nematodes to anthelmintic drugs and driving factors at Czech goat farms. *BioMed Central. BMC Veterinary Research*, 2021, Sv. 17, 1, doi: 10.1186/s12917-021-02819-8.

43. VOKŘÁL, Ivan, a další. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Cambridge University Press. Parasitology*, 2012, Sv. 139, 1309-1312, doi:10.1017/S0031182012000595.

10 Seznam použitých obrázků

Obrázek 1- Jednoduché schéma životního cyklu <i>H. contortus</i> v ovci (upraveno a převzato z: (5)).	2
Obrázek 2 - Terciální krystalografická struktura aldo-ketoreduktasy s navázaným NADPH. Převzato z: (19). (Rozlišení 1.94 Å, ID:2F2K)	10
Obrázek 3 - Schéma katalytické reakce u AKR (převzato z: (17)).	13
Obrázek 4 – Terciální krystalografická struktura dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem Převzato z: (27).	15
Obrázek 5 - Mechanismus reakce SDR (17β-HSD10). Upraveno a převzato z: (38).	18
Obrázek 6 - Amplifikační graf – stanovení účinnosti primerů pro gen AKR3.	25
Obrázek 7 - Parametry použitého programu qPCR.	26
Obrázek 8 - Příklad amplifikace genu SDR5.	26
Obrázek 9 - Křivka tání – gen SDR5.	27
Obrázek 10 - Schéma mRNA s místy nasedání použitých primerů.	28
Obrázek 11 - Schéma pCI vektoru (převzato z: (39)).	32
Obrázek 12 - Grafické znázornění výpočtu efektivity pro primery genu AKR3.	44
Obrázek 13 - Graficky zpracované výsledky genové exprese – geny SDR – kmeny ISE, IRE, WR Female	45
Obrázek 14 - Graficky zpracované výsledky genové exprese – geny SDR – kmeny ISE, IRE, WR Male	46
Obrázek 15 - Graficky zpracované výsledky genové exprese – geny AKR – kmeny ISE, IRE, WR Female	46
Obrázek 16 - Graficky zpracované výsledky genové exprese – geny AKR – kmeny ISE, IRE, WR Male	46
Obrázek 17 - Gelová elektroforéza – přípravné klonování.	47
Obrázek 18 - Gel s produkty po kontrolní enzymatické restrikci plasmidu	48
Obrázek 19 - Colony PCR – gel.	49
Obrázek 20 - Příklad výstupu z programu ABI.	50
Obrázek 21 - Ověření přítomnosti sekvence vektoru pomocí web. aplikace VecScreen.	50
Obrázek 22 - Výsledná sekvence genu SDR5 v porovnání s obdobným genem databáze.	51
Obrázek 23 - Translace nukleotidové sekvence do sekvence aminokyselinové.	51
Obrázek 24 - Výsledek určení konzervativních úseků sekvence sekvenovaného genu SDR5.	52

Obrázek 25 - Srovnání sekvence konzervativního motivu dalších SDR ze zástupců obdobné rodiny.....	52
Obrázek 26 - Kalibrační křivka – stanovení proteinů – BCA.....	53
Obrázek 27 - Ověření přítomnosti proteinu pomocí metody Dot Blot.....	54

11 Seznam použitých tabulek

Tabulka 1 - Přehled lidských aldo-ketoreduktas (13).....	9
Tabulka 2 - Významní zástupci lidských SDR.	14
Tabulka 3 - Složení mastermixu pro RT.....	24
Tabulka 4 - Složení mastermixu pro qPCR	25
Tabulka 5 - Kombinace použitých primerů ke klonování	28
Tabulka 6 - Složení mastermixu pro PCR – klonování	29
Tabulka 7 – program PCR – klonování	29
Tabulka 8 - Směs k enzymatické restrikci	31
Tabulka 9 - Mastermix pro Colony PCR.....	34
Tabulka 10 - OneTaq PCR.....	36
Tabulka 11 - Kalibrační křivka – BCA	41
Tabulka 12 - Výsledky izolace RNA fenol-chloroformovou metodou.	43
Tabulka 13 - Hodnoty Ct – stanovení účinnosti.....	44
Tabulka 14 - Tabulka s kombinacemi použitých primerů s délkou výsledného produktu.....	47
Tabulka 15 - Koncentrace amplifikovaných vzorků k restrikčnímu štěpení.	48
Tabulka 16 Koncentrace štěpených vzorků.	48
Tabulka 17 Výsledná koncentrace izolovaného plasmidu.....	49
Tabulka 18 - Výsledky naměřené absorbance – stanovení proteinů - BCA.....	53

