

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

**KLONOVÁNÍ A PŘÍPRAVA PLASMIDU
PRO EXPRESI UDP-GLYKOSYLTRANSFERASY
Z VLASOVKY SLEZOVÉ**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2021

Bc. Barbora Wengrynová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. 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. Barbora Wengrynová

Ráda bych poděkovala své školitelce a vedoucí DP doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za poskytnutí zajímavého tématu, odborný dohled, konzultace a trpělivost, kterou mi při vypracování této práce věnovala. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Dianě Dimunové za vysvětlení metod, konzultace, poskytnuté rady a věnovaný čas. Děkuji také celé katedře biochemických věd, nejen za možnost pracovat na experimentech, ale také za předání vědomostí v předmětech, které jsem po dobu svého studia absolvovala.

V poslední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za nekonečnou trpělivost a podporu, kterou mi věnovala při psaní této práce.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Barbora Wengrynová

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

Název diplomové práce: Klonování a příprava plasmidu pro expresi
UDP-glykosyltransferasy z vlasovky slezové

Vlasovka slezová (latinsky *Haemoncus contortus*), stejně jako ostatní organismy, využívá k metabolismu exogenních i endogenních látek biotransformační enzymy. Významnými zástupci těchto enzymů jsou také UDP-glykosyltransferasy (UGT), které katalyzují vznik kovalentní vazby mezi hexosou aktivovanou uridin difosfátem a metabolizovanou sloučeninou, a tím napomáhají eliminaci nežádoucích látek. Zvýšená pozornost k těmto enzymům je způsobena účastí UDP-glykosyltransferas na vzniku rezistence na anthelmintika, kterými je léčena hemonchóza. Studium jejich vlastností a funkcí je významným pomocníkem při řešení otázek rezistence.

UGT se dělí do několika rodin a podrodin v závislosti na podobnostech sekvencí. Tato práce se soustředí na tři zástupce UGT u vlasovky slezové, UGT24C1, UGT365B6 a UGT368B2.

Teoretická část diplomové práce zahrnuje poznatky o vlasovce slezové, hemonchóze a její léčbě, biotransformačních enzymech a z velké části zahrnuje také vysvětlení použitých metod.

Cílem této práce bylo připravit plasmid se zaklonovaným genem kódující UGT, potvrdit jeho správnou sekvenci a ověřit jeho funkčnost, tak aby mohl být využit k dalšímu studiu enzymové aktivity.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Barbora Wengrynová

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

Title of diploma thesis: Plasmid construction for expression of UDP-glukosyltransferase from *Haemonchus contortus*

The barber's pole worm (*Haemonchus contortus*), like other organisms, uses biotransformation enzymes to metabolize exogenous and endogenous substances. Important representatives of these enzymes are also UDP-glycosyltransferases, which catalyze the formation of a covalent bond between hexose activated by uridine diphosphate and the metabolized compound, thus helping to eliminate undesirable substances. Increased attention to these enzymes is due to the involvement of UDP-glycosyltransferases in the development of resistance to anthelmintics, which are used to treat hemonchosis. The study of their properties and functions can significantly help in solving resistance issues.

UGTs are divided into several families and subfamilies depending on sequence similarities. This work focuses on three representatives of UGT in the *Haemonchus contortus*, UGT24C1, UGT365B6 a UGT368B2.

The theoretical part of the diploma thesis includes knowledge about the *Haemonchus contortus*, hemonchosis and its treatment, biotransformation enzymes and also includes an explanation of the used methods.

The aim of this work was to prepare a plasmid with a cloned gene encoding UGT, to confirm its correct sequence and to verify its functionality, so that it can be used for further study of enzyme activity.

OBSAH

1. Úvod	9
2. Teoretická část	10
2.1 Vlasovka slezová.....	10
2.1.1 Hemonchóza	10
2.2 Biotransformace xenobiotik	13
2.2.1 První fáze biotransformace	14
2.2.2 Druhá fáze biotransformace.....	15
2.2.3 Třetí fáze biotransformace.....	15
2.2.4 Biotransformační enzymy u helmintů a vlasovky slezové	16
2.3 UDP-glykosyltransferasy	17
2.3.1 Lidské UGT	18
2.3.2 UGT u vlasovky slezové	18
2.4 PCR.....	20
2.4.1 Primery	21
2.5 Gelová elektroforéza.....	22
2.6 Měření koncentrace a čistoty NK	23
2.7 Klonování	24
2.7.1 Klonovací vektory	25
2.7.2 Restrikce	27
2.7.3 Ligace	28
2.7.4 Transformace	29
2.7.5 Selekcce.....	29
2.7.6 Purifikace.....	29
2.8 Sekvenování.....	30
2.8.1 Sangerovo syntetické sekvenování	30
2.9 Expres a příprava rekombinantního proteinu	32
2.9.1 Transfekce/transformace	32
2.9.2 Expresní systémy	33
2.9.3 Izolace a purifikace proteinu	34
3. Cíl práce.....	36
4. Experimentální část.....	37
4.1 Materiál.....	37
4.1.1 Biologický materiál	37

4.1.2	Chemikálie.....	37
4.1.3	Enzymy.....	37
4.1.4	Markery	37
4.1.5	Kity	38
4.1.6	Pufry a média.....	38
4.2	Technické vybavení a pomůcky	38
4.2.1	Přístroje.....	38
4.2.2	Pomůcky	39
4.3	Pracovní postupy	40
4.3.1	PCR amplifikace vybraných UGT sekvencí cDNA z vlasovky slezové... ..	40
4.3.2	Agarosová elektroforéza.....	41
4.3.3	Přečištění DNA produktu a měření koncentrace po PCR.....	42
4.3.4	Restrikce DNA	42
4.3.5	Ligace	43
4.3.6	Příprava živného média	43
4.3.7	Transformace kompetentních buněk <i>E. coli</i> TOP10	44
4.3.8	Screening kolonií	44
4.3.9	Odebrání a přeočkování pozitivních kolonií	45
4.3.10	Izolace a purifikace plasmidu a kontrola pomocí PCR a elektroforézy	46
4.3.11	Příprava vzorku k sekvenování.....	46
4.3.12	Pasáž Expi293 buněk.....	46
4.3.13	Transfekce Expi293 buněk	47
4.3.14	Sběr a lyzace Expi293 buněk.....	48
4.3.15	Ověření úspěšnosti transfekce metodou Dot blot	48
5.	Výsledky.....	50
5.1	Příprava inzertů	50
5.2	Klonování.....	51
5.3	Screening kolonií	52
5.4	Výsledky ze sekvenace	55
5.5	Ověření úspěšnosti transfekce metodou Dot blot.....	59
6.	Diskuze.....	60
7.	Závěr	64
8.	Zkratky	65
9.	Zdroje.....	67
9.1	Literární zdroje.....	67

9.2	Elektronické zdroje:	70
10.	Přílohy.....	72
10.1	Protokol ke kitu ZYMORESEARCH - DNA clean & concentrator®-5	72
10.2	Protokol ke kitu MACHEREY-NAGEL - NucleoSpin® Plasmid.....	72
10.3	Protokol ke kitu ZYMO RESEARCH - ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep.	73

1. Úvod

Jedním ze závažných parazitů, kteří škodí zejména skotu, je vlasovka slezová (latinsky *Haemoncus contortus*). Jedná se o hlístici způsobující onemocnění malých přežvýkavců, tzv. hemonchózu, která ohrožuje hostitele na životě, a tím také snižuje hospodářské výnosy. Důležitým prvkem léčby tohoto onemocnění jsou anthelmintika. Anthelmintika představují pro organismus vlasovky cizorodé molekuly, tzv. xenobiotika, která podléhají v těle určitým procesům za účelem jejich odstranění. Tyto biotransformační procesy jsou umožněny specifickými enzymy, mezi které patří také UDP-glykosyltransferasy (UGT). Působením anthelmintik může dojít ke změně míry exprese či aktivity nejenom UGT, ale i jiných enzymů, což umožňuje vlasovce vyvinout si schopnost rezistence vůči anthelmintikům.

Vlasovka slezová je pravděpodobně nejvýznamnější studovanou hlísticí v souvislosti s anthelmintiky pro její schopnosti rozvinutí rezistence. Jedná se o velmi dobrý experimentální organismus díky významné plodnosti, poměrně velké velikosti dospělých jedinců a udržení vysoké populace jedinců v hostiteli (Kotze a Prichard 2016).

Tato diplomová práce částečně navazuje na moji bakalářskou práci (Wengrynová 2019), ve které jsem se zabývala vlivem fenobarbitalu na expresi některých genů UGT vlasovky slezové. Tato práce se zabývá jiným tématem, které však stále souvisí s UGT u vlasovky, a to přípravou plasmidu, který by měl nést gen UGT a který by mohl být použit k tvorbě rekombinantního proteinu v dalších experimentech.

Vzhledem k již velkému množství prací zabývajících se vlasovkou na katedře biochemických věd, a kvůli mé předchozí práci, nezabývám se v teoretické části jen poznatky o vlasovce a biotransformaci, ale obohatila jsem ji i o popis využívaných metodik.

K experimentům byla využita celá řada metod molekulární biologie a genetiky. Ke klonování byla použita RNA získaná z citlivého kmene (ISE) vlasovky slezové a expresní vektor pCI. Vytvořený plasmid obsahující gen příslušné UGT byl sekvenován a jeho funkčnost byla ověřena pomocí metody Dot blot. Takto připravený plasmid může sloužit k dalšímu studiu.

2. Teoretická část

2.1 Vlasovka slezová

Vlasovky jsou vysoce patogenní parazité, které se taxonomicky řadí do kmene *Nematoda* a nadčeledi *Trichostrongylidae*. Vlasovky jsou schopny parazitovat na všech druzích přežvýkavců. Pro vlasovku slezovou jsou typickými hostiteli malí přežvýkavci, zejména ovce a kozy. Jak jméno této hlístice napovídá, jedinci parazitují na sliznici slezu, posledního oddílu žaludku přežvýkavců.

Výskyt vlasovky slezové je častější v tropických a subtropických oblastech s teplým a deštivým podnebím, než v oblastech s chladným a suchým podnebím (Arsenopoulos et al. 2021).

Pro vlasovku slezovou je typický přímý a rychlý životní cyklus. Dospělé samice v infikovaném slezu produkují vajíčka, které jsou vylučovány s výkaly. Na pastvině se z vajíček vyvíjí larvy prvního stupně (L1), ty se dále vyvíjí a stávají se z nich larvy druhého stupně (L2) a postupně i larvy třetího stupně (L3), které jsou chráněné dvěma vrstvami kutikuly. Larvy třetího stupně se rozšiřují do různé vzdálenosti od původce a mohou být pozřeny hostitelem. Po vniknutí do sliznice slezu se vlivem okolního prostředí zbavují kutikuly, rozvíjí se do konečného čtvrtého stádia (L4) a dospívají během 2-3 týdnů. Vlasovky se vyznačují vysokou plodností. Jedna samička je schopná vyprodukovat až 10 000 vajíček za den (Laing et al. 2013).

Jedinci vlasovky slezové mají načervenalé tělo o rozměrech 10-30 x 0,4-0,5 mm. Samička je obvykle větší než sameček. Samičku lze odlišit dle stužkovitých bílých vaječníků obtočených ve spirále kolem tmavého střeva. Pro samečka je typická pářící plachetka, dvoulaločná burza vyztužená žebry (Kotrlá 1984, Jíra 1998).

2.1.1 Hemonchóza

Přežvýkavci infikovaní vlasovkou trpí hemonchózou. Hemonchóza se obvykle vyskytuje v akutní formě s různou rychlostí nástupu a úmrtností v závislosti na rozsahu příjmu infekčních larev vlasovky. Jelikož je vlasovka krev sající parazit, infekce vede k anémii. Hlístice je schopna produkovat hemolytický faktor, který poškozují povrch erytrocytu, a to vede k jeho degradaci. Anémie se projevuje bledostí sliznic a spojivek a postupně vede ke zpomalení růstu mladých zvířat a ke snížení produkce mléka.

K příznakům může patřit také submandibulární edém způsobený hypoproteinémií, nutriční potíže či změna kvality rouna. Výkaly bývají pevné a tmavě zbarvené v důsledku příměsi krve.

Všechny tyto zmíněné příznaky vedou k významným ekonomickým ztrátám důsledkem hynutí mláďat, zaostávání ve vývoji a snížené produkce vlny a mléka (Arsenopoulos et al. 2021, Besier et al. 2016).

2.1.1.1 Léčba

Vzhledem k závažnosti onemocnění, velké úmrtnosti zvířat a rychlému nárůstu populace vlasovky, je potřeba nákazu kontrolovat využitím vhodných léčiv, anthelmintik. Existuje nejméně šest jednoaktivních anthelmintických skupin a řada dalších, které se využívají i v kombinaci. Různé typy anthelmintik se mohou lišit svojí účinností, zejména kvůli rozšířenému výskytu anthelmintické rezistence. Z důvodu různých mechanismů rezistence a velkých rozdílů její závažnosti mezi regiony, je nutné znát účinnost jednotlivých skupin léčiv a dle toho zvolit optimální typ léčiva.

Dostupnými léčivy jsou v současnosti benzimidazoly, imidazothiazoly, tetrahydropyrimidiny, organofosfáty, makrocyclické laktony, salicylanilidy a substituované fenoly a deriváty amino-acetonitrilu.

Do skupiny benzimidazolů patří první moderní širokospektré anthelmintikum, thiabendazol. Tato skupina léčiv působí na hlístice na buněčné úrovni. Způsobuje inhibici polymerace mikrotubulů, což vede k buněčné smrti. Imidazothiazoly působí proti acetylcholinovým receptorům. Jejich nejznámějším zástupcem je levamisol. Organofosfáty zahrnují naftalofos či triclorfon a fungují jako inhibitory acetylcholinesterasy. Zástupci makrocyclických laktonů, ivermektin a moxidectin, používají mechanismus založený na narušení nervového přenosu. Skupina salicylanilidů, kam patří např. klosantel, inhibuje energetický metabolismus odpojením oxidativní fosforylace. Derivát amino-acetonitrilu, monepantel, působí proti nikotinovým acetylcholinovým receptorům a má široké spektrum aktivity (Besier et al. 2016, Gasser et al. 2016).

2.1.1.2 Rezistence

Vlasovka slezová je známá pro svoji vysokou schopnost k rozvoji rezistence na anthelmintika. Pojem rezistence se rozumí schopnost organismu přežít působení takového množství léčiva, které by v normálním případě vedlo k jeho usmrcení. Rozvoj rezistence započal s největší pravděpodobností v důsledku podávání neadekvátních dávek anthelmintik, zejména kvůli neznalosti vhodného dávkování nebo podhodnocení hmotnosti zvířat. Mechanismy rezistence vůči různým třídám léčiv se obecně liší, proto si určité třídy léčiv mohou zachovat aktivitu proti organismům, které jsou odolné vůči jiné třídě. To umožňuje kontrolovat šíření infekce pomocí užívání kombinace léčiv, avšak byly objeveny i rezistence na tyto kombinace. U vlasovky byly již nalezeny rezistence na všechny třídy používaných anthelmintik, nejdříve na benzimidazoly, imidazothiazoly a makrocyclické laktony a v poslední době také na poměrně nové léčivo, monepantenol. Zjištění příčin vzniku rezistence napomáhá k odhadnutí dalších důsledků rezistence, ale poznatky jsou využity i k vývoji nových léčiv. Proto jsou tyto mechanismy široce studovány (Kotze a Prichard 2016). Mechanismy rezistence jsou zprostředkované buď farmakodynamicky či farmakokineticky. Pro farmakodynamiku je charakteristický úbytek cílových makromolekul nebo změny v jejich strukturách. K farmakokinetickým procesům patří snížené vychytávání léčiva a zrychlená inaktivace a eliminace léčiva, která je založena na zvýšení exprese a aktivit biotransformačních enzymů (Stuchlíková et al. 2018). Arsenopoulos et al. (2021) uvádí, že rezistence na anthelmintika jsou způsobovány mutacemi genů kódující cíle působení příslušných léčiv, např. u bezimidazolů genu pro β -tubulin.

2.1.1.3 Prevence

Vzhledem k narůstajícímu šíření rezistence, je vhodné se zaměřovat na prevenci infekce, tak aby bylo šíření onemocnění pod kontrolou a zůstala zachována citlivost na anthelmintika. K udržení citlivých populací vlasovky jsou používány přístupy cílené léčby a cílené selektivní léčby. Při cílené léčbě jsou podávána léčiva všem jedincům stáda v určitých časových intervalech. Tento přístup by měl omezit počet nutných ošetření a minimalizovat tak rozvoj rezistentních kmenů díky delším prodlevám mezi ošetřeními a obnovením populace vlasovek citlivých na anthelmintika. V případě cílené selektivní léčby jsou léčiva podávána jen jedincům, u kterých byla infekce diagnostikována.

Při tomto přístupu by se měla snížit expozice hlístic anthelmintikům, tím pádem i snížit riziko nárůstu rezistentní populace. K dalším preventivním postupům patří uplatnění rotační pastvy, chov zvířat odolných k nákaze, kontrolovaná strava zvířat, krmení rostlinami s obsahem tříslovin s antiparazitickými vlastnostmi, použití nematofágních hub, které jsou schopny zničit infekční larvy, či aplikace vakcíny (Arsenopoulos et al. 2021, Getachew, Dorchies a Jacquiet 2007).

2.2 Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika jsou cizorodé látky přírodního i syntetického původu, které vstupují do organismu. Tyto látky nejsou ani zdrojem energie, ani stavební složkou endogenních látek, naopak mohou představovat riziko vzniklé interakcí s endogenními látkami a narušovat fyziologické procesy. Významným příkladem xenobiotik jsou léčiva, která mohou mít jak farmakologický, tak toxikologický účinek.

Xenobiotika podléhají v těle několika procesům. Do kinetických procesů spadá absorpce, distribuce, akumulace, metabolismus a extrakce. Dynamické procesy souvisí s interakcí látek s cílovou strukturou.

K eliminaci xenobiotik slouží činitelé schopní takové látky metabolizovat. K nim patří jak transportní proteiny, tak biotransformační enzymy (Skálová et al. 2017). Biotransformační reakce mají nezaměnitelnou roli v odstraňování potenciálně toxických exogenních látek, také v odbourávání nežádoucích produktů endogenního metabolismu a v neposlední řadě kontrolují hladiny a distribuci endogenních signálních molekul (Meech et al. 2019). Cílem biotransformace je změnit chemickou strukturu látek, vytvořit hydrofilnější metabolit, a tím urychlit jeho eliminaci. Jakým způsobem bude xenobiotikum podléhat výše zmíněným fázím závisí na jeho struktuře a na přítomnosti a vlastnostech enzymů v organismu.

Existuje několik faktorů, které ovlivňují metabolismus látek v těle. Vliv může mít věk a pohlaví jedince, hormonální účinky, biologické rytmy, výživa či indukce a inhibice enzymů (Skálová et al. 2007). Pokud je organismus ve zvýšeném kontaktu s xenobiotiky, může se bránit proti chemickému stresu zvýšením aktivity biotransformačního enzymu, přičemž tato indukce může mít významné farmakologické a toxikologické důsledky (Cvilink, Lamka a Skálová 2009). Indukcí se rozumí zvýšení aktivity enzymu následkem zvýšení jeho syntézy nebo snížením jeho degradace. Činitelé schopní dosáhnout zvýšení aktivity enzymu se nazývají induktory. Ty mají schopnost zvýšit transkripci (expresi)

genů pomocí navázání ligandu na transkripční faktor (cytosolický či nukleární receptor). Naopak inhibitorem může být látka anorganické i organické povahy, která má za následek zbrzdění enzymové reakce působením přímo na enzym nebo inhibicí jeho aktivity. Aktivita enzymu může být snížena také látkami, které brání jeho syntéze na úrovni transkripce genu (Skálová et al. 2017).

