

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

Klonování a příprava sond pro detekci P-glykoproteinu z vlasovky slezové

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2022

Bc. Valentýna Funioková

Prohlášení

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

V Hradci Králové 2022

Bc. Valentýna Funioková

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala své školitelce doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a velkou míru ochoty a trpělivosti, se kterou se mi počas vypracování diplomové práce věnovala. Velký dík patří také konzultantce Mgr. Pavlíně Kellerové a ostatním členům Katedry biochemických věd za vytvoření přátelského pracovního prostředí. Za přípravu histologických řezů vlasovky slezové, užitých při experimentech RNA *in situ* hybridizace, děkuji paní laborantce Pavlíně Lukešové. Děkuji také GA UK, která vypracování této diplomové práce v rámci projektu č. 1171620 podpořila finančně.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Valentýna Funioková

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

Název diplomové práce: **Klonování a příprava sond pro detekci P-glykoproteinu z vlasovky slezové**

Anthelmintická rezistence gastrointestinálních hlístic je významným problémem celosvětového rozsahu. Vlasovka slezová, parazitická hlístice malých přežvýkavců, je v současnosti schopna rozvinout rezistenci vůči všem třídám anthelmintických léčiv. Jedním z mechanismů rozvoje této rezistence může být efluxní transport léčiv zajištěný P-glykoproteiny ze skupiny ABC transportérů. U vlasovky slezové nalézáme celkem 10 homologů tohoto transportéru. Studium jednotlivých transportérů by mohlo odhalit konkrétní homology zapojené do mechanismů anthelmintické rezistence.

V předkládané diplomové práci jsme se zaměřili na P-glykoprotein-9.2, který vykazuje zvýšenou konstitutivní expresi u rezistentních kmenů vlasovky slezové. Úvodní část diplomové práce přináší celistvý přehled informací týkajících se této hlístice, anthelmintické rezistence a ABC transportérů. Experimentální část práce je věnována přípravě plazmidů pro *in vitro* syntézu hybridizačních RNA sond značených digoxigeninem a jejich užití při detekci mRNA P-glykoproteinu-9.2 v histologických řezech vlasovky slezové metodou chromogenní RNA *in situ* hybridizace. Cílová mRNA P-glykoproteinu-9.2 byla detekovaná u samic v hypodermis, intestinální tkáni, vaječnicích a děloze naplněné vajíčky.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Valentýna Funioková

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

Title of diploma thesis: **Construction of plasmid and probes for detection of P-glycoprotein in *Haemonchus contortus***

Anthelmintic resistance in parasitic nematodes has become an alarming issue worldwide. *Haemonchus contortus*, a pathogenic nematode of small ruminants, has become resistant to all types of anthelmintic drugs. Important players of the anthelmintic resistance are ABC transporters, most notably P-glycoproteins. In *Haemonchus contortus*, 10 homologues of Pgp have been identified. Research of individual P-glycoproteins could reveal particular transporters involved in anthelmintic resistance mechanisms.

The diploma thesis focuses on P-glycoprotein-9.2, whose constitutive expression is higher in resistant strains of *H. contortus* than in susceptible strain. The opening chapters of the diploma thesis deals with the topic of parasitic nematode *H. contortus*, anthelmintic resistance and description of ABC transporters. The main part of this thesis is dedicated to construction of plasmids for *in vitro* preparation of digoxigenin-labelled RNA probes, and detection of P-glycoprotein-9.2 mRNA by chromogenic RNA *in situ* hybridisation. Target mRNA of P-glycoprotein-9.2 was found in hypodermis, intestinal tissue, ovaria and uterus including eggs.

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Vlasovka slezová.....	9
2.1.1 Morfologie	9
2.1.2 Životní cyklus	11
2.1.3 Léčba hemonchózy	13
2.2 Anthelmintická rezistence	14
2.2.1 Mechanismy anthelmintické rezistence	15
2.2.2 Anthelmintická rezistence u vlasovky slezové	16
2.2.3 Detekce anthelmintické rezistence	17
2.3 ABC transportéry	19
2.3.1 Struktura a mechanismus funkce transportérů.....	20
2.3.2 Lidské ABC transportéry	21
2.3.3 ABC transportéry u vlasovky slezové	24
2.4 RNA <i>in situ</i> hybridizace	26
2.4.1 Chromogenní <i>in situ</i> hybridizace (CISH)	27
3. CÍL PRÁCE	28
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1 Technické a chemické vybavení, biologický materiál	29
4.1.1 Technické vybavení	29
4.1.2 Chemické vybavení	30
4.1.3 Příprava pufrů, roztoků a kultivačních médií	32
4.1.4 Biologický materiál	34
4.2 Metodika	35
4.2.1 Izolace RNA	35
4.2.2 DNase treatment	36
4.2.3 Reverzní transkripce	36
4.2.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	37
4.2.5 Agarosová elektroforéza	39
4.2.6 Přechištění PCR produktu a stanovení jeho koncentrace	39
4.2.7 Klonování	39