12 Přílohy

12.1 Příloha 1 - Sekvence použitých primerů v rámci klonování.

SDR5_Hco

- Hco_sdr5_UF: 5´-TTT CAG ACC ACC ATC ACC GA- 3´ $T_m = 55,8\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Hco_sdr5_UR: 5´-AGC TTT ATT CTG ATC AAC AAG TGG T-3´ $T_m = 53,5\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Hco_sdr5_CDS/F: 5´-TCA GAA TTC ATG CCA GTG TCA TC-3´ $T_m = 54,6\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Hco_sdr5_CDS/R: 5´-TAT TCT AGA TCA 6x(ATG) AAA CGT GAT GCC GAA C-3´ $T_m = 62,6\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Hco_sdr5_SDR/F: 5´-TGA TCT CCA AGC CAC CAA CT- 3´ $T_m = 58,93\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Hco_sdr5_SDR/R: 5´-GTT TCG CAT ACT CCC GGT TC- 3´ $T_m = 59\text{ }^{\circ}\text{C}$

12.2 Příloha 2 – Sekvence CDS – *SDR5*

>sdr5_HCON_00163110_CDS

```
AGTTTCAGACCACCATCACCGATCGAGGTGCAGCTGGTGAACGTTTCG
ATGCCAGTGTTCATCGTTCAAACGAACGATTCTGATCACCGGCTCGACGGATGGC
AACAGACGGCCACCGATTTGGCCGTCATCCGGATAATCGAGTCATTATCCATGGACGA
AGTGAAGAAAAATGCGAGACGACTCGAGACCAAATCGTCAAGGAGACCGGAAACCCAACA
AATGTCGACTATATTGCCGCCGATTTGTCCGTTATGAAAGAGGTTGCCCATTTTGGCCGAC
AAAGTGAAAAGCCGATTTCCGGAAATTGAATGTGCTATTATGTAATGCCGGCGTGTGAAT
CCCCGACGAGCAGAGACAGTGGATGGACTCGAAATGACATTCCAGGTTAATCACCTATCA
CACTTTGTCATCAGCCGACAGCTGCGTCCACTTCTTCAGCAGAACTCGCCTTCTCGAATC
ATCTTCGTTTCAAGCATATGCTATGATTGGTACCCTCTCGATTTTTCTGATCTCCAAGCC
ACCAACTACGGCGATGCCTATTTACAGTATTCACGTAGCAAACGATGAATCATATGACA
GCGTTCAGACTGGCTCGGGAAAAATCCGATGGAGTAACGGTGAACGTTCTGGAACCGGGA
GTATGCGAAACGAAACTTCTCAAAGAGGCGGTTATTCTGGTGGACCGGTGAAGGACGGA
AGCGTGGCACCAGTACATCTTGTATGTCTGAGGAAGTGAAGAATATTACCGGCGGGTAT
TTCAATAACCGTGGAAAGAGGATCACCTCATTGAGTGCTGACTCGACGGATGCCAACAG
CAGGATCGCCTGTGGACAATGAGTGAGGAGATCTGTTCCAAGTTCGGCATCACGTTTGA
GCAGATGAAGACATTTGCAATATTTCTTTGCACCACTTGTTGATCAGAATAAAGCTTTGTA
```

Žlutě označeny UTR oblasti mRNA se zeleně označenými příslušnými primery (Hco_sdr5_UF, Hco_sdr5_UR). Modře označen počátek translace mRNA (aminokyselina methionin), růžově pak terminální kodon TGA. Červeným textem jsou označeny primery k CDS oblasti (Hco_sdr5_CDS/F+R).