Enzymy jsou zařazeny a pojmenovány dle sekvenční homologie genů do několika rodin a podrodin. Kořen zkratky enzymu obsahuje zkrácený název a značí nadrodinu, číslo označuje rodinu, písmeno podrodinu a další číslo jednotlivý gen (Matoušková et al. 2018).

Existují tři fáze biotransformačních reakcí.

2.2.1 První fáze biotransformace

V první fázi dochází k oxidaci, redukci, hydrolýze, hydrataci či izomeraci. Díky těmto reakcím vzniká ve struktuře xenobiotika nová funkční skupina, která obvykle dodává sloučenině hydrofilnější charakter nebo ji zpřístupňuje dalším reakcím.

Pravděpodobně nejvýznamnějšími enzymy první fáze jsou enzymy z nadrodiny cytochromů P450 (CYP). Jde o hemoproteiny, pro které je typický vysoký počet isoformů s různým významem, počtem substrátů, počtem katalytických aktivit a indukovatelností. Největší počet CYP se nachází v játrech, dále také v GIT, plicích či ledvinách. Zástupci CYP mají v metabolismu xenobiotik i endogenních látek jak hlavní monooxygenasovou aktivitu, tak vedlejší peroxidasovou i reduktasovou aktivitu. K dalším enzymům schopným oxidovat xenobiotika náleží flavinové monooxygenasy (FMO), peroxidasy, alkoholdehydrogenasy, aldehyddehydrogenasy, aldehydoxidasy, xanthinoxidasy a mono- a diaminoxidasy.

Opačnou reakci k oxidaci, redukci, provádějí reduktasy. Redukce je oproti oxidaci méně často využívanou reakcí, avšak v případě ketonů, aldehydů, chinonů, nitrosloučenin, S-oxidů a N-oxidů se může jednat o hlavní metabolickou cestu. Dle typu substrátu jsou známy aldo-ketoreduktasy (AKR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) a se středně dlouhým řetězcem (MDR), chinonoxidoreduktasa, thioredoxinreduktasa nebo oxidasy s redukční aktivitou, např. CYP či xanthinoxidasa.

V neposlední řadě se do enzymů první fáze biotransformace řadí enzymy katalyzující štěpení látky za účasti vody, tzv. hydrolasy. Zástupci hydrolas mají obvykle názvy odvozené od substrátů (esterů, amidů, epoxidů...), které hydrolyzují,

např. esterasy, paraoxonasy, peptidasy, amidasy, epoxidhydrolasy (Cvilink, Lamka a Skálová 2009, Skálová et al. 2017).

2.2.2 Druhá fáze biotransformace

Pro druhou fázi je charakteristická konjugace. Při konjugaci reaguje xenobiotikum nebo vzniklý metabolit s endogenní látkou za vzniku konjugátu. Pomocí konjugace je možné omezit biologickou aktivitu a toxicitu xenobiotika nebo regulovat endogenní metabolismus. Xenobiotika v druhé fázi podléhají glukuronidaci, sulfonaci, methylaci, acetylaci, konjugaci s glutathionem či konjugaci s aminokyselinami v závislosti na přítomnosti funkčních skupin sloučeniny nebo typu organismu.

Během sulfonace vystupuje jako donor sulfonu 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát, který je konjugován zejména s alkoholy, fenoly a aminy. Reakce jsou katalyzovány sulfotransferasami. Methylaci katalyzují methyltransferasy, které váží methyl z S-adenosylmethioninu na fenol, thiol nebo dusíkaté heterocykly přes kyslík, síru nebo dusík. Acetylace se účastní N-acetyltransferasy, které jsou schopny konjugovat aromatické aminy a hydraziny s acetylovou skupinou pocházející z acetylkoenzymu A. Konjugace s glutathionem je velmi významnou reakcí druhé fáze biotransformace. Tuto konjugaci glutathionu se sloučeninami s elektrofilními vlastnostmi uskutečňují glutathion-S-transferasy (GST). Vlastnosti glukuronidace budou zmíněny dále.

2.2.3 Třetí fáze biotransformace

Jako třetí fáze biotransformace bývají označovány transportní proteiny, které přenášejí xenobiotika a jejich metabolity přes membrány a napomáhají jejich odstranění z organismu. Aby transportéry fungovaly, jsou závislé na příjmu energie, kterou získávají hydrolýzou ATP nebo kontransportem/antiportem látek tvořící membránový gradient. Transportéry mohou látky transportovat buď do buňky („uptake“ transportéry) nebo z buňky („efflux“ transportéry). Existuje několik rodin transportérů. Příkladem jsou ABC efluxní transportéry nebo uptake přenašeče hydrofilních látek, tzv. SLC rodina (Skálová et al. 2017).

2.2.4 Biotransformační enzymy u helmintů a vlasovky slezové

Metabolismus xenobiotik u helmintů a savců, případně jiných organismů, se výrazně liší jak zastoupením, tak aktivitami příslušných enzymů. Rozdíly v přítomnosti a vlastnostech enzymů jsou i mezi samotnými druhy helmintů. Daná sloučenina může být v jednom helmintovi metabolizována jedním enzymem a v druhém helmintovi úplně odlišným. Helminti mají obecně pouze omezenou schopnost metabolizovat xenobiotika. Některá xenobiotika dokonce ani biotransformaci nepodléhají. O biotransformaci u helmintů je však stále málo zjištěno a neustále probíhají nové studie k získání nových informací.

Do současnosti bylo studiem enzymů cytochromů P450 u helmintů zjištěno, že pro CYP helmintů platí stejné vlastnosti jako u savců, tedy že mají jak monooxygenasovou, tak peroxidasovou a reduktasovou aktivitu. U některých druhů však byly potvrzeny jen dvě posledně zmíněné. I přes relativně nízký počet genů CYP přítomných u helmintů je oxidace anthelmintik spojována se vznikem rezistencí. Např. krevnička močová (*Schistosoma mansoni*) obsahuje v genomu jedinou kopii genu CYP, která i přesto hraje velmi významnou roli v přežití. Nicméně existují také helminti, u kterých bylo nalezeno velké množství CYP. Analýza genomu háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*) odhalila přítomnost více než 80 genů kódujících CYP. U vlasovky slezové bylo nalezeno několik fylogeneticky stabilních genů CYP.

Díky oxidačním enzymům mají helminti schopnost odolávat aktivaci imunitního systému hostitele a chránit se před účinky reaktivních forem kyslíku, jejichž vznik je aktivací vyvoláván. K enzymům, které mají ochrannou roli, patří superoxidodismutasa, katalasa, glutathionperoxidasa, xanthinoxidasa, cytochrom c peroxidasa a peroxiredoxiny.

V případě sloučenin nesoucích karbonylové skupiny představuje hlavní metabolickou cestu redukce. V genomech helmintů je přítomen relativně vysoký počet genů SDR/AKR zdůrazňující význam reduktas v metabolismu xenobiotik. U vlasovky slezové byly nalezeny aktivity reduktasy vůči několika substrátům (např. naloxonu a FLU). U motolice obrovské (*Fasciola magna*) byla zjištěna aktivita chinonoxidoreduktasy, u krevničky jaterní (*Schistosoma japonicum*) aktivita D, L-glyceraldehydreduktasy. U háďátka obecného analýza odhalila přes 60 genů SDR.

U helmintů bylo nalezeno významné množství hydrolas. Nejvíce zastoupeny jsou nejspíše esterasy, včetně fosfatas hydrolyzujících nitrofenylfosfáty a organofosfáty.

Glutathion-S-transferasy byly nalezeny u všech různých druhů helmintů a jsou pravděpodobně nejvíce studovanými konjugačními enzymy u těchto živočichů. V GST helmintů byly detekovány rozdíly ve specifických oblastech oproti podobným savcím GST. Rozdíly v substrátové specifitě, katalytických aktivitách a imunogenicitě byly zjištěny i mezi samotnými druhy. Vyšší aktivity GST byly objeveny u střevních parazitů, např. tasemnic, než u parazitů vyskytujících se v krvi či tkáni. GST u helmintů hraje důležitou roli v přežití jedince v těle hostitele díky účasti na syntéze prostaglandinů, které po vyloučení působí proti reakci imunitního systému hostitele. Dalším prospěchem je, že mají podíl na detoxikaci lipidových hydroperoxidů a karbonylových sloučenin produkovaných při oxidačním stresu.

Při studiu genomů helmintů na přítomnost UGT bylo zjištěno, že u zástupců třídy tasemnice nebyly nalezeny žádné předpokládané geny UGT. To však může být dáno tím, že tyto enzymy jsou u helmintů relativně špatně prostudovány. UGT byly nalezeny u háďátka obecného i vlasovky slezové v souvislosti s deaktivací benzimidazolových anthelmintik.

Z dalších konjugačních reakcí byla popsána acetylace biogenních aminů u motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) a háďátka obecného. Aktivita podobná sulfottransferasam byla prokázána např. u krevničky močové.

Efluxní transportéry ze třetí fáze biotransformace, zejména ABC transportéry a jejich zástupce P-glykoprotein (P-gp), byly popsány již u mnoha druhů helmintů. Funkce ABC transportérů byla pozorována u háďátka obecného (více než 60 genů) i vlasovky slezové. Byla potvrzena účast transportérů ABC na rezistenci makrocyclických laktonů (Cvilink, Lamka a Skálová 2009, Matoušková et al. 2016).

Laing et al. (2013) identifikovali u vlasovky slezové geny kódující 42 CYP, 44 SDR, 28 GST, 34 UGT a 10 P-gp.

2.3 UDP-glykosyltransferasy

UDP-glykosyltransferasy (UGT) patří do nadrodiny enzymů, které patří do 2. fáze biotransformačních reakcí. Jedná se o enzymy nacházející se v živočišné i rostlinné říši, u hub i u bakterií. Tyto enzymy katalyzují vznik kovalentní vazby mezi hexosami aktivovanými uridin difosfátem (UDP) a funkční skupinou lipofilní molekuly, nejčastěji hydroxylovou, karbonylovou nebo aminoskupinou. Dochází tak ke konjugaci glukuronové kyseliny, glukosy, xylosy, galaktosy nebo acetylglukosaminu s malými

nepolárnými molekulami, přičemž výsledné produkty jsou poté neaktivní a více rozpustné ve vodě, což umožňuje jejich exkreci močí či stolicí.

Nadrodina UGT je charakterizována přítomností signální proteinové struktury skládající se ze 44 aminokyselin, která je odpovědná za vazbu UDP z donoru. UGT se u savců a hmyzu váže na endoplazmatické retikulum díky přítomnosti transmembránové helix. Tyto sekvence, které tyto struktury nemají, obvykle nevykazují katalytickou aktivitu (Matoušková et al. 2018).

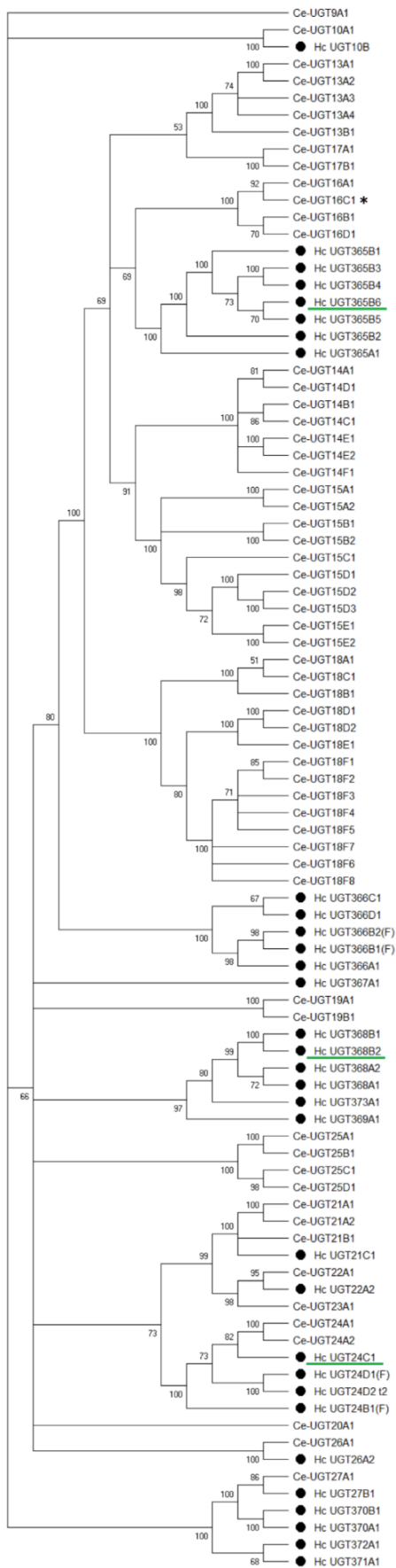
Geny pro UGT jsou z největší části polymorfní, tudíž změny v kódujících sekvencích nebo rozdíly v regulačních oblastech mohou měnit expresi nebo funkci UGT.

2.3.1 Lidské UGT

U savců se vyskytují zejména 4 rodiny UGT: UGT1, UGT2, UGT3, UGT8. První dvě rodiny byly objeveny a popsány v průběhu posledních 4 dekad. Zbylé dvě byly popsány teprve v posledních letech. Pro UGT1 a UGT2 je do reakcí typické využití UDP-glukuronové kyseliny. Oproti tomu UGT3 využívají UDP-glukosu, UDP-xylosu a UDP-N-acetylglukosamin a UGT8 výhradně UDP-galaktosu. UGT se v lidském těle významně zapojují také do metabolismu endogenních látek, jako např. bilirubinu (UGT1A1), steroidních hormonů (UGT1A4, UGT1A8, UGT2B15), žlučových kyselin (UGT1A3, UGT2B4), v tucích rozpustných vitaminů (UGT1A3), thyroidních hormonů (UGT1A9) či neurotransmiterů (UGT1A6) (Meech et al. 2019).

2.3.2 UGT u vlasovky slezové

Matoušková et al. (2018) uvádí, že sekvenováním a studiem genomu vlasovky slezové byla zjištěna přítomnost 32 domnělých genů UGT, které jsou rozmístěny na šesti chromozomech. Nejvíce genů se nachází na chromozomu 4. Dle názvosloví sestaveného na základě aminokyselinové sekvence enzymů, jsou UGT u vlasovky rozděleny do 15 rodin. Některé rodiny jsou jen jednočlenné, některé jsou naopak poměrně rozvětvené, jako např. rodina UGT 365. Obr. 1 sjednocuje a srovnává UGT vlasovky slezové a jiného modelového organismu hlístic - háďátka obecného. Dále popisuje jejich homologii a příbuznost k jednotlivým rodinám. Toto srovnání odhalilo genové rozčlenění specifických podrodin UGT. Některé rodiny UGT vlasovky jsou homology UGT přítomných u háďátka obecného, avšak několik rodin je specifických pouze pro vlasovku slezovou (UGT365, UGT366, UGT368).



Všechny identifikované UGT u vlasovky slezové splňují podmínku přítomnosti signálního peptidu, avšak u některých chybí transmembránový helix. Zda má tento nedostatek vliv na katalytickou aktivitu je předmětem bádání.

Při glykosylaci anthelmintik probíhající v organismu vlasovky vznikají zejména konjugáty s glukosou. Proto se předpokládá, že hlavním dárceem cukru není UDP-glukuronová kyselina, ale UDP-glukosa.

Obr. 1: Fylogenetický strom UDP-glykosyltransferas u *Caenorhabditis elegans* a *Haemonchus contortus* (Matoušková et al. 2018). Zeleně podtržené UGT byly připraveny v této práci.

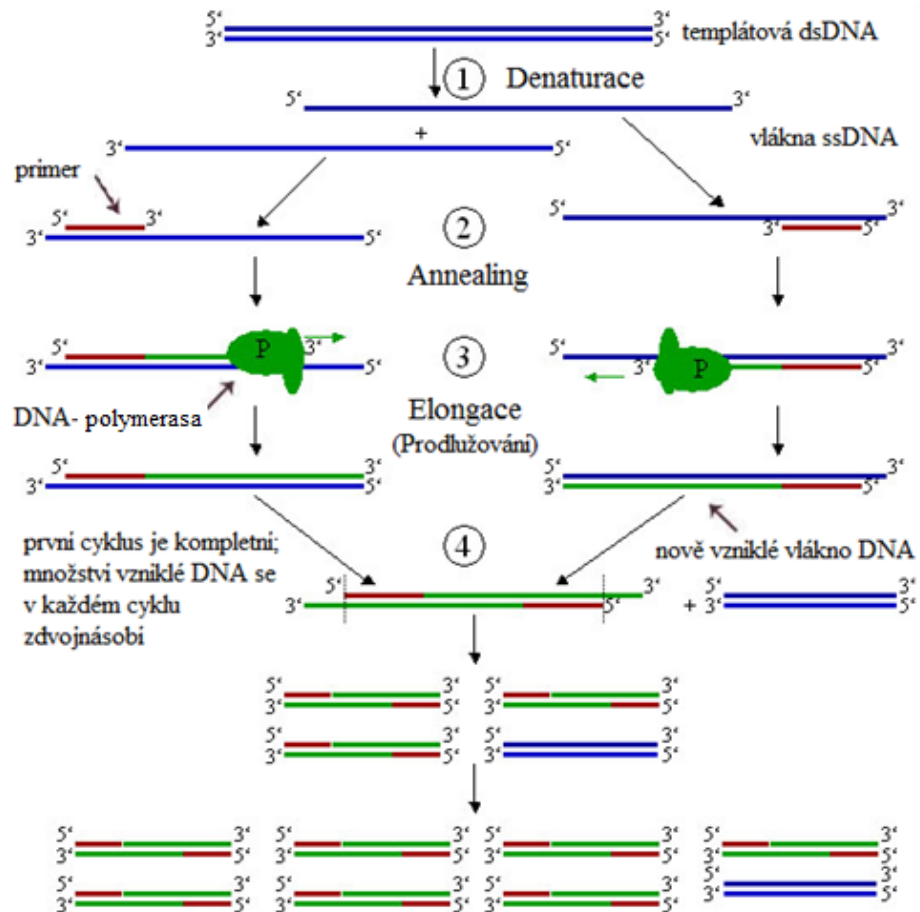
2.4 PCR

PCR je zkratkou pro polymerasovou řetězovou reakci (angl. Polymerase Chain Reaction). Jedná se o metodu umožňující namnožení vybraného úseku DNA ohraničeného dvěma krátkými oligonukleotidy, tzv. primery.

Reakční směs pro PCR je tvořena pufrem, vhodnou koncentrací templátové DNA, primerů, DNA-polymerasy a deoxynukleotidů. DNA-polymerasa je nezbytná ke vzniku nových řetězců, umožňuje připojování deoxynukleotidů k primeru/vznikajícímu vlákně dle komplementarity bází oproti vlákně templátové. K PCR jsou používány tzv. termostabilní DNA-polymerasy, jejichž aktivita není výrazně omezena ani při teplotě nad 90 °C. Optimální teplota pro jejich funkci je však 72-74 °C.

Samotná reakce je složena ze 3 kroků, které jsou umožněny změnami teplot. Prvním krokem je zahřátí reakční směsi na 94 °C vedoucí k denaturaci řetězců ds DNA. Následujícím krokem je annealing, tedy ochlazení směsi na T_m primerů (nejčastěji 50-60 °C), při které nasedají primery na komplementární sekvenci templátové DNA. Třetím krokem je extenze/elongace charakterizovaná zahřátím reakce na teplotu okolo 72 °C, což vede k aktivaci termostabilní polymerasy a syntéze nového řetězce ve směru 5'-3'.

Celá reakce obvykle probíhá ve 20-30 po sobě jdoucích cyklech, přičemž platí, že při každém cyklu se zdvojnásobí počet produktů. Pokud je n počet cyklů, z 1 ds DNA vznikne 2^n produktů (Raclavský 1999, WikiSkripta [online]).