4.2.8	<i>Colony</i> PCR	42
4.2.9	Izolace plazmidové DNA a <i>Quick-Load</i> PCR.....	44
4.2.10	Sekvence plazmidové DNA.....	45
4.2.11	Masivní namnožení plazmidu v kompetentních buňkách a jeho izolace	45
4.2.12	Linearizace plazmidové DNA	46
4.2.13	Ethanolová precipitace	46
4.2.14	Tvorba RNA sond značených digoxigeninem.....	47
4.2.15	Příprava histologických řezů	48
4.2.16	RNA <i>in situ</i> hybridizace	49
5.	VÝSLEDKY	56
5.1	Příprava hybridizačních RNA sond	56
5.1.1	Příprava inzertů.....	56
5.1.2	Ověření úspěšnosti klonování.....	57
5.1.3	Izolace masivně namnoženého plazmidu	61
5.1.4	Linearizace plazmidové DNA	62
5.1.5	Tvorba RNA sond značených digoxigeninem.....	63
5.2	RNA <i>in situ</i> hybridizace.....	64
6.	DISKUZE	67
7.	ZÁVĚR	70
8.	ZKRATKY	71
9.	ZDROJE.....	73
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	79
11.	SEZNAM TABULEK	80
12.	PŘÍLOHY	81
12.1	Sekvence genu Hco-Pgp-9.2	81
12.2	Postup práce s kitem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)	83
12.3	Postup práce s kitem NucleoSpin Plasmid (No Lid) (Macherey-Nagel)	85
12.4	Postup práce s kitem ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep Kit (Zymo Research)	87

1. ÚVOD

Vlasovka slezová je gastrointestinální hlístice z čeledi *Trichostrongylidae*, parazitující ve slezu malých přežvýkavců. Infekce tímto parazitem, tzv. hemonchóza, je závažné onemocnění způsobující úhyn postižených zvířat, který vede v celosvětovém měřítku k výraznému poklesu živočišné produkce (Naeem *et al.* 2021). Závažným problémem komplikujícím léčbu hemonchózy je anthelmintická rezistence, vyvinutá v současnosti vůči všem dostupným anthelmintikům, včetně jejich kombinací. Tento široký rozsah rezistence je důsledkem nejen příhodných biologicko-genetických vlastností hlístic, ale také nevhodně nastavené léčby a podávání subletálních dávek anthelmintik (Kaplan 2020, Fissiha *et al.* 2021). Vlastní rozvoj rezistence může být navozen mechanismy farmakodynamickými, jako je změna struktury cílového místa léčiva, ale také mechanismy farmakokinetickými, způsobenými činností biotransformačních enzymů a efluxních transportérů (Stuchlíková Raisová *et al.* 2018).

Mezi nejznámější efluxní proteiny patří ABC (*ATP binding cassette*) transportéry. Tyto transmembránové proteiny hydrolyzují adenosin trifosfát (ATP) a uvolněnou energii využívají k transportu různorodých substrátů skrze lipidovou dvojvrstvu, čímž snižují jejich intracelulární koncentraci. Jako substrát mohou sloužit jak látky endogenní povahy (např. ionty, cukry, peptidy), tak xenobiotika, jejichž potenciálně škodlivý účinek je efluxním transportem eliminován (Goffeau *et al.* 2013). V popředí zájmu stojí zejména P-glykoprotein, resp. jeho homology, který je významným činitelem chemoterapeutické rezistence u řady lidských nádorových onemocnění (Sun *et al.* 2012). Výsledky mnohých studií však naznačují uplatnění některých homologů P-glykoproteinu také při rozvoji anthelmintické rezistence. Studie Kellerové P. a kolektivu odhalila odlišnou míru exprese některých homologů P-glykoproteinu mezi rezistentními a citlivým kmenem vlasovky slezové. U rezistentních kmenů byl nejsilněji exprimován P-glykoprotein-9.2 (Kellerová *et al.* 2019). Tímto transportérem se proto zabývá i předkládaná diplomová práce, jejímž cílem je detekce místa jeho transkripce pomocí metody chromogenní RNA *in situ* hybridizace.

Charakterizace a lokalizace jednotlivých homologů P-glykoproteinu vlasovky slezové by mohla odhalit transportéry přímo zodpovědné za selhávání anthelmintické terapie a objasnit mechanismy rezistence k anthelmintikům. Získané poznatky by mohly napomoci také k nalezení nových a efektivnějších léčiv.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Vlasovka slezová

Vlasovka slezová, latinsky *Haemonchus contortus*, je jedním z nejrozšířenějších gastrointestinálních parazitů malých přežvýkavců. Jedná se o krevsající hlístici z čeledi *Trichostrongylidae*, která napadá sliznici slezu ovcí a koz a způsobuje tak onemocnění zvané hemonchóza (Iliev *et al.* 2017, Naeem *et al.* 2021)

Příznaky hemonchózy vycházejí z hematofágního principu výživy červa. Postižená zvířata trpí letargií, anémií, edémy, hemoragickou gastritidou a dalšími komplikacemi, které mnohdy vedou k úhynu zvířat. Jeden dospělec vlasovky je totiž schopen vysát 30-50 μ l krve za den, což při infekci tisíci červy činí ztrátu 50 ml krve denně. Hemonchóza může probíhat ve třech formách, které se liší závažností klinických příznaků. Jedná se o formu chronickou, akutní a hyperakutní, při níž může být zvíře infikováno až 30 000 dospělými červy. Při této nejzávažnější formě infekce zvíře často náhle hyne, aniž by jevílo jiné známky onemocnění (Naeem *et al.* 2021, Besier *et al.* 2016)

Geografické rozšíření vlasovky slezové je hojně především v oblasti tropického a subtropického podnebného pásu, kde jsou příhodné podmínky (zejména teplota a vlhkost) k vývinu volně žijících vývojových stádií. Díky své vysoké adaptabilitě však vlasovka proniká i do oblastí mírného pásu, kde vyvolává epidemie sezónního charakteru (Besier *et al.* 2016). Široké zeměpisné rozšíření je pak spolu s mohutným biotickým potenciálem a značnou patogenitou příčinou významných ekonomických dopadů, které souvisejí s poklesem produkce mléka a vlny, ale také s náklady na léčbu postižených zvířat (Arsenopoulos *et al.* 2021).

2.1.1 Morfologie

Vlasovka slezová náleží podobně jako většina hlístic mezi gonochoristy s výraznými znaky pohlavního dimorfismu. Její tělo má nitkovitý tvar s patrným anteriorním zúžením (Bártová *et Klimeš* 2004). Velikost samic se pohybuje mezi 18-30 mm, samci dosahují rozměrů menších, a to 10-20 mm (Roeber *et al.* 2013a).

Povrch těla je krytý pružnou a pevnou kutikulou představující tzv. exoskelet. Ten je tvořen převážně zesíťovaným kolagenem, který je produkován epidermálními buňkami. Během vývinu je exoskelet několikrát svlečen a znovu obnoven. Vlasovka je skrze

kutikulu schopna přijímat živiny, stejně jako některá anthelmintika (např. levamisol, makrocyclické laktony) (Harder 2016). Pod kutikulární vrstvou se nacházejí pásy hypodermis, mezi kterými je uložena podélná hladká svalovina. Tělní stěna je pak od ostatních soustav oddělena dutinou vyplněnou tekutinou, tzv. pseudocoelem (Bártová *et* Klimeš 2004).