Obr. 2: Průběh PCR (Fialová 2018 [online])

2.4.1 Primery

Primery jsou krátké jednovláknové oligonukleotidy ohraničující úsek DNA, který je potřeba amplifikovat. K amplifikaci DNA se používají 2 primery, tzv. forward (horní, kódující) a reverse (dolní, antikódující, získaný po převedení na reverzní komplementární sekvenci). Na jejich správném návrhu a použití závisí úspěšnost celé PCR. Návrh primerů má pravidla, která by měla být dodržena. Mezi tyto charakteristiky pro každou dvojici primerů patří:

- délka 18-25 nukleotidů, dvojice primerů by měla dosahovat podobné délky
- přítomnost nukleotidu G a C 40-60 %, dvojice by měla obsahovat podobné složení bází
- rovnoměrná přítomnost oblastí bohatých na G/C a A/T páry
- absence delších úseků ze stejných bází (>4)
- absence komplementárních sekvencí a vnitřních sekundárních struktur (vlásenek)

- málo nukleotidů G/C na 3' konci primeru, avšak jeden na úplném konci je vhodný
- teplota T_m primeru > 50 °C, rozdíl mezi T_m primerů by měl být menší než 1-3 °C
- specifčnost primerů – musí se vázat jen k jedinému místu na matricové DNA (Šmarda et al. 2005, Matoušková 2020)

2.5 Gelová elektroforéza

Elektroforéza je separační metoda, která umožňuje rozdělit fragmenty nukleových kyselin na základě jejich rozdílné pohyblivosti ve stejnosměrném elektrickém poli. Tato metoda slouží jak k samotné separaci, tak k identifikaci a purifikaci NK.

Pro nukleové kyseliny je charakteristická jejich elektronegativita daná zbytky kyseliny fosforečné v jejich struktuře. Elektronegativita způsobuje putování NK ke kladné elektrodě v gelu po zapojení do elektrického proudu. Fragmenty NK se pohybují rychlostí, která je úměrná jejich velikosti. Čím je molekula NK menší, tím rychleji se pohybuje gelem. Rychlost pohybu molekul NK a účinnost separace je daná typem, velikostí a koncentrací použitých gelů. Základní typy gelů vznikají z agarosy nebo akrylamidu.

Agarosový gel je připravován rozvařením práškové agarosy v TBE, TAE nebo TPE pufru nejčastěji v koncentraci 1-3 % pro separaci fragmentů o délkách 100-5000 bp. V případě delších fragmentů lze vytvořit gel o menší koncentraci. Agarosový gel se používá zejména v horizontálním uspořádání. K jeho charakteristikám patří snadná příprava, poměrně rychlý průběh separace a velký rozsah délek separovaných fragmentů, nicméně oproti akrylamidovému gelu má nižší rozlišovací účinnost.

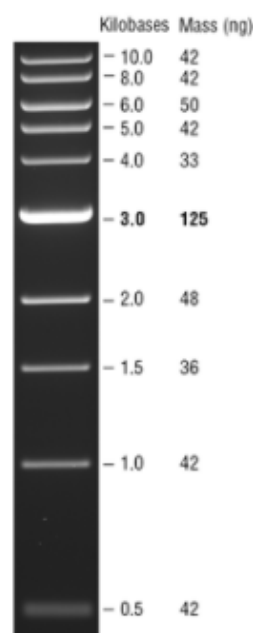
Akrylamidový gel se vytváří polymerací akrylamidu a bisakrylamidu za přítomnosti persulfátu amonného a tetramethylethylendiaminu. Přípravuje se v koncentraci 3-20 % a fragmenty mohou být separovány v uspořádání horizontálním i vertikálním. Největší výhodou akrylamidového gelu je schopnost separace takových fragmentů NK, které se liší jen o jediný nukleotid při velikosti fragmentu do 500 nukleotidů.

Jelikož struktury NK nemají žádné optické vlastnosti, musejí se k vizualizaci v gelu použít tzv. interkalační barviva. Tyto barviva se vmezeří mezi dva pyrimidinové nukleotidy a tím zviditelní NK při vizualizaci pomocí UV transluminátoru. Interkalační

barvivo se může přidat ke vzorku před aplikací na gel nebo se může přidat přímo do gelu při jeho přípravě. Poslední možností je máčení gelu se separovanou NK v roztoku barviva. V dnešní době se jako interkalační barviva používají látky jako SYBR Green, DAPI, TOTO-1, které vytlačují dříve používaný, avšak mutagenní ethidiumbromid (Beránek 2016).

Velikosti oddělených fragmentů NK lze určit pomocí standardu (ladder), který obsahuje směs fragmentů předem stanovených velikostí a který je nanášen na gel současně se vzorky. Velikost dělených fragmentů je určena porovnáním vzdáleností proužků standardu a stanovovaných vzorků.

Moderním přístupem v separaci fragmentů NK je kapilární elektroforéza, jejíž kapilára je naplněna gelovou matricí. Použití kapilární elektroforézy umožňuje rychlé oddělení fragmentů NK díky využití vysokého napětí (Lee et al. 2012).



Obr. 3: 1 kb DNA ladder (žebříček), který se aplikuje do první jamky na gelu pro odhadnutí velikosti separovaných fragmentů DNA (NEB [online]).

2.6 Měření koncentrace a čistoty NK

Znat koncentraci NK ve vzorku je nezbytné pro kroky, ve kterých NK figurují. Nejběžnějším způsobem, jak změřit koncentraci NK, je spektrofotometrické měření.

Aromatické struktury bází NK absorbují části spektra UV-záření, přičemž nejintenzivněji absorbují záření o vlnové délce 260 nm. Platí, že míra absorpce (A_{260}) je mírou koncentrace NK v roztoku. Absorbanci o hodnotě 1,0 odpovídá koncentrace ds DNA 50 $\mu\text{g/ml}$.

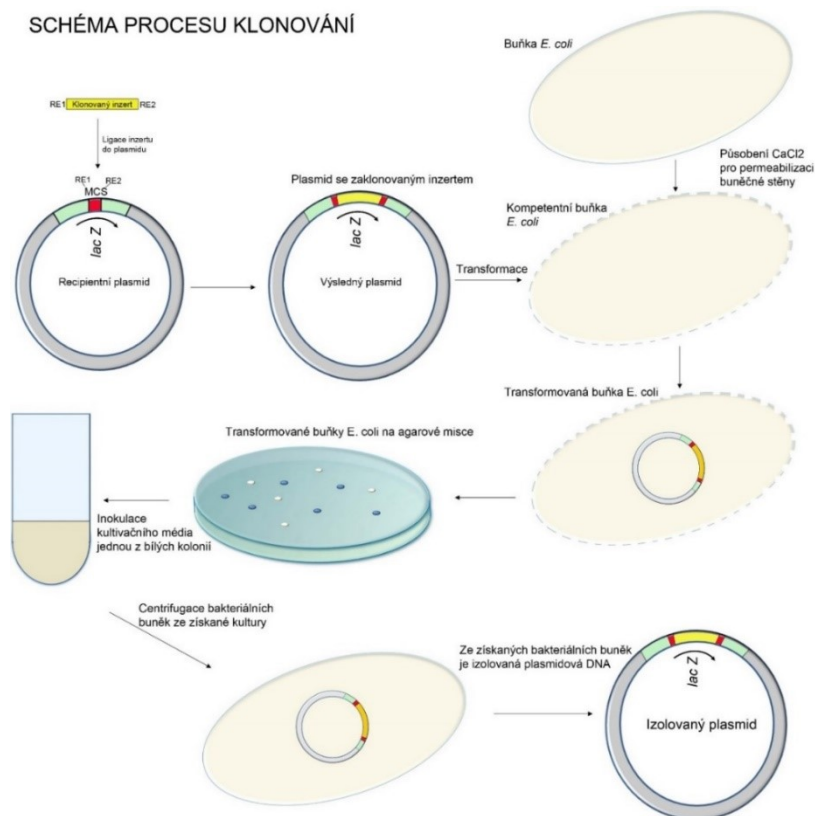
Případné kontaminace vzorku bílkovinami, které zůstaly ve vzorku i přes izolaci NK, lze zjistit poměrem absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm, jelikož bílkoviny absorbují nejintenzivněji při 280 nm. Poměr by měl být mezi hodnotami 1,8 a 2,0, aby byl podíl absorpce bílkovin při 260 nm dostatečně zanedbatelný pro výpočet koncentrace NK (Brown 2007, Raclavský 1999). Poměr absorbancí vlnových délek 260 a 230 nm by měl dosahovat hodnot větších než 1,8. Pokud této hodnoty nedosahuje, znamená to pravděpodobné znečištění vzorku organickými sloučeninami či chaotropními solemi (METTLER TOLEDO [online]).

2.7 Klonování

Klonování je metoda umožňující vytvoření klonu. Tím se rozumí přenos genetické informace za účelem vytvoření totožného souboru molekul, buňky či jedince v porovnání s původními. Procesem klonování se požadovaná genetická informace amplifikuje. Z jedné prvotní molekuly je možné získat velké množství kopií prostřednictvím replikačního aparátu hostitelské buňky.

Při molekulárním klonování není přenášena celá genetická informace, ale pouze její část, obvykle fragment NK v délce jedné až několika kbp.

Celý proces je složen z několika částí s danou posloupností. Začíná se výběrem a přípravou inzeru a vektoru a následným vložením inzeru do klonovacího vektoru. Následuje transfer rekombinovaného vektoru do hostitelské buňky, namnožení těchto buněk, a nakonec izolace vektorové DNA se zakomponovaným inzertem (Beránek 2016, LabGuide.cz² [online]).



Obr. 4: Schéma procesu klonování (LabGuide.cz² [online])

2.7.1 Klonovací vektory

Klonovací vektor je specifická DNA, která je schopna přijmout žádanou DNA (inzert) a zvýšit počet jejích kopií pomocí vlastní autonomní replikace. Klonovací vektory se liší svou kapacitou pro velikost inzertní DNA, dle toho se také vybírá, jaký typ vektoru bude použit. Aby mohl být vektor použit, musí splňovat několik požadavků. Musí nést geny, které umožňují vlastní replikaci. V jeho sekvenci musí být přítomna místa pro působení restrikčních endonukleas a musí být umožněna identifikace jeho přítomnosti v hostitelské buňce pomocí selekčního markeru.

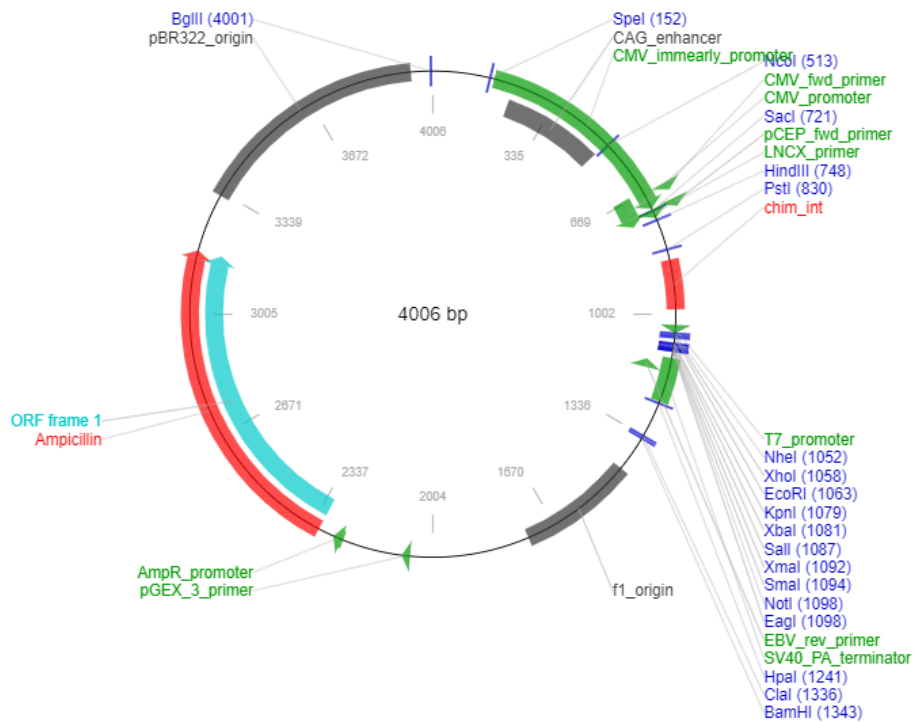
K zástupcům klonovacích vektorů patří plasmidy, kosmidy, bakteriofágy a bakteriální a kvasinkové chromozomy. Kosmidy jsou změněné plasmidové vektory, které jsou schopny přijmout inzert o velikosti až 45 kbp, např. při tvorbě genomových knihoven. Bakteriofágy jsou bakteriální viry, které v lytickém cyklu infekce využívají hostitelskou buňku k namnožení vlastní i inzertní DNA. Velikost inzertu inkorporována do fágu může být 40 až 50 kbp, u bakteriofága λ je ideální velikost mezi 9 až 25 kbp. Kvasinkové umělé chromozomy umožňují vložení inzertu DNA o délce až 1000 kbp (LabGuide.cz² [online], Pelley 2012).

2.7.1.1 Plasmidy

Plasmidy jsou samostatné extrachromozomální kruhové molekuly dvouvláknové DNA, které buňce poskytují prospěšné vlastnosti, např. schopnost odolat vlivu antibiotik. Plasmidy, stejně jako chromozomální DNA, bývají duplikovány před buněčným dělením a předány do dceřiné buňky. V technologii rekombinantní DNA byly pro nejčastější replikaci v bakterii *E. coli* optimalizovány plasmidy o velikosti 3 až 6 kbp, které jsou schopny přijmout inzert DNA dlouhý 10 až 15 kbp. Plasmidy mají ve své struktuře několik oblastí důležitých při klonování. Specifická sekvence tvořená 50 až 100 nukleotidy, která je rozpoznána polymerasou a spouští tvorbu nového komplementárního řetězce, se nazývá počátek replikace, tzv. *ori*. Dále obsahuje selekční marker, což jsou obvykle geny odpovědné za rezistenci k některému antibiotiku, které umožňují následné odlišení kolonií s přítomným plasmidem. Selekčním markerem může být také gen pro jinou vlastnost, např. gen *LacZ'* odpovědný za barevné rozlišení buněk s prázdným vektorem a vektorem s vloženým inzertem. Multiple Cloning Site (MCS) nebo také klonovací místo či polylinker, je úsek s velkým počtem restričních míst pro různé restriční endonukleasy. Transkripci inzertu u expresních vektorů řídí oblast promotoru. Oblast nasedání primeru je sekvence, na kterou nasedají primery využívané při amplifikaci či sekvenování (Addgene² [online], LabGuide.cz² [online] Pelley 2012).

pCI

PCI je expresní vektor o velikosti 4006 bp, který byl navržen pro konstitutivní expresi klonovaných inzertů DNA v savčích buňkách. Sekvence vektoru zahrnuje gen kódující rezistenci k ampicilinu. Přítomnost tohoto genu umožňuje selekci kolonií *E. coli* v agaru s obsahem zmíněného antibiotika. Začátek transkripce inzertu v plasmidu pCI je uskutečňován pomocí oblasti promotoru CMV. Úroveň genové exprese inzertu zvyšuje přítomnost zesilovače, chimerického intronu, v genomu pCI. Za intronem je přítomný T7 promotor používaný k syntéze transkriptů RNA pomocí T7 RNA polymerasy, ten je následovaný klonovacím místem pro účinky několika restričních endonukleas. K zastavení transkripčního procesu slouží terminátor, zde SV40 polyadenylační signál. (Promega [online]).



Obr. 5: Plasmid pCI (Addgene¹ [online])

2.7.2 Restrikce

Restrikcí se rozumí sestřížení kruhové molekuly vektoru za účelem vzniku lineární molekuly, aby bylo umožněno vnesení požadované molekuly DNA. Rozštěpení může podléhat také samotná molekula DNA, buď za účelem vystřížení pouze 1 genu nebo ke zkrácení dlouhého fragmentu DNA. Při klonování je důležité, aby byly molekuly DNA štěpeny přesným a reprodukovatelným způsobem, přičemž musí být molekula vektoru rozštěpena jen na 1 místě, aby nedošlo ke vzniku fragmentů.

K přerušení fosfodiesterové vazby mezi nukleotidy slouží enzym nukleasa. Ty nukleasy, co odštěpují nukleotidy z konce molekuly DNA, se nazývají exonukleasy a ty, co jsou schopny štěpit vazby uprostřed molekuly DNA, se jmenují endonukleasy (Brown 2007).

2.7.2.1 Restrikční endonukleasy

Specifické endonukleasy využívány při restrikci jsou označovány jako restrikční endonukleasy (RE). RE byly nalezeny u prokaryotických organismů, kde jejich hlavní

funkcí je ochrana hostitelského genomu před cizí, zejména bakteriofágovou, DNA (Pingoud a Jeltsch 2001).

Existují 3 typy RE, v genovém inženýrství mají však využití zejména RE typu II. Restriční endonukleasy II. typu jsou výjimečné tím, že se jejich štěpící místo nachází v místě tzv. rozpoznávací sekvence, která je charakterizována specifickou sekvencí nukleotidů. Rozpoznávací sekvencí bývá obvykle tzv. palindrom, tedy místo, kde se jsou sekvence nukleotidů v obou řetězcích identické ve směru 5'-3' (Glick, Pasternak a Patten 2010).

Některé RE štěpí DNA uprostřed rozpoznávací sekvence za vzniku tupých konců. Některé naopak neštěpí obě vlákna ve stejném místě, ale s mírným posunem. Tímto způsobem vznikají na každém vlákně přesahy, tedy kohezní konce, které jsou navzájem komplementární a mohou se párováním opět spojit.

Pokud tedy chceme rozštěpit vektor pouze na 1 místě, je nutné najít a použít restriční endonukleasy s takovou odpovídající rozpoznávací sekvencí, která se v sekvenci vektoru nachází pouze jednou.

Působením RE na DNA vzniknou fragmenty, jejichž velikost je určena štěpícím místem v původní molekule. Úspěšnost štěpení je možné nejjednodušeji odhalit pomocí gelové elektroforézy, která je schopná oddělit fragmenty dle velikosti a pomocí přidaného DNA velikostního markeru (žebříčku) lze jejich velikost odhadnout.

2.7.3 Ligace

Ligace je proces, při kterém dochází ke spojení molekuly vektoru a požadované molekuly DNA. Enzym, který toto spojení katalyzuje se nazývá DNA-ligasa. Přírodní funkcí ligasy v buňce je opravovat místo, kde mezi sousedícími nukleotidy chybí fosfodiesterová vazba. Pro genetické inženýrství je tento enzym nejčastěji izolovaný z *E. coli* infikované fágem T4.

Při ligaci může docházet ke spojení fragmentů tzv. tupými konci nebo kohezními konci. Při ligaci jsou více efektivní kohezní konce vytvořené rovnou působením některých restričních endonukleáz na vektor i na klonovanou DNA. Jak již bylo popsáno u RE, tento způsob zaručí vznik navzájem komplementárních přesahů, tak aby mohlo dojít snadno ke spojení. Ligace mezi fragmenty s tupými konci není příliš efektivní, protože mohou být spojeny pouze v momentě náhodného setkání. Tento způsob je možné provádět při vysokých koncentracích DNA. Lepším způsobem je upravit tupé konce

připojením kohezních konců. K těmto účelům slouží linkery, adaptéry či technika homopolymerního připojení (Brown 2007).

2.7.4 Transformace

Transformace je název pro příjem molekuly DNA bakteriální buňkou. Aby buňka přijatou DNA nedegradovala, musí být do buňky přijata v plasmidu, který obsahuje replikační počátek k zajištění replikace v hostitelské buňce (Brown 2007). Primer s DNA může být transformován pouze do buňky kompetentní. To znamená, že buňka musí být nějak fyzikálně či chemicky ovlivněna, aby cizí DNA přijala. K tomuto ovlivnění se používá např. studený roztok chloridu vápenatého nebo krátký teplotní šok (Glick, Pasternak a Patten 2010). K přenosu DNA lze využít také metodu elektroporace, při které se využívá krátký elektrický impulz o vysokém napětí, který vytvoří ve stěně buněk póry, jimiž může dovnitř vstoupit rekombinantní DNA (Šmarda et al. 2005).