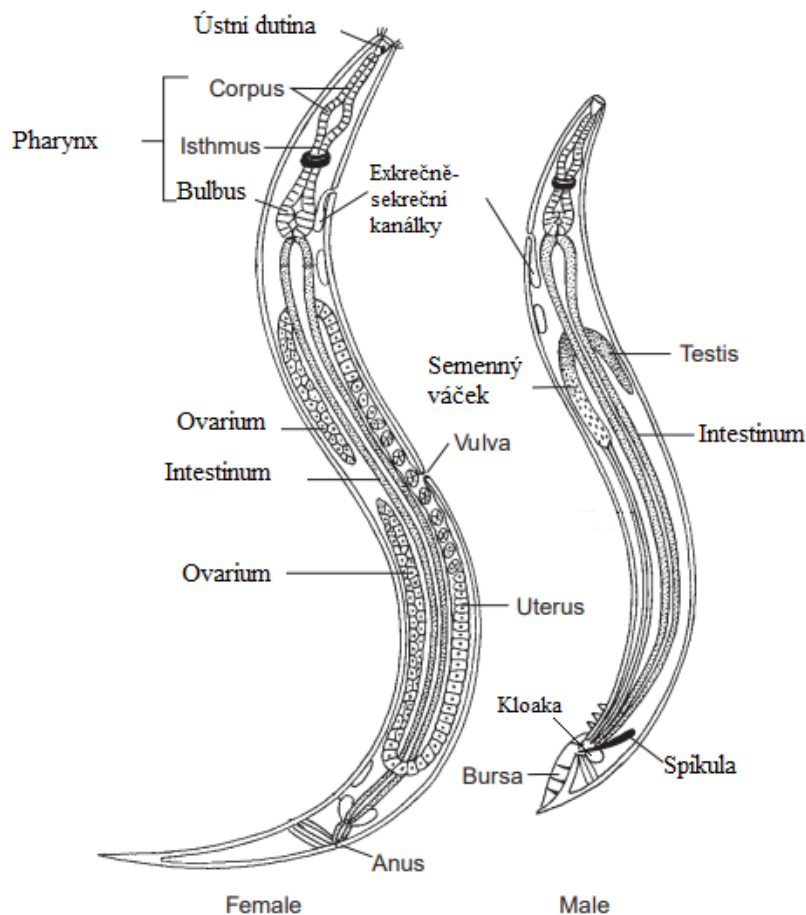
Celým tělem hlístice prochází trávicí trubice, která začíná ústním otvorem trojúhelníkového tvaru. V ústní dutině nalezneme dorzálně situovanou lancetu nezbytnou k perforaci abomasální sliznice. Na dutinu ústní nasedá jícen (*pharynx*), který dále pokračuje ve střevo. Konec trávicí trubice představuje u samic *rectum* a u samců kloaka, kam kromě trávicí soustavy ústí také pohlavní žlázy (Roberts *et* Janovy 2009).

Nervový systém je složen z jícnového nervového prstence, z něhož se do těla táhnou nervová vlákna propojená příčnými spojkami, tzv. komisurami. V hlavové části nalezneme dvě laterálně uložené amfidy, které představují chemorecepční orgány. Ty mohou odpovídat na podmínky prostředí (světlo a teplo) a napomáhat tak larvě L3 zaujmout stanoviště s nejvyšší pravděpodobností na setkání s hostitelem. V těle vlasovky nalezneme také další drobné senzory – papily, které mají mechanorecepční a chemorecepční vlastnosti (Basyoni *et* Rizk 2016, Ashton *et al.* 1999).

Reprodukční systém samic tvoří párové vaječníky, na něž nasedají vejcovody a dělohy. Vaječníky jsou lokalizovány zhruba na úrovni první třetiny střeva a zbytek pohlavní soustavy je ovinut okolo trávicí trubice naplněné krví. Dělohy mají silnou svalnatou stěnu a jsou naplněny velkými vajíčky v různém stádiu oogenetického vývoje. Na párové dělohy nasedá jedna vagína, která ústí do vulvy nacházející se na ventrální straně první poloviny těla. Vulva je kryta chlopňovitým výběžkem. Reprodukční systém samců je složen z nepárového varlete, chámovodu, semenných váčků a vývodného kanálku, jenž vede do kloaky. Dalším orgánem je kopulační bursa (*bursa copulatrix*) umístěná na konci těla. Jedná se o laločnatý orgán, z něhož vystupují spikuly. Spikuly představují jehlicovité útvary, které usnadňují přichycení samce k samici během kopulace a dále napomáhají přestupu spermií do vagíny (Naeem *et al.* 2021, Basyoni *et* Rizk 2016).

Exkreční systém vlasovky má tubulární charakter. Skládá se ze dvou dlouhých kanálů probíhajících v laterálních pásech hypodermis, které jsou v přední části těla propojeny příčným spojovacím kanálkem. Ten ústí do exkrečního póru umístěného na ventrální straně těla. Kromě sekrečně-exkreční funkce se tento systém podílí také na osmoregulaci (Basyoni *et* Rizk 2016).