Jako kompetentní buňky se nejčastěji využívají bakterie *E. coli*, avšak lze transformovat také do bakterií rodu *Bacillus* a *Streptococcus* (Brown 2007).

2.7.5 Selektce

Jelikož transformace je poměrně neefektivní proces, je nutné zjistit, v jakých buňkách k transformaci došlo a v jakých ne. Přijetí plasmidu s DNA lze detekovat pomocí exprese genů, které jsou nesené transformovaným plasmidem. U bakterií *E. coli* se využívá citlivosti na ATB ampicilin a tetracyklin, které obvykle inhibují růst bakterie. Pokud však u bakterie dojde k příjmu plasmidu a následné expresi genu pro rezistenci, bakterie jsou schopné růst na agaru i v přítomnosti zmíněných ATB (Brown 2007). Je nutné dodat, že k růstu kolonií dochází i u bakterií, které přijmuly plasmid bez požadovaného inzertu. Proto je nutné navíc rozlišit kolonie s plasmidem obsahujícím inzert. To je umožněno dalším selekčním markerem, např. použitím plasmidu s přítomností výše zmíněného genu *LacZ'* kódujícím vznik β -galaktosidasy schopné změnit dodaný substrát na modrý produkt (Glick, Pasternak a Patten 2010).

2.7.6 Purifikace

Purifikací se rozumí přečištění NK od nežádoucích kontaminant nacházejících se ve vzorku. Purifikace je uskutečňována jako jedna z částí izolace NK z testovaného

organismu, dále pokud je potřeba odstranit proteiny či nechtěné příměsi, např. soli od vzorku DNA či RNA. Přečištěna bývá také NK po elektroforetické separaci nebo produkty enzymatických reakcí.

V dnešní době jsou již obvykle využívány komerčně dostupné purifikační kity, jejichž součástí jsou gravitační kolonky, které kombinují principy chromatografie a centrifugace. Purifikace NK může být dosažena také pomocí fenol-chloroformu či precipitací (LabGuide.cz³ [online]).

2.8 Sekvenování

Sekvenování slouží k určení pořadí nukleotidů v NK, popisuje tedy její primární strukturu. Po procesu klonování nám sekvenování produktu umožňuje zjistit, zda celý proces proběhl úspěšně a zda byl požadovaný úsek DNA správně naklonován. Znalost sekvence DNA nám také umožňuje odvodit aminokyselinovou sekvenci kódovaného proteinu (Šmarda et al. 2005).

Dvě základní sekvenační metody byly publikovány v roce 1977. Jedná se o Gilbertovo degradační sekvenování a Sangerovo syntetické sekvenování s dideoxynukleotidy. Gilbertova metoda není v současnosti již příliš užívaná z důvodu nemožnosti automatizace pro používání toxických reagentů v průběhu sekvenačního procesu.

V dnešní době se používají automatizované sekvenační technologie, které se neopírají jen o princip Sangerova sekvenování. Existují také sekvenační metody druhé, třetí a vyšší generace, které jsou postaveny na nových odlišných postupech.

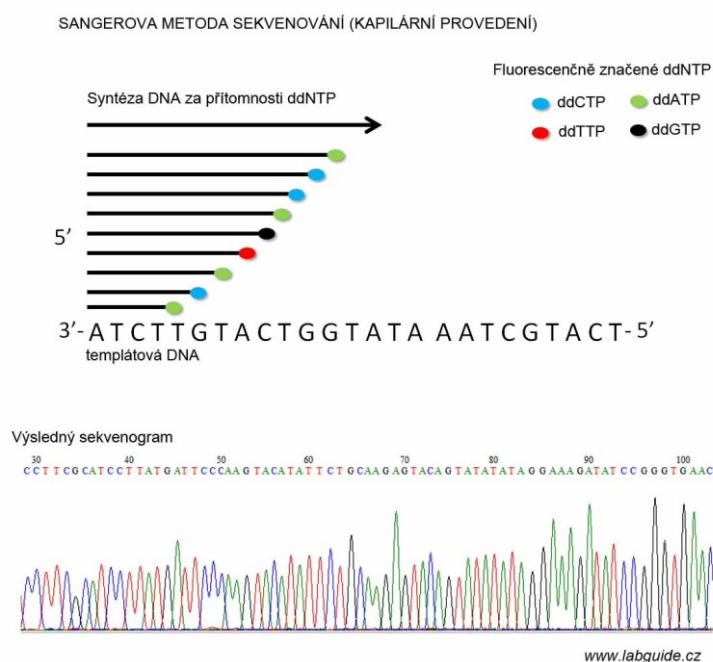
2.8.1 Sangerovo syntetické sekvenování

Sangerova metoda začíná fragmentací DNA na úseky o velikosti stovek bp, které jsou poté zaklonovány do vektoru. Po přidání a připojení sekvenačních primerů dochází k polymerační reakci zprostředkované Klenowovým fragmentem DNA polymerasy I. Reakce probíhá ve 4 zkumavkách, kde se v každé nachází všechny deoxynukleotidy a pouze jeden typ dideoxynukleotidu, kterému chybí hydroxylové skupiny na třetím uhlíku deoxyribosy. Díky tomu je po jeho navázání zastavena syntéza polynukleotidového řetězce. Aby reakce fungovala a dideoxynukleotidy se začleňovaly do řetězce se správnou pravděpodobností, je nutné dodržet optimální poměr mezi deoxynukleotidem a příslušným dideoxynukleotidem. Obvykle je tento poměr

1:100, avšak např. mezi ddATP a dATP je nevhodnější poměr 1:1. Výsledkem jsou různé dlouhé řetězce zakončené příslušným dideoxynukleotidem. Tyto fragmenty se separují současně v jednom akrylamidovém gelu a k jejich vizualizaci slouží radioizotopově značený dATP. Vyhodnocení je založeno na přiřazování jednotlivých nukleotidů k postupně rostoucím délkám fragmentů lišících se o 1 nukleotid.

2.8.1.1 Automatizace procesu

V současné době se již využívají zautomatizované sekvenační systémy. Automatizace Sangerova sekvenování je založena na využití kapilární elektroforézy. Oproti klasické elektroforéze dosahuje kapilární elektroforéza vyšší separační účinnosti i rychlosti. Umožňuje dosáhnout vyšší citlivosti, prodloužení délky čitelné sekvence a lepší separaci píků. Stejně jako u klasické elektroforézy se díky elektronegativitě fragmenty DNA pohybují k anodě rychlostí úměrné jejich délce, přičemž průchod fragmentu s dideoxynukleotidem je na detektoru pozorován jako nárůst fluorescence o známé vlnové délce. K detektoru se tedy postupně za sebou dostávají fragmenty lišící se o 1 nukleotid. K vizualizaci slouží fluorescenčně značené dideoxynukleotidy nebo 5'-konce sekvenačních primerů. Pokud je každý dideoxynukleotid označen jiným fluoforem, je možné použít pouze 1 reakční zkumavku pro 1 sekvenační reakci. Dle typu fluoforu lze určit typ příslušného dideoxynukleotidu procházejícího detektorem (Beránek 2016).



Obr. 6: Princip Sangerova sekvenování (LabGuide.cz¹ [online])

2.9 Exprese a příprava rekombinantního proteinu

Proteiny jsou syntetizovány na základě funkčních potřeb buňky. Plány k jejich tvorbě jsou uloženy v sekvenci DNA, která je při transkripci přeložena do podoby mRNA. Dle nukleotidové sekvence této mRNA je poté v procesu translace syntetizován protein na základě genetického kódu.

Translace je vícestupňový proces, ke kterému je zapotřebí přítomnost ribosomů, tRNA, mRNA, aminokyselin, ATP, GTP a dalších faktorů. Syntéza proteinů u prokaryot a eukaryot probíhá s některými odlišnostmi. Největším rozdílem je, že u prokaryot probíhá transkripce a translace současně, jelikož mRNA nemusí být nijak upravována, kdežto u eukaryot jsou procesy oddělené a probíhají postupně kvůli posttranskripčním úpravám (splicingu). Správnou strukturu a aktivitu proteinů zajišťují různé posttranslační modifikace vytvořeného proteinu, např. tvorba disulfidických můstků, glykosylace, fosforylace, acetylace atd.

Rekombinantní proteiny jsou proteiny, které vznikají na podkladě rekombinantní DNA a jsou vyprodukované cizím expresním systémem. Jejich využití je široké. Uplatňují se jak v základním výzkumu proteomu během *in vitro* experimentů, tak v aplikovaném výzkumu při přípravě proteinů s terapeutickým využitím. Proteomika zkoumá jakékoli vlastnosti proteinu jako je struktura, funkce, modifikace, lokalizace či interakce s jinými proteiny či molekulami.

Expresi a produkci rekombinantních proteinů v hostitelském organismu (expresním systému) poskytl rozvoj technologie molekulárního klonování. Díky ní jsme schopni připravit vektor, který umožňuje transport cizorodé DNA do expresního systému, jenž podle ní produkuje protein (Růčková, Müller a Vojtěšek 2014, Thermo Fisher Scientific [online]).

2.9.1 Transfekce/transformace

Aby byl hostitelský organismus schopný produkovat požadovaný protein, musí dojít k přijetí genu, který protein kóduje. Existují chemické, virové a fyzikální metody, kterými lze přijetí genu dosáhnout. Zvolený postup závisí na typu buňky, požadovaném množství proteinu a ceně. Metoda přijetí cizorodé genetické informace (rekombinantní DNA) do prokaryotické buňky se nazývá transformace. Způsoby transformace používané v genetickém inženýrství jsou již popsány v kap. 2.7.4. V případě eukaryotické buňky se jedná o tzv. transfekci.

Při chemické transfekci, se k DNA přidává látka (transfekční činidlo), která usnadňuje vstup do buňky. Principem je interakce záporně nabitých nukleových kyselin s kladně nabitými ionty transfekčního činidla. Poté pozitivně nabité komplexy fúzí se záporně nabitou buněčnou membránou, tím je vyvolána endocytóza a DNA je transportována dovnitř buňky. Jako transfekční činidlo se hojně používal DEAE-dextran či CaCl_2 . V současnosti jsou již vyvinuty novější činidla, jako např. TransFectin™ (Biorad) či Lipofectamine (ThermoFisher), alternativně také levnější varianta Polyethylenimin (PEI) (Hunter et al. 2018).

2.9.2 Expresní systémy

Existuje několik typů expresních systémů: bakteriální, kvasinkové, rostlinné, bezbuněčné, hmyzí a savčí. Při výběru systému je důležité zohlednit jaký protein chceme připravit a myslet na jeho funkci a na to jaká je požadovaná rychlost purifikace a velikost výtěžku rekombinantního proteinu (Thermo Fisher Scientific [online]).

Nejvyužívanějším expresním systémem je bakterie *E. coli*. Výhodou této bakterie je snadná kultivace, rychlost množení, nízké náklady na kultivační média a vysoké výnosy. K nevýhodám bakteriálního systému patří problémy s nedostatkem tRNA a neschopnost posttranslačních modifikací. Expresi proteinů může u *E. coli* regulovat několik promotorů, nejvýznamnější je promotor T7, dále lambda P1 a trc.

Kvasinky představují nejjednodušší eukaryotický expresní systém. Jejich předností je snadná kultivace a jednoduchá purifikace proteinů, zajištění jednoduchých posttranslačních úprav a nízké náklady. Nejhojněji využívané kvasinky jsou *Saccharomyces cerevisiae* a *Pichia pastoris*.

Vyšší náklady kultivace a větší náročnost představují hmyzí buňky infikované bakuloviry, které jsou však schopné provádět i složitější posttranslační modifikace a poskytují vysokou expresi proteinu.

Plně funkční a modifikované rekombinantní proteiny s aktivitou podobnou přirozeným proteinům vytvářejí savčí buňky. Kultivace v tomto systému je však časově i finančně nákladná a doprovázená nízkými hladinami exprese. Exprese u savčích systémů je řízená konstitutivně aktivními promotory, nejčastěji odvozenými z viru SV40 či CMV. Důležitými reprezentanty savčích systémů jsou HEK293 (human embryonal kidney) a CHO (chinese hamster ovary) (Růčková, Müller a Vojtěšek 2014). Savčí buňky

jsou důležitým zdrojem proteinů využívaných ve zdravotnictví, např. monoklonálních protilátek (Walsh 2014).

Syntéza rekombinantního proteinu je možná také bezbuněčně, *in vitro*. Buněčné extrakty mají schopnost produkovat proteiny díky přítomnosti komponentů (RNA polymerasa, transkripční faktory, ribosomy, tRNA) potřebných k transkripci, translaci i modifikaci (Thermo Fisher Scientific [online]).

2.9.3 Izolace a purifikace proteinu

Po syntéze proteinu následuje izolace požadovaného proteinu ze zdrojového systému. Postupy se liší v závislosti na tom, zda vzniká intracelulární nebo extracelulární protein. U proteinů vylučovaných do média stačí k izolaci proteinu oddělení buněk filtrací či centrifugací. V případě intracelulárních proteinů jsou buňky nejprve resuspendovány v pufru a následně rozrušeny. Většinu savčích buněk a tkání je možné poměrně snadno narušit, např. homogenizátorem nebo osmotickým šokem. Narušení mikrobiálních buněk je obtížnější, a proto je zapotřebí použití sonifikace, ošetření lysozymem, detergenty nebo chaotropními činidly. Po dokončení lze z homogenizátu získat protein opět centrifugací nebo filtrací (Walsh 2014). Izolace proteinu ze zdroje je následována jeho očištěním od dalších přítomných látek v pufru.

Selektivní purifikaci umožňují afinitní značky, kterými jsou rekombinantní proteiny opatřeny. K nejpoužívanějším značkám patří poly-histidin (6xHis), FLAG tag, poly-arginin, Strep-tag, glutathion S-transferasa a či MBP-tag (maltosu vázající protein) a další.

Histidinová kotva je značka, hexapeptid, který nijak neovlivňuje přenos a skládání proteinu, ani jeho strukturu a funkci. Při purifikaci se využívá toho, že tvoří komplex s chelatačními kovovými ionty (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} a Zn^{2+}) imobilizovanými na nosiči, např. kyselině nitrilotrioctové (Kosobokova, Skrypnik a Kosorukov 2015). Histidinové značení lze použít také k detekci a kvantifikaci takto značeného proteinu použitím protilátek zaměřeným proti samotné značce. Principem je navázání anti-His tag protilátky na povrch membrány, na které je nanesen protein. Po promytí a odstranění nenavázané protilátky, je membrána inkubována se sekundární protilátkou, která je schopna rozeznat primární protilátku. Vizualizace proteinu značeného histidinovou kotvou je umožněna detekční značkou připojenou k sekundární protilátce. Tento postup lze také použít k ověření, zda byla kotva úspěšně odstraněna při purifikaci (Walsh 2014).

Dle příslušného značení je vybrána purifikační metoda. Příkladem účinné vysoce selektivní purifikační metody je afinitní chromatografie, při které je protein díky značce navázán na chromatografickou kolonu, nenavázané proteiny jsou odmyty a žádoucí protein je z kolony uvolněn přidáním kompetitivního ligandu nebo změnou podmínek prostředí. Afinitní značka bývá enzymaticky odstraňována, jelikož může ovlivňovat vlastnosti zhotoveného proteinu. K purifikačním metodám, které nepoužívají afinitní značení, patří gelová filtrace (separace na základě velikosti), reverzně fázová chromatografie (separace podle povrchového náboje) nebo iontově výměnná chromatografie (separace podle povrchového náboje) (Růčková, Müller a Vojtěšek 2014).

3. Cíl práce

Cílem této práce byla příprava rekombinantního proteinu UDP-glykosyltransferasy vlasovky slezové v eukaryotních buňkách Expi293.

Práce vyžadovala provedení těchto dílčích kroků:

- Amplifikace kódující sekvence tří genů vlasovky slezové metodou PCR, UGT24C1, UGT365B6 a UGT368B2
- Ligace požadovaných sekvencí do expresního vektoru pCI
- Transformace plasmidu se zaklonovanou sekvencí do buněk *E. coli*
- Analýza zhotoveného plasmidu se zaklonovanou sekvencí UGT a kontrola sekvenací
- Exprese rekombinantního proteinu v Expi293
- Kontrola úspěšnosti transfekce a potvrzení exprese proteinu metodou Dot blot

4. Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

cDNA získaná z jedinců vlasovky slezové citlivého kmene ISE připravená v rámci bakalářské práce (Wengrynová 2019)

E. coli TOP10 – Life Sciences

Plasmid pCI - Addgene

Primery pro klonování navržené doc. Ing. Petrou Matouškovou, Ph.D. a syntetizovány firmou Generi Biotech

Primer pro sekvenování, Generi Biotech

Primární protilátka: Anti-6X His tag® antibody - Abcam

Sekundární protilátka: Goat Anti-Rabbit - Abcam

4.1.2 Chemikálie

Ampicilin sodium – Duchefa biochemie

Agarosa - Serva

DEPC H₂O – Sigma-Aldrich

dNTP směs – Eurogentec

Ethanol 99% (v/v) – Sigma-Aldrich

Skim Milk Powder – Sigma-Aldrich

4.1.3 Enzymy

OneTaq® Quick-Load DNA polymerasa - New England Biolabs

Restrikční endonukleasy *Mlu*I, *Eco*RI, *Nhe*I, *Xba*I – New England Biolabs

T4 DNA ligasa – Jena Bioscience

4.1.4 Markery

DNA ladder 1 kb - New England Biolabs

Loading dye solution (6x) – New England Biolabs

SYBR Safe DNA Gel Stain – Thermo Fisher Scientific

4.1.5 Kity

DNA clean & concentrator[®]-5 - ZymoResearch

ECL Prime Western Blotting detection reagent - Amersham

NucleoSpin Plasmid – Macherey-Nagel

The Expi293[™] Expression System Kit - Thermo Fisher Scientific

ZymoPURE[™] II Plasmid Midiprep Kit – ZymoResearch

4.1.6 Pufry a média

LB médium (*Luria-Bertani*) – VWR Biochemicals

Lyzační roztok – složení: 50 mM Tris/HCl pH7,4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 40 mM β -glycerolfosfát, 50 mM fluorid sodný, 10 mM pyrofosfát sodný, 2 mM dithiotreitol, 200 μ M vanadičnan sodný, H₂O, směs inhibitorů (Sigma-Aldrich), 100 mM fenylmethansulfonylfluorid

S.O.C médium - Invitrogen

TAE pufr – složení: Tris, kyselina octová, 50 mM EDTA, dH₂O

TBST pufr – složení: 150 mM NaCl, redestilovaná H₂O, Tween 20, 0,1 M TRIS pufr pH 8,0

4.2 Technické vybavení a pomůcky

4.2.1 Přístroje

Autokláv – SHP Steriltechnik AG

Automatické pipety – Research Plus, Eppendorf

Blot Scanner – C-Digit 3600, Li-cor

Box s laminárním prouděním – Aura SD4 vertical, BioAir

Centrifuga – Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Scientific

Centrifuga – 5415 D, Eppendorf

Centrifuga – 5810 R, Eppendorf

Inkubátor – Incubat 80, Melag

Inkubátor – Heracell, Thermo Fisher Scientific

Inverzní mikroskop – NIB-100, Novel Optics
Hlubokomrazicí boxy – Vxe Series Jouan, Thermo Fisher Scientific
Horizontální elektroforéza – Thermo Scientific™ Owl™ EasyCast™ B1A Mini Gel Electrophoresis Systems
Horizontální elektroforéza – FHU6, Mini Submarine Gel, Fisher Scientific
Horizontální elektroforéza – B2, Owl, Chemos
Laboratorní váha – M-Prove, Sartorius
Minicentrifuga – Sprout, Heathrow Scientific
Mikrovlnná trouba – Zanussi
PCR cykler – MJ mini, Bio-Rad
PCR cykler – Biometra TAdvanced Twin 48, Analytik Jena
Spektrofotometr – NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific
Termoblok - Thermomixer comfort, Eppendorf
Třepačka – Duomax 1030, Heidolph
Třepavý inkubátor – NB-205, N-Biotek
Vodní lázeň s termostatem - Memmert
Vortex – Vortex V-1, BioSan
Výrobník ledové tříště – Ice Makers, Brema
UV transluminátor – UVT-20 SE, Herolab
Vizualizace gelů – Gel Doc, BioRad
Zdroj pro elektroforézu – PowerPac Basic, BioRad

4.2.2 Pomůcky

Špičky Eppendorf, mikrozkušavky Eppendorf, laboratorní sklo (Erlenmayerovy baňky, kádinky, odměrné válce), kahan, Bürkerova komůrka, hokejky, falkony, parafilm, Petriho misky, pinzeta, rukavice, stojany na zkumavky a mikrozkušavky

4.3 Pracovní postupy

4.3.1 PCR amplifikace vybraných UGT sekvencí cDNA z vlasovky slezové

Izolace genu kódující vybrané UGT byla provedena metodou PCR. Jako templát byla použita cDNA získaná z vlasovky slezové. Na základě sekvence UGT byly navrhnuté primery obsahující místa pro restriční endonukleasy, jež byly použité v dalším kroku – restrikci. Použité primery a názvy restričních endonukleas jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1: Amplifikované geny a k nim příslušné primery

UGT	Primer: RE	Sekvence primeru
24C1	F: EcoRI	CGT <u>GAA TTC</u> ATG TTG ATC TCA TTC T
	R: XbaI	TTA <u>TCT AGA</u> TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG TTC CTT CTT AGC TTT
365B6	F: NheI	TAT <u>GCT AGC</u> ATG ATT CGC TAC TGT G
	R: XbaI	TAT <u>TCT AGA</u> TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG TTC AAT TTT AGT TTT AGC
368B2	F: MluI	TAT <u>ACG CGT</u> ATG CTA GCT CTG CTA C
	R: XbaI	GGT <u>TCT AGA</u> TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATG TTC AAT TTT TTG CTT TAG

F = forward primer, R = reverse primer. V sekvenci každého primeru je podtržením vyznačeno místo pro příslušnou restriční endonukleasu. Reverse primer obsahuje navíc 6x HisTag (6x ATG kódující 6x histidin v opačném-kódujícím řetězci, vyznačeno tučně).

PCR reakční směs byla vytvořena dle tab. 2, kdy pro všechny 3 vzorky byl vytvořen MasterMix dohromady z 3,5násobného množství. Do každé zkumavky bylo odebráno 47 μ l Master Mixu a přidána příslušná templátová DNA a odpovídající primery. Reakce byla spuštěna v PCR cyklieru při podmínkách uvedených v tab. 3.

Tab. 2: Složení PCR směsi

Komponenta	Objemy pro 1 reakci [μl]	Master Mix: 3,5násobek [μl]
OneTaq®Standart reaction buffer	10	35
10 mM dNTPs	1	3,5
10 μM FP	1	-
10 μM RP	1	-
Templátová DNA	1	-
OneTaq® Quick-Load DNA polymerase	0,25	0,875
PCR H ₂ O	35,75	125,125
Celkový objem	50	164,5

Tab. 3: Podmínky PCR reakce

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Iničiační denaturace	94	30 s	1
Denaturace	94	15 s	30
Annealing	55	20 s	
Extenze	68	100 s	
Finální extenze	68	5 min	1

4.3.2 Agarosová elektroforéza

Ke kontrole kvality a velikosti vytvořeného PCR produktu byl použit 1,0% gel agarosy. Množství gelu bylo upraveno podle velikosti použité aparatury. Gel byl připraven rozmícháním agarosy v 1x TAE pufru v Erlenmayerové baňce. Roztok agarosy byl zahříván 1-1,5 minuty v mikrovlnné troubě, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění. Jakmile lehce zchladnul (ale nezuhl), byl nalit do připravené formy na gel a byl do něj upevněn hřeben. Po zatuhnutí byl hřeben vyjmut, gel umístěn do umyté aparatury a přelit 1x TAE pufrem. Na parafilmu bylo promícháno 5 μl vzorku s 1 μl nanášecí barvy obsahující barvivo pro vizualizaci (DNA *Gel stain*). Do první jamky gelu byly nanášeny 2 μl 1 kb DNA marker a do dalších vždy celý objem kapky příslušného vzorku z parafilmu. Příslušná aparatura byla spuštěna na 100 V na cca 30 minut.

V případě použití jiné aparatury bylo napětí i čas upraven. Po proběhlé elektroforéze byl gel zkontrolován pod UV-transluminátorem a poté vyfocen kamerou pro vizualizaci gelu.

Pokud byla elektroforéza použita k velkému množství vzorků (např. u screeningu kolonií), bylo do ještě neztuhlého gelu přidáno 0,5 μ l barviva DNA *stain G* a vzorky byly nanášeny přímo na gel bez barvení, protože byl použit zelený pufr pro rychlé znázornění.

4.3.3 Přečištění DNA produktu a měření koncentrace po PCR

Po každé proběhlé PCR byly získané DNA produkty přečištěny pomocí kitu *DNA clean & concentrator*[®]-5 dle návodu uvedeného v příloze (10.1).

U přečištěných produktů byla změřena koncentrace a čistota DNA na NanoDropu.

4.3.4 Restrikce DNA

Po vytvoření reakčních směsí dle tab. 4 byly směsi inkubovány po dobu 60 minut při 37 °C.

Jakmile štěpné směsi vychladly, byly produkty přečištěny, zkoncentrovány a byla změřena jejich koncentrace, viz krok 4.3.3.

Tab. 4: Složení restrikční směsi

Vzorek	RE [μ l]	RE [μ l]	Cutsmart buffer [μ l]	DNA [μ g]	H ₂ O [μ l]
UGT24C1	0,5 EcoRI	0,5 XbaI	2,5	0,5	Do 25
UGT365B6	0,5 NheI				
UGT368B2	0,5 MluI				
pCI pro UGT24C1	0,5 EcoRI				
pCI pro UGT365B6	0,5 NheI				
pCI pro UGT368B2	0,5 MluI				

Směs by měla obsahovat přibližně 0,5 μ g DNA na celkový objem 25 μ l směsi. V případě vyšších koncentrací DNA byly komponenty reakce upraveny na vyšší objemy směsi.

4.3.5 Ligace

Ze změřených koncentrací přečištěných produktů z proběhlé restrikce bylo vypočítáno potřebné množství vzorku do ligace pomocí vzorce:

$$\text{množství inzertu (v ng)} = \frac{\text{množství vektoru (v ng)} \times \text{velikost inzertu (v kbp)}}{\text{velikost vektoru (v kbp)}}$$

Množství vektoru = cca 100 ng

Velikost vektoru = 4,006 kbp

Velikost inzertu = cca 1,6 kbp

K výpočtu posloužil kalkulátor dostupný na webové stránce Labguide.cz (<https://labguide.cz/vypocty/vypocet-mnozstvi-inzertu-ligovaneho-do-vektoru/>).

Vypočítané množství inzertu bylo vynásobeno třemi, aby byl splněn vhodný poměr mezi počtem konců inzertu a počtem konců vektoru, nejčastěji 3:1.

Ligační směs o objemu 20 μ l byla smíchána z komponent uvedených v tab. 5 a byla inkubována přes noc v PCR cykleru při 16 °C.

Tab. 5: Složení ligační směsi

Komponenty	[μ l]
T4 DNA Ligasa	0,5
T4 DNA Ligation Buffer	2
pCI	X
DNA-UGT	Y
H ₂ O	Do 20
Celkový objem	20

X=objem pCI vypočítaný ze změřené koncentrace tak, aby směs obsahovala cca 100 ng.

Y=objem DNA-UGT vypočítaný ze změřené koncentrace tak, aby směs obsahovala množství vypočítané pomocí výše uvedeného vzorce.

4.3.6 Příprava živného média

Jako živné médium pro experimenty byla použita prášková směs agarů s LB médiem. Pro přípravu 10 misek bylo rozmícháno 7 g směsi na 200 ml vody. Po rozrušení hrudek a důkladném rozpuštění byl připravený roztok autoklávován 20 minut na 121 °C. Pokud před vylíváním na misky agar ztuhl, byl rozehríván v mikrovlnné troubě cca 3 minuty s průběžným promícháváním. Na vydezinfikované ploše u zapáleného kahanu bylo k 200 ml tekutého agarů přidáno 200 μ l Ampicilinu o koncentraci 50 mg/ml. Do každé misky (\varnothing 10 cm) bylo napipetováno cca 20 ml živného

média, tak aby nedošlo ke kontaminaci. Po ztuhnutí agaru (15-20 minut), byly misky oblepeny parafilmem a uloženy do lednice nachystány pro další krok.

4.3.7 Transformace kompetentních buněk *E. coli* TOP10

Před zahájením práce bylo nezbytné vyčištění plochy a rukavic 70% lihobenzínem k zabránění případného vnesení cizího biologického, či jiného materiálu do vzorků. Z toho důvodu bylo nutné pracovat při zapáleném kahanu. K práci musely být využity sterilní špičky a pipety určeny k těmto úkonům.

K transformaci provedené teplotním šokem byly použity kompetentní buňky bakterie *E. coli* TOP10 uchovávané při -80 °C, které se těsně před transformací nechaly roztát na ledu.

5 µl ligační směsi každého vzorku bylo samostatně přidáno k 50-100 µl *E. coli*. Buňky byly po celou dobu práce umístěny na ledě a po jemném promíchání pipetou zůstaly na ledě 30 minut. Po uvedené době byly na 45 sekund vloženy do vodní lázně o teplotě 42 °C a hned poté uloženy zpátky na led na minimálně 2 minuty. K takto teplotně ovlivněným buňkám bylo přidáno 150 µl S.O.C média a celý obsah byl inkubován na třepačce při 37 °C 60 minut s rychlostí třepání 200 rpm. V momentě vložení *E. coli* do inkubátoru byly dány k předehřátí na 37 °C i misky s živným médiem.

Pro každý gen byly použity dvě misky, na jednu bylo nakapáno 50 µl a na druhou 100 µl transformovaných *E. coli*. Nakapání různého množství umožnilo optimalizaci hustoty narostlých kolonií *E. coli*, tak aby bylo možné provést jejich následné odebrání. Nakapaná tekutina s kulturou byla rozetřena po celém povrchu agaru sterilní hokejkou a po zaschnutí byly misky přeneseny do inkubátoru nastaveného na 37 °C a ponechány přibližně 24 hodin. Po vytažení misek z inkubátoru, byly na agaru viditelně narostlé kolonie *E. coli*. Misky byly uloženy do lednice pro pozdější experimenty.

4.3.8 Screening kolonií

Screeningem kolonií je myšlena kontrola cca 20 vybraných kolonií od každého genu pro PCR a elektroforézu. Pomocí PCR a následné elektroforézy bylo možné určit, zda v příslušné kolonii *E. coli* došlo k replikaci námi transformovaného plasmidu obsahujícího UGT sekvenci.

Následující práce opět probíhala na vydezinfikované ploše při kahanu.

Každá vybraná kolonie byla označena číslem pro umožnění pozdější identifikace. U vybraných kolonií bylo z misky setřeno malé množství sterilní špičkou pipety a přeneseno do mikrozkušavek pro PCR, ve kterých bylo nachystáno 10 µl ddH₂O. Pipetou byly odebrané kolonie důkladně rozmíchány. Před přidáním Master Mixu byly buňky podrobeny 94 °C na dobu 10 minut, což vedlo k rozložení buněk a zpřístupnění plasmidu. Pro každý gen byl připraven Master Mix dle tab. 6 a ke každému vzorku bylo napipetováno 10 µl. Reakci byla podrobena také ligační směs použitá k transfekci. Její použití posloužilo ke kontrole a porovnání při elektroforéze. PCR byla spuštěna za podmínek uvedených v tab. 3 (viz 4.3.1).

Následovala elektroforéza produktů, kdy se na gel nanášelo 10 µl vzorku. Na hotovém gelu byly hledány proužky, které by odpovídaly velikosti inzertu (cca 1,6 kbp).

Tab. 6: Složení Master Mix pro colony-PCR

Komponenta	Objemy pro 1 reakci [µl]	Master Mix (23rc) [µl]
OneTaq® Quick Load reaction green buffer	4	96
10 mM dNTPs	1	24
10 µM FP	0,5	12
10 µM RP	0,5	12
OneTaq® Quick-Load DNA polymerase	0,1	2,4
PCR H ₂ O	3,9	93,6
Celkový objem	10	240

Ke každým 10 µl H₂O s kolonií bylo přidáno 10 µl připraveného Master Mixu. Použité FP a RP jsou uvedeny v tab. 1 (u 4.3.1). MM byl vytvořen pro 23 reakcí – 20 pro vzorky kolonií, 1 pro kontrolní reakci s ligační směsí a 2 rezervní objemy pro chyby při pipetování.

4.3.9 Odebrání a přeočkování pozitivních kolonií

Pro vyizolování dostatečného množství plasmidu s UGT bylo potřeba namnožení vybrané pozitivní kolonie *E. coli* v LB médiu s ampicilinem jako selekčním markerem.

4 ml sterilního LB média a 4 µl ampicilinu byly napipetovány do sterilní inkubační zkumavky, do které byla odebrána kolonie z misky pomocí sterilní špičky 10µl pipety a pořádně promíchána. V případě namnožení většího množství, bylo do sterilní

Erlenmayerovy baňky napipetováno 50 ml sterilního LB média a 50 µl ampicilinu a opět přidána příslušná kolonie.

Bakteriální kultura byla vložena do inkubátoru na 24 hodin s nastavenou teplotou 37 °C s rychlostí třepání 200 rpm. Pomnožení buněk bylo viditelné jako zákal média.

4.3.10 Izolace a purifikace plasmidu a kontrola pomocí PCR a elektroforézy

Následující den po odebrání kolonií byla provedena izolace plasmidu z namnožených buněk.

Namnožené kultury byly zcentrifugovány a odlitím supernatantu byly odděleny pelety, které byly dále zpracovány. V případě malého objemu média byl k izolaci plasmidu a přečištění použit kit *NucleoSpin® Plasmid*. V případě většího objemu byl využit *ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep Kit*. Veškeré prováděné činnosti byly popsány v návodech kitů, které jsou uvedeny v příloze (10.2, 10.3).

Izolované plasmidy byly změřeny na NanoDropu a byla stanovena jejich koncentrace. Následně proběhla kontrola, zda namnožené buňky opravdu obsahují žádoucí inzert v plasmidu. Získaný materiál byl podroben PCR a elektroforéze, přičemž na gelu byl opět hledán pruh, který by přítomnost inzertu potvrdil. Pokud se přítomnost potvrdila, vzorky bylo možné nechat osekvenovat.

4.3.11 Příprava vzorku k sekvenování

K 5 µl vzorkům plasmidové DNA bylo napipetováno 5 µl příslušného 5µM primeru. Vzorky byly poslány do Eurofins Genomics k Sangerovu sekvenování.

4.3.12 Pasáž Expi293 buněk

K experimentům byl použit *The Expi293™ Expression System Kit*. Expi293 jsou suspenzní lidské embryonální buňky ledvin.

Buněčná suspenze byla uchovávána ve 250ml Erlenmayerových baňkách v inkubátoru při 37 °C s 8% koncentrací CO₂ a třepáním 120 rpm. Pasážování buněk je prováděno z důvodu výměny živného média, které zajišťuje novou výživu a rozmnožení. Aby byl zajištěn stabilní růst buněk, pasážování musí být opakováno 2krát týdně.

Při přípravě nové kultury buněk bylo nutné spočítat koncentraci buněk přenášenou do sterilní baňky a zkontrolovat jejich životnost. Ze suspenze byl odebrán 1 ml suspenze do zkumavky a následně bylo z této zkumavky odebráno 20 μ l a ředěno 1:1 s trypanovou modří.

Trypanová modř umožnila kontrolu životnosti buněk, pokud došlo ke zmodrání buněk, byly považovány za mrtvé, přičemž životnost by měla dosahovat více než 90 %. Životnost buněk v tomto experimentu dosahovala ke 100 %.

10 μ l směsi bylo nanášeno do Bürkerovy komůrky pro výpočet koncentrace buněk v suspenzi. Dle vypočtené koncentrace bylo spočítáno kolik ml buněčného roztoku je potřeba přenést do sterilní Erlenmayerovy baňky do výsledného objemu 30 ml, aby počet buněk dosahoval 600 tisíc buněk na 1 ml suspenze. Pasáž probíhala každý 3.-4. den při dosažení koncentrace 3-5 mil buněk/ml.

V případě přípravy buněk pro transfekci byla zároveň připravena suspenze o koncentraci 2,5 mil buněk/ml.

4.3.13 Transfekce Expi293 buněk

Do transfekce byly využity osekvenované produkty klonování, purifikované plasmidy s inzertem.

Suspenze buněk připravená k transfekci byla inkubována do druhého dne, během kterého došlo k zdvojnásobení jejich koncentrace na přibližně 4-5 mil/ml. Z ní bylo odebráno takové množství, aby byla připravena další nová suspenze o objemu 5 ml s koncentrací 3 mil/ml. To odpovídalo 15 milionům buněk, což bylo dostačující pro kontrolu funkčnosti transfekce a tvorby proteinu pomocí Dot blot.

Ve zkumavce bylo rozpuštěno 5 μ g DNA (připravený plasmid s UGT) v 300 μ l Opti-MEMTM transfekčního média. Jako pozitivní kontrola, která odhalila, zda k transfekci došlo, byl místo plasmidu s UGT použit plasmid s genem pro *green fluorescent protein* (pmaxGFP).

Ve druhé zkumavce bylo v 280 μ l Opti-MEMTM média rozpuštěno 16 μ l transfekčního činidla *ExpiFectamine*. Po promísání byl roztok činidla *ExpiFectamine* přepipetován do zkumavky obsahující DNA a obsah byl promíchán pipetou. Transfekční činidlo umožňuje vstup DNA do buňky. Po 20 minutách ustálení při pokojové teplotě byla směs nakapána k připravené suspenzi buněk.

Po 18-22 hodinách bylo ke směsi přikapáno 30 μ l *Enhancer 1* a 300 μ l *Enhancer 2* z kitu s cílem zvýšit účinnost transfekce.

Takto připravené buňky byly inkubovány po dobu 72 hodin. Po 72 hodinách byla zkontrolována kontrolní transfekce s GFP. Úspěšná transfekce byla prokázána zeleným zbarvením a schopností fluorescence buněk.

4.3.14 Sběr a lyzace Expi293 buněk

Sběrem buněk se rozumí odebrání transfekovaných buněk a jejich lýza za účelem uvolnění proteinů z buněk.

Po 72hod inkubaci s plazmidem obsahujícím gen kódující UGT byla z Erlenmayerových baněk slita suspenze do falkon a odebrané vzorky byly stočeny při 1000 x g po dobu 5 minut. Po odstředění byl supernatant slit a k vzniklým peletám byl přidán 1 ml lyzačního roztoku. Po řádném promíchání pipetou byly vzorky ponechány 40 minut při pokojové teplotě. Po uvedeném čase a vortexování byl každý vzorek 10krát homogenizován přes stříkačku, aby byla zajištěna důkladná dezintegrace buněk. Následně se vzorky nechaly ustálit 10 minut při pokojové teplotě. Vzorky bylo nutné stočit 5-10 minut na 10 000 x g při -4°C. Vzniklé supernatanty byly uchovávány při -20 °C.

4.3.15 Ověření úspěšnosti transfekce metodou Dot blot

Dot blot posloužil k ověření, zda došlo úspěšně k transfekci. Detekce byla umožněna inkubací s primární králičí protilátkou Anti-6X HisTag a sekundární kozí protilátkou Anti-Rabbit s navázanou křenovou peroxidasou a následným použitím *ECL Prime Western Blotting detection reagent*.