Srdce ani cévní systém u hlístic nenalezneme. Funkci oběhového systému zde plní tekutina vyplňující pseudocoelomovou dutinu. Rovněž dýchací systém není vytvořen, neboť výměna plynů probíhá celým povrchem těla (Bártová *et* Klimeš 2004).



Obr. 1: Anatomie hlístic

(Roberts *et* Janovy 2009, upraveno)

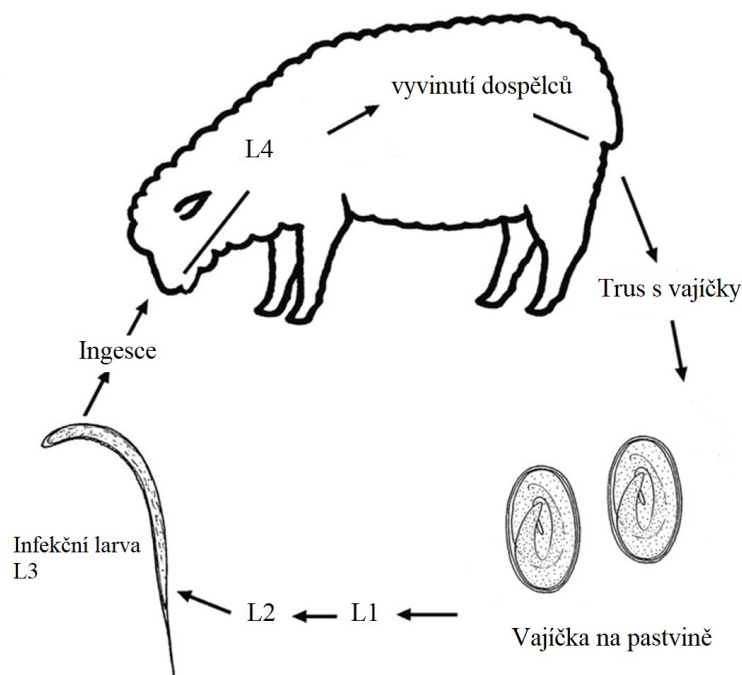
2.1.2 Životní cyklus

Životní cyklus vlasovky slezové trvá 3-4 týdny a je tvořen šesti vývojovými stádii. Parazitický způsob života zahajuje vlasovka během třetího larválního stádia (L3), zatímco první polovinu života žije volně, a tedy neparaziticky (Herath *et al.* 2021).

Prvním vývojovým stádiem jsou vajíčka, která se spolu s trusem infikovaného zvířete dostávají na pastviny. Zde při optimálních podmínkách (teplota 15-37 °C, vlhkost 85-100 %)

pokračuje jejich vývoj do prvního (L1) a druhého (L2) larválního stádia, která se živí bakteriemi a detritem. Larvy třetího stádia (L3) již potravu nepřijímají a díky pevné kutikule, vytvářející povrchové pouzdro, jsou vysoce odolné vůči vnějším nepříznivým podmínkám. Larva L3 je označována jako infekční, neboť je spolu s potravou pasivně přenesena do těla hostitele. Po ingesci zvířetem se L3 larva svléká a zanořuje do sliznice abomasu, kde probíhá přeměna na čtvrté larvální stádium (L4) (Naeem *et al.* 2021, Roeber *et al.* 2013b). V tomto bodě může dojít k tzv. hypobióze, při níž je další vývoj červa dočasně zastaven. Hypobiotická fáze může být navozena například z důvodu nepříznivého prostředí či imunitní odpovědi hostitele (Angulo-Cubillan *et al.* 2007).

Za příhodných podmínek pak vývoj pokračuje a je dovršen stádiem dospělého, který se stejně jako larvy L4 živí krví. Po spáření kladou oplozené samice v abomasu infikovaného zvířete až 10 tis. vajíček denně, která se spolu s trusem dostávají zpět na pastviny. Takto je započat další životní cyklus (Herath *et al.* 2021).



Obr. 2: Životní cyklus vlasovky slezové

(Roeber *et al.* 2013b, upraveno)

2.1.3 Léčba hemonchózy

Existuje řada strategií, jak přistoupit k léčbě hemonchózy - od pravidelného preventivního odčervování všech jedinců bez ohledu na skutečnou přítomnost infekce, až po léčbu indikovanou na základě specifických parametrů, jako např. anemického skóre, skóre tělesné kondice, přírůstku živé váhy či počtu vajíček v trusu infikovaného zvířete (Naeem *et al.* 2021).