Na nitrocelulosovou membránu o velikosti přibližně 9 x 9 cm byly slabě vyznačeny tečky, vzdáleny od sebe 1,5 cm, znázorňující místo aplikace vzorku. Vzorky byly napipetovány na membránu dle schématu a v objemech uvedených v tab. 7. Jako pozitivní kontrola byl použit vzorek, který obsahoval HisTag a který byl ověřen v předchozích experimentech.

Tab. 7: Schéma umístění vzorků na membráně při Dot blot.

	1 μ l	2 μ l	3 μ l	5 μ l	10 μ l
368B2	•	•	•	•	•
Expi293	•	•	•	•	•
GFP	•	•	•	•	•
Pozitivní kontrola	•	•	•		

K zalití membrány bylo připraveno 5% mléko v 0,05% TBST pufriu. Po nanesení všech vzorků na membránu, byla membrána přelita připraveným mlékem. Takto se inkubovala 2 hodiny při pokojové teplotě na kývačce. Po dvou hodinách následovalo promývání roztokem 0,05% TBST pufrem 4krát po 15minutových intervalech. Po promytí byla k membráně přidána primární králičí protilátka proti HisTag a v ní se nechala membrána inkubovat přes noc. Další den byla slita primární protilátka a membrána byla opět 4krát promyta 0,05% TBST pufrem po 15minutových intervalech. Poté byla přelita na dobu 1 hodiny sekundární protilátkou. Po odlití sekundární protilátky, byla membrána opět promývána 4x15 minut 0,05% TBST pufrem. Závěrečným krokem bylo připravení substrátu křenové peroxidasy smícháním roztoku A (luminolu) a B (peroxidu) z *Amersham* reakčního kitu v poměru 1:1, přelití membrány substrátem a 5minutová inkubace ve tmě. Po všech krocích následovalo vyhodnocení na přístroji C-Digit.

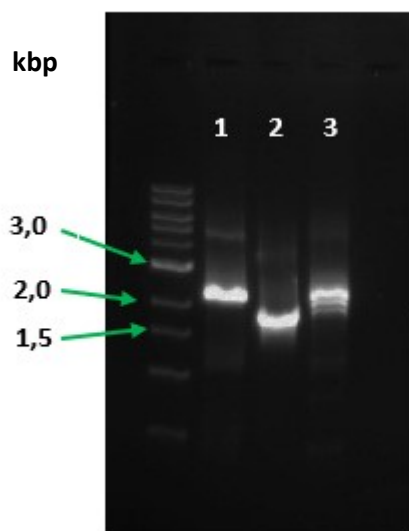
5. Výsledky

5.1 Příprava inzertů

Komplementární DNA izolovaná z jedinců vlasovky slezové byla za účelem amplifikace celých genů ohraničena primery odpovídající požadovaným sekvencím UGT. Navrhnuté a použité primery obsahovaly také cílové sekvence, které byly žádoucí pro působení restričních endonukleáz.

Po počáteční PCR byla kontrolována její účinnost a vznik produktů s odpovídající velikostí. Velikost amplifikovaných úseků umožnila vizualizovat agarosová elektroforéza. Produkty byly nanášeny na 1% agarosový gel. Do první jamky byl nanášen 1 kbp DNA marker, který sloužil k určení přibližné velikosti dalších nanášených vzorků.

Na obr. 7 jsou ve sloupcu 1-3 viditelné 3 výrazné produkty. Každý fragment patří jedné z namnožených sekvencí příslušné UGT. Délka DNA vypočítaná z referenční sekvence pro UGT24C1 je 1524 bp, UGT365B6 je 1521 bp a pro UGT368B6 1524 bp. Délka namnožených produktů byla zároveň prodloužena o úseky primerů, které obsahovaly navíc sekvenci nukleotidů kódující 6 histidinů, tzv. histidinovou kotvu, a místa pro působení restričních endonukleas pro následné klonování. Ve sloupci 1 a 3 jsou pruhy při porovnání s DNA markerem v hodnotách vyšších než 2, i tak bylo předpokládáno, že byly namnoženy správné úseky DNA a produkty byly dále využity.



Obr. 7: Výstup elektroforézy po první PCR – amplifikaci genů UGT ohraničené primery pro restriční endonukleázy. Sloupec 1=UGT24C1, sloupek 2=UGT365B6, sloupek 3=UGT368B2

Po potvrzení přítomnosti genu elektroforézou, byly produkty přečištěny a zakonzentrovány. Tento způsob umožnil získat množství NK o určité koncentraci a čistotě uvedené v tab. 8. Poměry absorbancí změřených vlnových délek odpovídají hodnotám větším než 1,8, což svědčí o vysoké čistotě vzniklých produktů. Takto amplifikované vzorky mohly být použity do dalších experimentů.

Tab. 8: Koncentrace a čistota PCR produktů UGT naměřené na NanoDropu

Vzorek	Koncentrace [ng/ul]	A260	A280	260/280	260/230
UGT24C1	48,23	0,965	0,508	1,9	1,99
UGT365B6	70,25	1,405	0,737	1,91	2,07
UGT368B2	51,81	1,036	0,576	1,80	1,9

5.2 Klonování

Po restrikční reakci provedené zvolenými restrikčními endonukleasami, které rozštěpily získané produkty v úsecích inkorporovaných do primerů, byly vzorky opět přečištěny. Stejným způsobem (štěpení a přečištění) byl ošetřen také plasmid pCI. Jakmile byly vzorky přečištěny, byla změřena koncentrace a čistota DNA v každém vzorku. Tyto koncentrace jsou uvedeny v tab. 9. Koncentrace bylo nutné změřit kvůli výpočtu množství vzorku potřebného do ligace. Do ligační reakce bylo použito takové množství DNA, které bylo dle rovnice vypočítáno tak, aby hodnoty odpovídaly 100 ng vektoru.

Tab. 9: Koncentrace a čistota PCR produktů UGT a plasmidu po restrikci naměřené na NanoDropu

Vzorek	Koncentrace [ng/ul]	A260	A280	260/280	260/230
UGT24C1	73,64	1,473	0,81	1,82	2,05
UGT365B6	74,73	1,495	0,82	1,82	1,95
UGT368B2	31,93	0,639	0,353	1,81	1,81
pCI pro UGT24C1	28,37	0,567	0,31	1,83	1,99
pCI pro UGT365B6	32,34	0,647	0,387	1,67	1,88
pCI pro UGT368B2	18,94	0,379	0,205	1,85	2,47

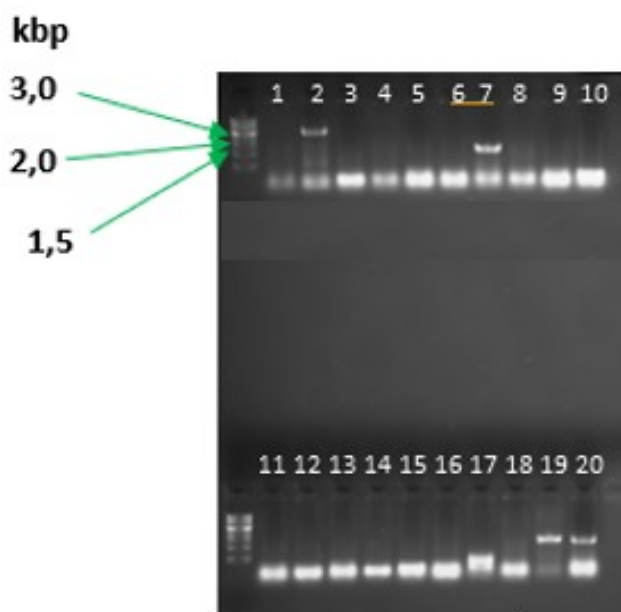
Po ligaci byly vzorky použity k transformaci do kompetentních buněk *E. coli* s využitím metody teplotního šoku.

5.3 Screening kolonií

E. coli byly naočkovány na agar obsahující antibiotikum ampicilin. Vzhledem k tomu, že primer pCI má ve své struktuře gen odpovědný za rezistenci k ampicilinu, byla přítomností ampicilinu v agaru umožněna selekce buněk s přítomným transformovaným primerem,

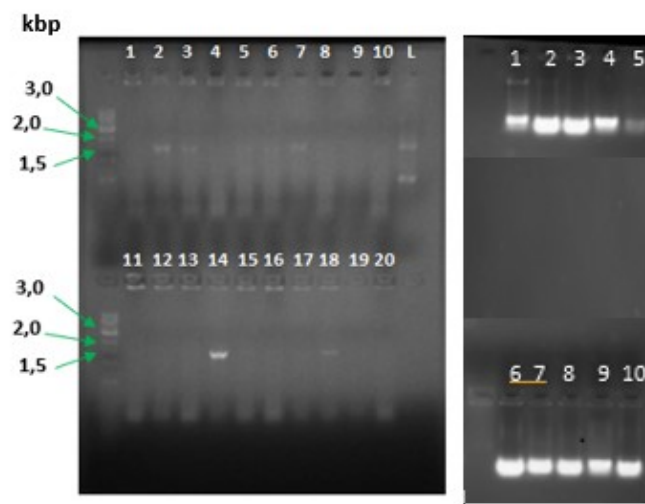
Po odebrání vzorků z vybraných kolonií byla provedena PCR reakce a produkty reakce byly separovány na elektroforetickém gelu. Z přítomnosti a velikosti pruhu bylo posuzováno, zda vybraná kolonie obsahuje klonovaný primer se zabudovaným genem pro příslušné UGT.

Z nízkého počtu kolonií pozitivních na přítomnost zaklonovaného plasmidu, lze usuzovat, že ligace nebyla pravděpodobně příliš efektivní. Důvodem patrně mohlo být, že vektor nebyl zcela doštěpen, a proto byla úspěšnost zaligování požadovaného genu tak nízká. Avšak i přes tuto situaci byly některé kolonie pozitivní.



Obr. 8: Kontrola úspěšnosti ligace u vybraných kolonií s UGT368B2.

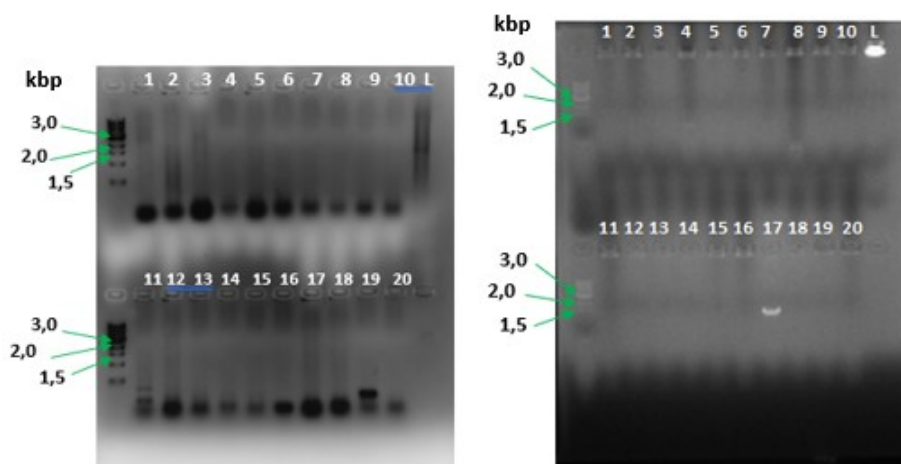
Na obr. 8 je možné vidět výsledky z elektroforézy pro 20 vzorků UGT368B2. Pro další přeočkování byly vybrány kolonie 7, 19 a 20.



Obr. 9: Kontrola úspěšnosti ligace u vybraných kolonií s UGT24C1.

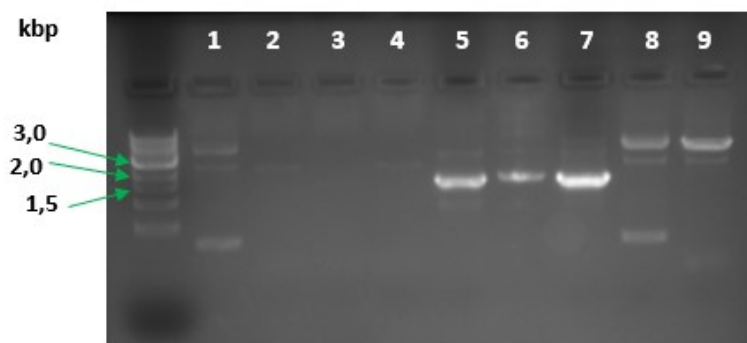
Na obr. 9 jsou výstupy elektroforézy se vzorky kolonií s UGT24C1. Nejprve bylo odebráno 10 vzorků. Z 10 zvolených kolonií byly zvoleny kolonie 1 a 2 (napravo), u kterých bylo možné vidět pruhy spíše při prosvícení gelu UV transluminátorem než na fotografii gelu. Po namnožení těchto dvou kolonií bylo zjištěno, že ani jedna kolonie vložený gen neobsahovala, a proto musel být proces klonování opakován. Výsledky z tohoto druhého klonování, po kterém bylo odebráno 20 kolonií, jsou na obr. 9 nalevo. Zde byla přeočkována a namnožena kolonie 14.

Při screeningu 20 kolonií s transformovanými plasmidy s UGT365B6, byly pod UV transluminátorem spatřeny odpovídající pruhy u kolonií 2, 3 a 10, které však nejsou na fotografii gelu viditelné (obr. 10 nalevo). Po namnožení se však přítomnost plasmidu nepotvrdila, proto bylo i u této UGT klonování opakováno. Z dalších 20 kolonií byla namnožena kolonie č. 17 (obr. 10 napravo).



Obr. 10: Kontrola úspěšnosti ligace u vybraných kolonií s UGT365B6.

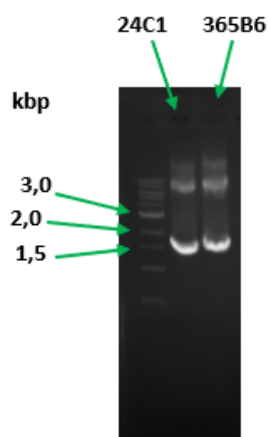
Vzorky kolonií označené při screeningu za pozitivní byly nejprve namnoženy ve 4 ml LB média, poté podrobeny izolaci, purifikaci a PCR. Pokud se při elektroforéze PCR produktů potvrdila přítomnost primeru s příslušnou UGT, byly vzorky namnoženy v 50 ml LB média.



Obr. 11: Elektroforéza provedená po PCR pro kontrolu inzertu v plasmidu o velikosti cca 1,6 kbp. Čísla 1 a 8 odpovídají UGT24C1; 2, 3 a 4 pro UGT365B6 a 5, 6, 7 a 9 pro UGT368B2.

Na obr. 11 se nachází výsledky po prvním klonování všech třech UGT po namnožení ve 4 ml LB média. Pro následné namnožení ve větším množství a k sekvenaci byl vybrán vzorek č. 7, který odpovídal kolonii č. 20 z obr. 8 s přítomnou UGT368B2.

Po opětovném klonování byly namnoženy a pomocí PCR a elektroforézy zkontrolovány 2 kolonie pro UGT24C1 a 365B6 (kolonie č. 14 z obr. 9 a kolonie č. 17 z obr. 10 napravo). Jelikož elektroforéza potvrdila přítomnost klonovaných UGT (obr. 12), byly tyto kolonie taktéž namnoženy ve větším množství a následně byly i tyto vzorky poslány k sekvenaci.



Obr. 12: Elektroforéza provedená po PCR pro kontrolu inzertu v plasmidu o velikosti cca 1,6 kbp u UGT24C1 a 365B6

V tab. 10 jsou uvedeny změřené koncentrace namnožených vzorků plasmidu se zaklonovanými UGT. Podařilo se získat vzorky o vysoké koncentraci i čistotě. Poměry absorbancí vykazovaly hodnoty vyšší než 1,9, což svědčí o dobré kvalitě připravených vzorků.

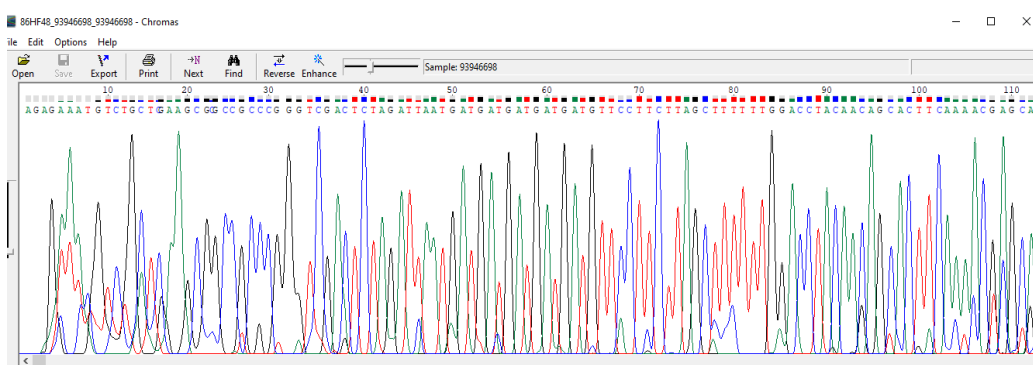
Tab. 10: Koncentrace a čistota PCR produktů klonovaných primerů s UGT naměřené na NanoDropu

Vzorek	Koncentrace (zř. 2x) [ng/ul]	Finální koncentrace [ng/ul]	A260	A280	260/280	260/230
UGT24C1	1020,27	2040,54	20,405	10,677	1,91	2,36
UGT365B6	1256,36	2512,72	25,127	13,226	1,90	2,31
UGT368B2	817,16	1634,32	16,343	8,503	1,92	2,28

I přes nízkou účinnost ligace se zdařilo vyprodukovat vzorky, které obsahovaly plasmidy s požadovaným genem UGT.

5.4 Výsledky ze sekvenace

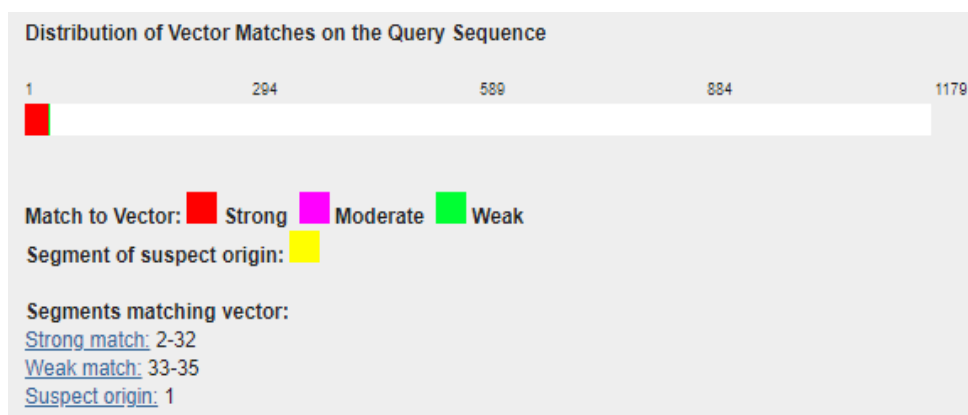
Sekvence z výstupů ze sekvenace byly pomocí programu chromas exportovány do formátu FASTA k dalším úpravám a zpracování.



Obr. 13: Výstup z programu chromas

Jelikož byl sekvenován cirkulární plasmid s pomocí primeru vázajícího se na sekvenci vektoru (EBV_R), byla na všech výsledných sekvencích ověřena přítomnost vektorové sekvence pomocí programu VecScreen na portálu NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen/>). Na obr. 14 je příklad výstupu z VecScreen, kde začátek, nukleotidy 1-35, označuje úsek patřící do sekvence vektoru.

Po identifikaci odpovídajícího úseku vektoru, byla tato část ze získané sekvence odstraněna.



Obr. 14: Ověření přítomnosti sekvence vektoru v získané sekvenci pro UGT24C1 pomocí programu VecScreen

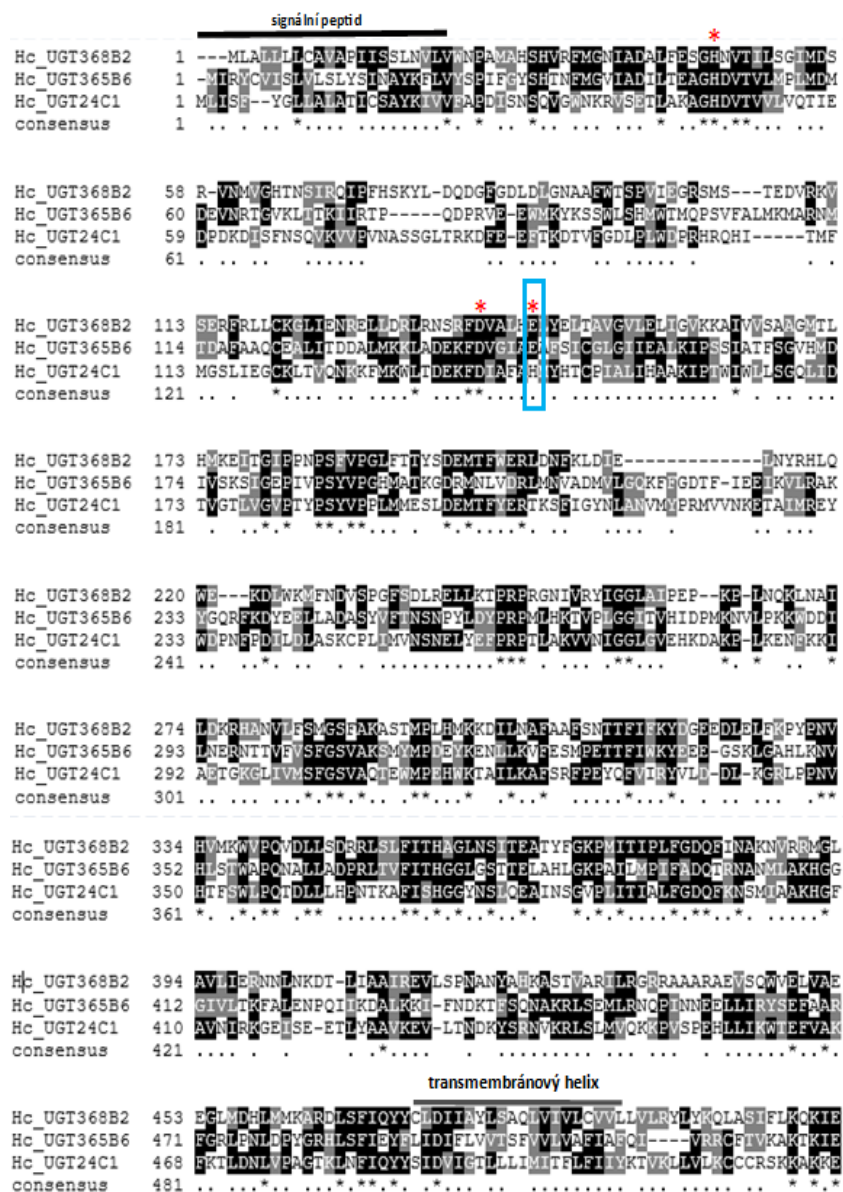
Z důvodu využití reverzního primeru k sekvenování bylo nutné převést výsledné sekvence na reverzně komplementární řetězec pomocí programu *Reverse Complement* (https://www.bioinformatics.org/sms2/rev_comp.html). Takto převedené sekvence bez vektorového úseku mohly být teprve porovnány se sekvencemi referenčními, které byly získány z databáze WormBase/ParaSite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>). Sekvence byly porovnány v programu MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Porovnány byly sekvence všech tří připravených plasmidů se zaklonovanou příslušnou UGT (viz obr. 15, 16, 17). Na obrázcích je viditelný úspěšně prosekvenovaný konec sekvencí. Pro několik rozdílů mezi nukleotidy přítomnými v referenční a získané sekvenci může být vysvětlením genová variabilita, která se však následně neprojevuje v aminokyselinové sekvenci.

Na konci sekvencí je možné vidět část s opakujícím se tripletem CAT (6krát), která po přepisu do struktury proteinu odpovídá 6 histidinům, tzv. histidinové kotvě neboli HisTag. Tato část je poté následována posunutým stopkodonem (TAA).

Sekvence byly sekvenovány několikrát s použitím různých sekvenačních primerů, tak aby byl pokryt celý klonovaný gen.

Na obr. 18 je možno vidět porovnané aminokyselinové sekvence, které vznikly přeložením sekvence nukleotidů klonovaných genů programem Translate (<http://bioinformatics.org/sms2/translate.html>) a následně porovnány programem ClusterOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) a programem BoxShade (https://embnet.vital-it.ch/software/BOX_form.html). Jsou zde vyznačené úseky náležející signálnímu peptidu a transmembránovému helixu, který tvoří membránovou kotvu typickou pro UGT. Hvězdičkou jsou na obrázku vyznačeny tři aminokyseliny důležité pro katalytickou aktivitu UGT. V modrém rámečku je zvýrazněná pozice, ve kterém se liší UGT24C1 od zbylých dvou enzymů. V tomto místě se typicky vyskytuje zbytek kyseliny glutamové (E), avšak u UGT24C1 je v této pozici histidin (H).



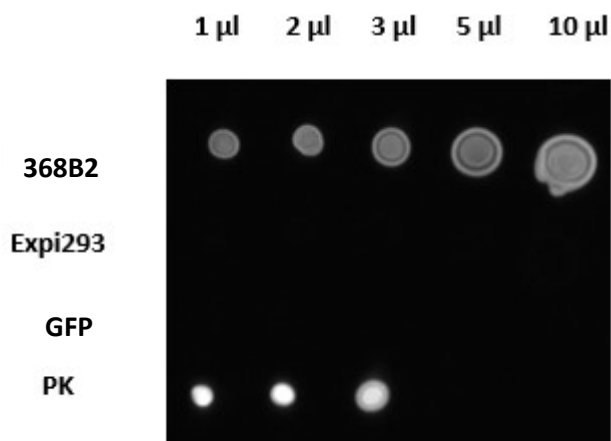
Obr. 18: Porovnání všech tří aminokyselinových sekvencí, které byly přeložené z nukleotidové sekvence klonovaných genů

5.5 Ověření úspěšnosti transfekce metodou Dot blot

K další analýze, ověření funkčnosti plasmidu a transfekci, byl využit jen plasmid se zaklonovaným genem pro UGT368B2. Transfekce proběhla do suspenzních lidských embryonálních buněk ledvin Expi293.

Ověření, zda byla transfekce úspěšná a došlo k expresi proteinu v buňkách Expi293, bylo realizováno imunodetekční chemiluminiscenční metodou Dot blot. Stanovení bylo umožněno přítomností histidinové kotvy ve struktuře zhotoveného proteinu, proti kterému byla zaměřena specifická anti-HisTag protilátka. Vzhledem k tomu, že se v experimentu ověřovala jen funkčnost transfekce a zároveň koncentrace vzorku byla vysoká a předpokládala se vysoká koncentrace vyprodukovaného proteinu, nebyla měřena přesná koncentrace získaného proteinu. Na membránu byly nanášeny vzorky v jednotkách objemu od 1 do 10 μl . Na obr. 19 je výstup membrány vyhodnocené přístrojem C-Digit, na kterém je možné vidět pozitivní chemiluminiscenci v případě transfekovaného UGT368B2 a pozitivní kontroly. Samotné Expi293 a GFP chemiluminiscenci nevykazovalo, jelikož nebyla v jeho molekule přítomna histidinová kotva.

Úspěšnost transfekce byla potvrzena také u buněk s transfekovaným plasmidem s GFP, u nichž byla rozpoznána schopnost fluorescence.



Obr. 19: Vyhodnocení Dot blotu pomocí přístroje C-Digit

6. Diskuze

Studiu vlasovky slezové je věnována vysoká pozornost. Jedná se o organismus, který způsobuje výrazné ztráty na životech malých přežvýkavců, což má za následek také ekonomické důsledky. Dalším předmětem zájmu je fakt, že vlasovka má vyvinutou vysokou schopnost rezistence na anthelmintika. Právě kvůli těmto důvodům je vlasovka podrobována celkové analýze a vědeckým experimentům, které napomáhají k rozpoznání jejích vlastností, a tím vývoji nových léčiv a snížení ztrát.

V současné době existuje již nepřehledné množství studií, prací a publikací, které se zabývají tématem rezistence k anthelmintikům u vlasovky slezové. Zásahu nad rozkrytím genomu a transkriptomu tohoto helminta mají zejména Laing et al. (2013) a Schwarz et al. (2013). Genom a transkriptom vlasovky je však dále studován, upřesňován a zaměřuje se na výzkum variability s použitím nových technologií, jak popisuje např. Doyle et al. (2020). Stejně úsilí jako do studia genomu je vkládáno i do studia proteomu. Tomuto tématu se věnoval kupříkladu Wang et al. (2019), který identifikoval a kvantifikoval proteiny u různých vývojových stádií a obou pohlaví. Stále přibývají publikace, které se již konkrétněji zaměřují na jednotlivé schopnosti vlasovky, vedoucí k dosažení snížené vnímavosti na podaná anthelmintika.

Nejvýraznější podíl na zvyšující se schopnost rezistence mají enzymy metabolizující léčiva. V posledních letech jsou tyto enzymy, stejně jako jiné vlastnosti vlasovky, studovány, jak na úrovni genomiky a transkriptomiky, tak na úrovni proteomové.

Problematické metabolismu léčiv, lékových interakcí a rezistence spojené s anthelmintiky se významně věnuje výzkumná skupina katedry biochemických věd na Farmaceutické fakultě UK. Zde probíhají *ex vivo* i *in vitro* experimenty zabývající se celým spektrem biotransformačních enzymů helmintů. Experimenty se týkají studia exprese genů jednotlivých enzymů, jejich indukci a inhibici různými látkami, stanovováním enzymových aktivit, identifikací a kvantifikací hladin metabolitů ve spojitosti s aktuálně používanými anthelmintiky. Zkoumány jsou navíc rozdíly mezi pohlavími a mezi kmeny citlivými a rezistentními.

Vokřál et al. (2012, 2013) se ve výzkumných projektech zabíral metabolismem flubendazolu a albendazolu a aktivitami biotransformačních enzymů u kmenů vlasovky slezové různě citlivých na působení anthelmintik. V obou projektech byl metabolismus studován jak *ex vivo*, tak *in vitro* na subcelulárních frakcích. V případě flubendazolu byly

u všech 4 studovaných kmenů (ISE, ISE-S, BR, WR) detekovány 4 metabolity: FLU s redukováným karbonylem (FLU-R), O-glukosid FLU-R a 2 N-glukosidy FLU. U všech rezistentních kmenů byla zjištěna vyšší tvorba všech metabolitů v porovnání s citlivým kmenem. V případě albendazolu byly u 3 studovaných kmenů (ISE, BR, WR) identifikovány 4 metabolity: ABZ-sulfoxid (ABZ-SO) a tři ABZ-glukosidy. Tvorba glukosidů byla, stejně jako u metabolismu flubendazolu, vyšší u rezistentních kmenů, avšak S-oxidace ABZ u kmene BR byla významně nižší než u kmene ISE. Aktivita UGT byla sledována také na modelovém substrátu p-nitrofenolu, přičemž schopnost glukosidace byla podstatně vyšší u rezistentních kmenů.

Matoušková et al. (2018) se zaměřili na potenciální roli UDP-glykosyltransferasy na glykosylaci anthelmintik u vlasovky slezové. Provedli fylogenetickou analýzu, zabývali se konstitutivní expresí a rozdíly mezi pohlavími a rezistentními kmeny. 32 genů UGT bylo díky analýze rozděleno do 15 rodin UGT, kde rodinu UGT365 tvoří sedm členů, rodinu UGT368 čtyři a rodinu UGT24 tři, z nichž jeden transkript pravděpodobně vznikl fúzí dvou UGT v nové verzi genomu. Konstitutivní exprese mRNA 32 UGT dospělců vlasovky detekovala rozdíly mezi samci a samicemi. Porovnání konstitutivní exprese UGT mezi citlivým kmenem ISE a dvěma rezistentními kmeny, IRE a WR, také ukázalo rozdíly v míře exprese UGT. Vyšší míra exprese několika isoformů byla detekována jen u rezistentních kmenů. Jednalo se zejména o UGT371A1 u samců a o UGT368B2 u obou pohlaví.

Metabolismu albendazolu, ricobendazolu (S-oxidu albendazolu) a flubendazolu a rozdílům v pohlaví a kmenech ISE a IRE u dospělců vlasovky slezové se věnoval také projekt Stuchlíkové et al. (2018). U FLU bylo v této studii identifikováno 8 nových metabolitů, které do té doby nebyly v žádných jiných studiích popsány, mezi nimi i několik N- a O-glykosidů. Analýza dále odhalila pět nově zjištěných metabolitů ABZ, dva ABZ-N-glykosidy a dva ABZ-SO-N-glykosidy. V případě ricobendazolu bylo objeveno sedm nových metabolitů. Bylo zjištěno, že dospělci kmene IRE měli větší schopnost metabolizovat anthelmintika než dospělci kmene ISE, některé metabolity všech třech anthelmintik byly dokonce nalezeny pouze u kmene IRE. Z porovnání metabolismu u samic a samců vychází významné kvalitativní a semikvantitativní rozdíly, kdy ve většině případů samice metabolizovaly více než samci.

Kellerová et al. (2020a) sledovali vliv subletálních dávek albendazolu a jeho aktivního metabolitu ABZ-sulfoxidu na indukcii CYP, UGT a P-gp a na schopnost

deaktivovat ABZ během následné expozice u kmene ISE. Výsledky ukázaly, že subletální dávky ABZ a ABZ-SO vedly k významné indukci 9 UGT.

Metabolismem albendazolu a albendazol-sulfoxidu v juvenilních stádiích (vejčích, L1 a L3) vlasovky slezové a v nich přítomných UGT se zabývala druhá studie Kellerové et al. (2020b). Studie ukázala, že většina UGT vykazovala vyšší expresi v juvenilních stádiích oproti dospělým jedincům. Nejvýznamnější biotransformační reakcí v juvenilních stádiích byla S-oxidace, ale bylo objeveno také několik glykosidů u ABZ i ABZ-SO. Bylo potvrzeno, že také juvenilní stádia vykazují rozdíly mezi citlivým a rezistentními kmeny (IRE a WR). Rezistentní kmen IRE tvořil více glykosidovaných metabolitů ABZ než kmen ISE.

O významu výzkumu biotransformace na farmaceutické fakultě UK svědčí také celá řada obhájených závěrečných prací spojených s tématem vlasovky slezové. Z posledních let zde vybírám některé závěrečné práce, jejichž cílem bylo sledování vlivu některých látek na expresi požadovaných genů a které svými výsledky přispěly k některým z výše uvedených publikací. Cílem mojí bakalářské práce (Wengrynová 2018) bylo zjistit, zda dochází k indukci vybraných genů UGT po působení fenobarbitalu na jedince z kmene ISE. Pasák (2019) se zabýval vlivem ivermektinu na změnu exprese genů CYP a P-gp u samců a samic z kmene ISE. Štěřbová (2020) ve své diplomové práci popisuje vliv albendazolu na expresi genů CYP a UGT u dospělců kmene ISE. Nekovová (2018) se na rozdíl od předchozích prací zaměřila na porovnání konstitutivní exprese 11 genů UGT mezi kmenem ISE a rezistentním kmenem WR.

Všechny předchozí práce zaměřující se na identifikaci a stanovování parentních látek a metabolitů zahrnují analýzy metabolismu vlasovky z hlediska celého organismu či subcelulárních struktur nebo působení celých nadrovin enzymů, avšak ne na úrovni jednotlivých isoform. Studium exprese genu se zaměřuje již na jednotlivé isoformy a nabízí možnosti poznání jejich indukovatelnosti a porovnání mezi kmeny a pohlavím, přesto nám nesdělí, jaké substráty jsou metabolizovány a jaké typy a množství metabolitů bude vznikat. To je dané tím, že nelze stoprocentně předvídat funkci UGT pouze na základě sekvenční homologie (Matoušková et al. 2018). Z toho důvodu je potřeba vytvoření daných isoform enzymů metodou exprese a purifikace rekombinantních proteinů tak, aby mohl být metabolismus žádaných látek studován přímo na dostupném enzymu, a tím bychom se dozvěděli více o specifických aktivitách.

V rámci experimentální práce byly připraveny plasmidy pro expresi třech UGT, UGT24C1, UGT365B6 a UGT368B2. K výběru těchto tří zástupců nás vedly různé

důvody. UDP-glykosyltransferasy jsou dle homologie sekvence rozděleny do několika rodin, viz fylogenetický strom na obr. 1. Byly vybráni tři zástupci, tak aby každá UGT byla z jiné rodiny.

Z rodiny UGT365 byla náhodně zvolena UGT365B6 jako členka velkého klastru duplikovaných sekvencí. UGT24C1 byla zvolena z důvodu znalosti rozdílné aminokyseliny v oblasti důležité pro katalytickou aktivitu enzymu. Typickou aminokyselinou v tomto místě je kyselina glutamová. U UGT24C1 byla v tomto místě zjištěna přítomnost histidinu, což se po bioinformatické analýze vytvořeného plasmidu v této práci potvrdilo. Tato vlastnost dodala zájem pro přípravu plasmidu s daným genem, aby bylo umožněno další studium stanovení aktivity příslušného enzymu. Předpokládáme, že by odlišnost ve zmíněné pozici mohla vyvolat, že tato UGT bude preferenčně způsobovat O-glykosylace místo N-glykosylací. Tato hypotéza bude ovšem ověřena až po úspěšném stanovení aktivity této UGT.

Poslední klonovanou UDP-glykosyltransferasou byla členka rodiny UGT368. Jak již bylo zmíněno, Matoušková et al. (2018) pozorovali u této UGT zvýšenou expresi v rezistentních kmenech vlasovky v porovnání s citlivým kmenem. Dále Kellerová et al. (2020a) ve své publikaci udává, že u dospělců citlivého kmene byla zjištěna zvýšená exprese UGT368B2 po působení dávek albendazolu. Vysoká exprese UGT368B2 byla objevena také u rezistentních kmenů ISE a WR ve stádiích L1 a L3 (Kellerová 2020b). Z tohoto důvodu byla vybrána daná UGT, aby bylo možné studovat také funkce tohoto konkrétního enzymu a zjistit, zda opravdu hraje důležitou roli v anthelmintické rezistenci.

Stejnému tématu, jež je obsaženo v této diplomové práci, se věnuje také moje konzultantka Mgr. Diana Dimunová v rámci své práce disertační. Transfekce a úspěšnost exprese v buňkách Expi293 byla zde v diplomové práci ověřena jen u UGT368B2. Ověřením zbylých dvou UGT se zabývá právě Mgr. Diana Dimunová. Dalšími postupy bude studium stanovení aktivit u vytvořených rekombinantních enzymů, tak aby bylo možné zjistit, jaký podíl mají zmíněné UGT na metabolismus různých substrátů.

7. Závěr

Cílem experimentální práce bylo získat plasmid s včleněným genem příslušné UDP-glykosyltransferasy za využití metod molekulární biologie a genetiky. K těmto metodám patřila amplifikace genu pomocí PCR, ligace do vektoru pCI, transformace plasmidu do buněk *E. coli*, izolace namnoženého plasmidu, kontrola správnosti sekvencí pomocí sekvenace, transfekce a exprese UGT v Expi293 buňkách a ověření exprese díky dot blotu.

Úspěšně byly připraveny a sekvenací ověřeny plasmidy pro tři UGT vlasovky slezové – 24C1, 365B6 a 368B2, avšak z organizačních a časových důvodů byla transfekce a ověření úspěšnosti exprese provedena pouze u UGT368B2.

Zhotovené plasmidy by měly umožnit další studium UDP-glykosyltransferas na úrovni proteinu za účelem získání dalších informací o procesech odehrávajících se v metabolismu xenobiotik.

8. Zkratky

- A – adenin
- ABZ – albendazol
- ABZ-SO – albendazol-sulfoxid
- AKT – aldo-ketoreduktasy
- ATB – antibiotikum
- ATP – adenosin trifosfát
- BR – kmen rezistentní na benzimidazolová anthelmintika
- C – cytosin
- cDNA – komplementární DNA
- CMV – cytomegalovirus
- CYP – cytochrom P450
- DAPI – 4',6-diamino-2-fenylindol
- dATP - deoxyadenosin trifosfát
- DEPC H₂O – voda ošetřená diethyl pyrokarbonátem (inaktivátorem RNas)
- ddATP - dideoxyadenosin trifosfát
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- dNTP – deoxyribonukleotid trifosfáty
- ds DNA – dvouvláknová DNA
- EBV – Epstein-Barroé virus
- E. coli – Escherichia coli
- EDTA – ethylendiamintetraoctová kyselina
- F/FR – forward (horní) primer
- FLU - flubendazol
- G - guanin
- GFP – green fluorescent protein
- GST - glutathion-S-transferasa
- His – histidin
- HisTag – značka obsahující 6 po sobě jdoucích histidinů
- IRE – kmen rezistentní na benzimidazolová anthelmintika
- ISE – kmen citlivý na všechna anthelmintika
- ISE-S – kmen rezistentní k ivermektinu

- kbp – pár kilobází
- L1, L2, L3 – vývojová stádia vlasovky slezové
- lacZ' – značení pro gen kódující β -galaktosidasu
- LB médium – Luria-Bertani médium
- MCS – Multiple Cloning Site, klonovací místo
- MDR - dehydrogenasy/reduktázy se středně dlouhým řetězcem
- NK – nukleová kyselina
- PCR – polymerázová řetězová reakce
- P-gp – P-glykoprotein
- RE – restrikční endonukleasy
- RNA – ribonukleová kyselina
- rpm – otáčky za minutu
- R/RP – reverse (reverzní/zadní) primer
- SDR - dehydrogenasy/reduktázy s krátkým řetězcem
- SV40 – simian virus 40
- S.O.C medium – Super Optimal broth with Catabolite repression medium
- SV40 – simian virus 40
- T - thymin
- TAE - Tris-borát-EDTA
- TBE – Tris-borát-EDTA
- TBST – Tris buffered Saline-Tween 20
- Tm – teplota tání
- TPE - Tris-fosfát-EDTA
- TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan
- UDP – uridindifosfát
- UGT – uridindifosfát-glykosyltransferasa
- WR – multirezistentní kmen na všechna anthelmintika

9. Zdroje

9.1 Literární zdroje

ARSENOPOULOS, K. V. et al. (2021). Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats. *Animals*, 2021, 11, 363. DOI: 10.3390/ani11020363

BESIER, R. B. et al. (2016). Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Advances in Parasitology*, 2016, vol. 93. DOI: 10.1016/bs.apar.2016.02.024

BERÁNEK, M. (2016). *Molekulární genetika pro bioanalytiku*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2016. 194 s. ISBN: 978-80-246-3224-7

BROWN, T. A. (2007). *Klonování genů a analýza DNA. Úvod*. 1. české vydání. Olomouc: Univerzita Palackého, 2007. 389 s. ISBN: 978-80-244-1719-6

CVILINK, V. - LAMKA, J. - SKÁLOVÁ, L. (2009). Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of anthelmintics in helminths. *Drug metabolism reviews*, 2009, vol. 41, no. 1, s. 8-26. DOI: 10.1080/03602530802602880

DOYLE, S. R. et al. (2020). Genomic and transcriptomic variation defines the chromosome-scale assembly of *Haemonchus contortus*, a model gastrointestinal worm. *Communications Biology*, 2020, vol. 3, no. 656. DOI: 10.1038/s42003-020-01377-3

GASSER, R. B. et al. (2016). Understanding *Haemonchus contortus* Better Through Genomics and Transcriptomics. *Advances in Parasitology*, 2016, vol. 93, s. 519-567. DOI: 10.1016/bs.apar.2016.02.015

GETACHEW, T. – DORCHIES, P. – JACQUIET, P. (2007). Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. Review. *Parasite*, 2007, vol. 14, s. 3-14. DOI: 10.1051/parasite/2007141003

GLICK, B. R. - PASTERNAK, J. J. - PATTEN, C. L. (2010). *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*. 4th edition. Washington, DC: ASM Press, 2010. 1000 s. ISBN: 978-1-55581-498-4

HUNTER, M. et al. (2018). Optimization of protein expression in mammalian cells. *Current Protocols in Protein Science*, 2018, e77. DOI: 10.1002/cpps.77

JÍRA, J. (1998). *Lékařská helmintologie: Helminthoparazitární nemoci*. 1. vydání. Praha: Galén, 1998. 496 s. ISBN: 80-85824-82-5

- KOTRLÁ, B. et al. (1984). *Parazitózy zvířete*. 1. vydání. Praha: Academia, 1984. 192 s. ISBN: 21-055-84
- KELLEROVÁ, P. et al. (2020a). Sub-lethal doses of albendazole induce drug metabolizing enzymes and increase albendazole deactivation in *Haemonchus contortus* adults. *Veterinary research*, 2020, 51:94. DOI: 10.1186/s13567-020-00820-x
- KELLEROVÁ, P. et al. (2020b). UDP-Glycosyltransferases and Albendazole Metabolism in the Juvenile Stages of *Haemonchus contortus*. *Frontiers in Physiology*, 2020, vol. 11. DOI: 10.3389/fphys.2020.594116
- KOSOBOKOVA, E. N. – SKRYPNIK, K. A. – KOSORUKOV, V. S. (2016). Overview of Fusion Tags for Recombinant Proteins. *Biochemistry (Moscow)*, 2016, vol. 81, no. 3, s. 187-200. DOI: 10.1134/S0006297916030019
- KOTZE, A. C. - PRICHARD R. K. (2016). Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. *Advances in Parasitology*, 2016, vol. 93. DOI: 10.1016/bs.apar.2016.02.012
- LAING, R. et al. (2013). The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology*, 2013, vol. 14, no. 8. DOI: 10.1186/gb-2013-14-8-r88
- LEE, P. Y. et al. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 2012. vol. 62, s. 1-5. DOI: 10.3791/3923
- MATOUŠKOVÁ, P. et al. (2016). The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends in Parasitology*, 2016, vol. 32, no. 6, s. 481-491. DOI: 10.1016/j.pt.2016.02.004
- MATOUŠKOVÁ, P. et al. (2018). UDP-glycosyltransferase family in *Haemonchus contortus*: Phylogenetic analysis, constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences. *IJP: Drugs and Drug Resistance*, 2018, 8, s. 420-429. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2018.09.005
- MATOUŠKOVÁ, P. (2020). Nukleotidová bioinformatika III. Základy praktické bioinformatiky. Farmaceutická fakulta, katedra biochemických věd. 2019/2020
- MEECH, R. et al. (2019). The UDP-glycosyltransferase (UGT) superfamily: New members, new function, and novel paradigms. *Physiol Rev*, 2019, 99, s. 1153-1222. DOI: 10.1152/physrev.00058.2017
- NEKOVÁ, L. (2018). *Konstitutivní exprese UDP-glukosyltransferas vlasovky slezové*. Hradec Králové, 2018. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Petra Matoušková

PASÁK, M. (2019). Změny v expresi vybraných enzymů metabolizujících léčiva u parazita po kontaktu se subletálními dávkami léčiv. Hradec Králové, 2019. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Lenka Skálová

PELLEY, J. W. (2012). Elsevier's Integrated Review Biochemistry. 2nd edition. Philadelphia: Saunders, 2012, s. 232. ISBN: 978-0-323-07446-9

PINGOUD, A. - JELTSCH, A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Research*, 2001, vol. 29, no. 18, s. 3705-3727. DOI: 10.1093/nar/29.18.37005

RACLAVSKÝ, V. (1999). *Úvod do základních metod molekulární genetiky*. Olomouc: Univerzita Palackého, 1999. 44 s. ISBN: 80-7067-892-5

RŮČKOVÁ, E. - MÜLLER, P. – VOJTĚŠEK, B. (2014). Exprese a purifikace proteinů. *Klinická onkologie*, 2014, 27 (Suppl 1), s. 92-97. DOI: 10.14735/amko20141S92

SCHWARZ, E. M. et al. (2013). The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*. *Genome Biology*, 2013, vol. 14:R89. DOI: 10.1186/gb-2013-14-8-r89

SKÁLOVÁ, L. et al. (2017). Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik. Druhé, upravené a rozšířené vydání. Praha: Karolinum, 2017. 171 s. ISBN: 978-80-246-3733-4

STUHLÍKOVÁ, L. R. et al. (2018). Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *IJP: Drugs and Drug Resistance*, 2018, vol. 8, s. 50-58. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2018.01.005

ŠMARDA, J. et al. (2005). *Metody molekulární biologie*. 1. vydání. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN: 80-210-3841-1

ŠTĚRBOVÁ, K. (2020). Změny v expresi biotransformačních enzymů v hlísticích ovlivněných albendazolem. Hradec Králové, 2020. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Lenka Skálová.

VOKŘÁL et al. (2012). The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology*, 2012, vol. 139, s. 1309-1316. DOI: 10.1017/S0031182012000595

VOKŘÁL et al. (2013). Biotransformation of albendazole and activities of selected detoxification enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, 2013, vol. 196, s. 373-381. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.03.018

WALSH, G. (2014). *Proteins: Biochemistry and Biotechnology*. 2nd edition. Chichester: Wiley-Blackwell, 2014, s. 448. ISBN: 978-0-470-66985-3

WANG, T. et al. (2019). Somatic proteome of *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 2019, vol. 49, s. 311-320. DOI: 10.1016/j.ijpara.2018.12.003

WENGRYNOVÁ, B. (2019). *Indukce fenobarbitalem UDP-glykosyltransferas vlasovky slezové*. Hradec Králové, 2019. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra biochemických věd. Vedoucí práce Petra Matoušková

9.2 Elektronické zdroje:

Addgene¹ [online] - Analyze Sequence: pCI. [citováno 10. března 2021], Dostupné z: https://www.addgene.org/browse/sequence_vdb/2189/

Addgene² [online] - Molecular Biology Reference. [citováno 5. srpna 2021], Dostupné z: <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/#plasmids>

FIALOVÁ, E. (2018). Odhalování falšování potravin pomocí analýzy DNA. *VŠCHT* [online]. Poslední revize 4. ledna 2018. [citováno 11. dubna 2021], Dostupné z: <https://www.vscht.cz/popularizace/doktorandi-pisou/2017/odhalovani-falsovanipotravin?jazyk=cs#/images/0!0/uzel/41816/0001~~Cyg6uj7pyOwMhQDnICuFIGIXP0cFW4WUsvzSspzDC7Pz8ssOL1QACWpUKSTmpefoKaTklyblpCoUlxQ15qWkpmjqKBRDdWWlpgDV49BWnAmkkLQBAA.png>

LabGuide.cz¹ [online] -Klasické metody sekvenování. [citováno 7. dubna 2021], Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/purifikace-nukleovych-kyselin/>

LabGuide.cz² [online] – Klonování. [citováno 29. března 2021], Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/klonovani/>

LabGuide.cz³ [online] - Purifikace nukleových kyselin. [citováno 17. července 2021], Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/purifikace-nukleovych-kyselin/>

MACHEREY-NAGEL [online] - Instruction NucleoSpin Plasmid (NoLid). [citováno 20. června 2021], Dostupné z: <https://www.mn-net.com/media/pdf/45/51/02/Instruction-NucleoSpin-Plasmid.pdf>

METTLER TOLEDO [online] - 260/280 Ratio: Indicator of Protein Contamination. [citováno 17. července 2021], Dostupné z: <https://www.mt.com/cz/cs/home/library/applications/lab-analytical-instruments/Uv-vis-dna-analysis.html>

NEB [online] - 1kb DNA Ladder. [citováno 12. dubna 2021], Dostupné z: <https://international.neb.com/products/n3232-1-kb-dna-ladder#Product%20Information>

Promega [online] - pCI and pSI Mammalian Expression Vectors Technical Bulletin. [citováno 5. srpna 2021], Dostupné z: <https://www.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/pCi%20and%20psi%20mammalian%20expression%20vectors%20protocol.pdf>

Thermo Fisher Scientific [online] - Overview of Protein Expression. [citováno 18. srpna 2021], Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-protein-expression-systems.html#1>

WikiSkripta [online] - Polymerázová řetězová reakce. [citováno 11. dubna 2021], Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Polymerázová_řetězová_reakce

ZYMORESEARCH¹ [online] - DNA Clean & Concentrator-5 Protocol. [citováno 20. června 2021], Dostupné z: https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4003t_d4003_d4004_d4013_d4014_dna_clean_concentrator_-5.pdf

ZYMORESEARCH² [online] - ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep Kit Protocol. [citováno 20. června 2021], Dostupné z: https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4200_d4201_zymopure_ii_plasmid_midiprep.pdf

10. Přílohy

10.1 Protokol ke kitu ZYMORESEARCH - DNA clean & concentrator®-5

Úprava vzorku

Všechny centrifugační kroky by měly být prováděny mezi 10 000 – 16 000 x g.

1. Do 1,5 ml mikrozkušavky přidejte 2-7 objemů *DNA Binding Buffer* ke každému objemu vzorku DNA dle níže uvedené tabulky. Zvortexujte.

Aplikace	DNA Binding Buffer : Vzorek	Příklad
Plasmid, genom DNA (>2 kb)	2 : 1	200 µl : 100 µl

Tab. 11: Poměry *DNA Binding Buffer* a vzorku při různém použití

2. Přepipetujte směs do přiložené *Zymo-Spin™ Column* (kolonky) a tu vložte do *Collection Tube* (sběrné zkumavky). Kapacita kolonky pro vzorek je 800 µl. Pokud je objem vzorku vyšší než 800 µl, opakujte nanášení vzorku několikrát.
3. Centrifugujte 30 sekund. Odstraňte vyloučenou tekutinu.
4. Přidejte 200 µl *DNA Wash Buffer* na kolonku. Centrifugujte 30 sekund. Opakujte promývací krok.
5. Přidejte ≥ 6 µl *DNA Elution Buffer* přímo na kolonu a inkubujte 1 minutu při pokojové teplotě. Přemístěte kolonu do 1,5 ml mikrozkušavky a centrifugujte 30 sekund za účelem eluce DNA.

Ultra-čistá DNA je připravena pro další použití (ZYMORESEARCH¹ [online]).

10.2 Protokol ke kitu MACHEREY-NAGEL - NucleoSpin® Plasmid

Návod k izolaci plasmidové DNA z *E. coli*

Všechny centrifugační kroky by měly být prováděny na 11 000 x g.

1. Použijte 1-5 ml saturované *E. coli* LB kultury a centrifugujte ji 30 sekund. Slijte supernatant a odstraňte co nejvíce tekutiny.
2. Přidejte 250 µl *Buffer A1*. Resuspendujte peletu buněk vortexováním. Ujistěte se, že ve vzorku nezůstaly žádné shluky buněk před přidáním *Buffer A2*. Přidejte 250 µl *Buffer A2*. Promíchejte 6-8násobným převrácením zkumavky. Nevortexujte! Inkubujte při pokojové teplotě 5 minut.

- Přidejte 300 μ l *Buffer A3*. Opět promíchejte rotací zkumavky 6-8krát, dokud se modré vzorky zcela neodbarví. Nevortexujte!
3. Centrifugujte po dobu 5 minut. Opakujte tento krok, pokud není supernatant zcela čistý.
 4. Umístěte *NucleoSpin[®] Plasmid Column* (kolonku) do 2ml *Collection Tube*. Napipetujte na kolonu maximálně 700 μ l supernatantu z předchozího kroku. Centrifugujte 1 minutu. Odstraňte vyloučenou kapalinu ze zkumavky. Opakujte krok, dokud neaplikujete všechny zbývající lyzát.
 5. Přidejte 600 μ l *Buffer A4*. Centrifugujte 1 minutu. Odstraňte vyloučenou tekutinu a umístěte *NucleoSpin[®] Plasmid Column* zpátky do prázdné zkumavky.
 6. Centrifugujte 2 minuty a vyjměte kolonu ze zkumavky.
 7. Umístěte kolonu do 1,5ml mikrozkušavky a přidejte 50 μ l *Buffer AE*. Inkubujte 1 minutu při pokojové teplotě a poté centrifugujte 1 minutu k eluci DNA (MACHEREY-NAGEL [online]).

10.3 Protokol ke kitu ZYMO RESEARCH - ZymoPURE[™] II Plasmid Midiprep Kit

Příprava

Centrifugujte 50 ml bakteriální kultury na více než 3 400 x g po dobu 10 minut do vzniku pelety buněk. Slijte supernatant.

Návod

1. Přidejte k peletě 8 ml *ZymoPURE[™] P1* (červený) a resuspendujte ji vortexováním či pipetováním.
2. Přidejte 8 ml *ZymoPURE[™] P2* (zelený) a okamžitě promíchejte 6násobným otočením zkumavky. Nevortexujte! Nechte stát 2-3 minuty při pokojové teplotě (lyzace by neměla trvat déle než 3 minuty, aby nedošlo k poškození plasmidové DNA). Buňky jsou kompletně zlyzovány, pokud je roztok viskózní a fialový.
3. Přidejte 8 ml *ZymoPURE[™] P3* (žlutý) a opatrně promíchejte otáčením zkumavky. Nevortexujte! Jakmile je dokončena neutralizace, vzorek se obarví dožluta s obsahem žlutavého precipitátu.
4. Ujistěte se, že je zátka na spodní straně *ZymoPURE[™] Syringe Filter* (stříkačky) upevněná k *Luer Lock*. Umístěte stříkačku do stojanu na zkumavky, přelijte lyzát

dovnitř *ZymoPURE™ Syringe Filter* a počkejte 5-8 minut, dokud se precipitát neustálí nahoře.

5. Odstraňte zátku z *Luer Lock* ve spodní části stříkačky a přemístěte stříkačku do čisté 50ml falkony. Vložte píst do stříkačky a protlačte roztok přes filtr plynulým pohybem až do doby, kdy získáte přibližně 20 ml čirého lyzátu.
6. K přefiltrovanému lyzátu přidejte 8 ml *ZymoPURE™ Binding Buffer* a opatrně promíchejte obsah falkony převrácením 8krát.
7. Odstraňte 50ml *Reservoir* (rezervoár) z horní části *Zymo-Spin™ III-P Column Assembly*. Ujistěte se, že je spojení mezi 15ml *Conical Reservoir* a *Zymo-Spin™ III-P Column* pevné a umístěte sestavu do 50ml falkony.
8. Do vzniklé 15ml *Conical Reservoir* přidejte směs z kroku 6 a centrifugujte na 500 x g po dobu 2 minut. Vyprázdněte falkonu a opakujte tento krok, dokud neprojde přes kolonu celý vzorek.
9. Aplikujte na kolonu 2 ml *ZymoPURE™ Wash 1* a centrifugujte na 500 x g po dobu 2 minut.
10. Aplikujte na kolonu 2 ml *ZymoPURE™ Wash 2* a opět centrifugujte na 500 x g 2 minuty. Zopakujte tento mycí krok.
11. Odšroubujte fialovou čepičku *Luer Lock* z horní části *Zymo-Spin™ III-P Column* a odstraňte 15ml *Conical Reservoir*. Umístěte *Zymo-Spin™ III-P Column* do *Collection Tube* (sběrné zkumavky). Centrifugujte v mikrocentrifuze při $\geq 10\,000$ x g 1 minutu za účelem odstranění zbytku promývacího pufru.
12. Přemístěte kolonu do čisté 1,5ml mikrozkuavky a přímo do kolonky připipetujte 200 μ l *ZymoPURE™ Elution Buffer*. Vyčkejte 2 minuty a poté centrifugujte při $\geq 10\,000$ x g 1 minutu (ZYMORESEARCH² [online]).