K samotné léčbě jsou pak využívána anthelmintická léčiva. Výběr konkrétního anthelmintika či jejich kombinací by měl být proveden na základě zvážení nezbytnosti léčby, závažnosti infekce a prevalence anthelmintické rezistence v dané oblasti. Ve skutečnosti je také významně posuzovaná finanční nákladnost léčby (Herath *et al.* 2021). Nejvýznamnější skupiny anthelmintik jsou popsány níže.

Benzimidazoly

Benzimidazoly se řadí do skupiny anthelmintik se širokospektrým účinkem. Kromě léčby infekcí hlísticemi jsou využívány také proti tasemnicím (*Cestoda*) a některým motolicím (*Trematoda*). Mechanismus jejich účinku spočívá ve vazbě na cytoskeletální protein β -tubulin, čímž je potlačena jeho polymerace a tvorba mikrotubul. Výsledkem této interakce je pak narušení buněčné struktury a mitotického dělení s následkem buněčné smrti. Mezi zástupce této skupiny patří thiabendazol, fenbendazol, albendazol, případně jejich sulfoxidové deriváty (Herath *et al.* 2021, Minagawa *et al.* 2021).

Imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny

Ačkoliv se jedná o strukturně odlišné látky, sdílejí stejný mechanismus účinku – jsou agonisty nikotinových acetylcholinových receptorů (NAChR). Aktivací těchto receptorů dochází ke spastické paralýze svalstva parazita a k jeho následnému vypuzení z těla hostitele. Představitelem anthelmintik ze skupiny imidazothiazolů je levamisol. Zástupci tetrahydropyrimidinů jsou pyrantel a morantel (Herath *et al.* 2021).

Makrocyclické laktony

Makrocyclické laktony jsou látky působící kromě většiny hlístic také na některé ektoparazity. Princip jejich účinku spočívá ve vazbě na glutamát-chloridové kanály v nervových a svalových buňkách. Hyperpolarizace těchto buněk, která vede k úniku chloridových iontů, je příčinou paralýzy červa a jeho následné smrti. Tyto látky poskytují také prodloužený protektivní účinek, který je důsledkem jejich lipofilní struktury, široké tkáňové

distribuce a nízké clearance. Zástupci této skupiny léčiv jsou ivermektin, avermektin a moxidectin (Lanusse *et al.* 2016).

Deriváty aminoacetonitrilu

Jediným představitelem této skupiny anthelmintik je monepantel, který cílí na larvální i dospělá vývojová stádia gastrointestinálních hlístic (Herath *et al.* 2021). Monepantel působí v nízkých koncentracích jako pozitivní allosterický modulátor nikotinových acetylcholinových receptorů specifických pro hlístice, v koncentracích vyšších ($> 0,1 \mu\text{M}$) funguje jako jejich přímý agonista. Tímto účinkem navozuje spastickou paralýzu a následnou smrt parazita (Abongwa *et al.* 2017).

Salicylanilidy a substituované fenoly

Léčiva této skupiny jsou využívána nejen k léčbě infekcí způsobených hlísticemi, ale působí také proti tasemnicím, motolicím a některým ektoparazitům (klíšťata, vši) (Lanusse *et al.* 2016). Mechanismem účinku je narušení energetického metabolismu buněk parazita, tzv. uncoupling oxidativní fosforylace, který vede k depleci ATP. Mezi salicylanilidy patří closantel a rafoxanid. Příkladem substituovaných fenolů jsou disofenol a nitroxynil (Herath *et al.* 2021).

2.2 Anthelmintická rezistence

Pojmem anthelmintická rezistence rozumíme stav, kdy aplikace standardních dávek léčiva, v našem případě anthelmintika, nepřináší očekávaný terapeutický efekt či je pro jeho dosažení potřeba zvýšit koncentraci léčivé látky nad standardní mez (Kaplan 2020). Jinými slovy dochází k navýšení počtu jedinců odolných k dávčím léčiva, které jsou pro zbytek populace téhož druhu letální (Muchiut *et al.* 2018).

U parazitických hlístic se setkáváme s širokým rozsahem anthelmintické rezistence, která je důsledkem jejich příhodných biologicko-genetických vlastností (krátký životní cyklus, vysoká reprodukční rychlost a genetická diverzita) a nevhodného managementu léčby. Mezi faktory, které k rozvoji rezistence přispívají, patří zejména časté a profylaktické podávání anthelmintik a poddávkování, vyplývající z nesprávně stanovené váhy infikovaného zvířete (Kaplan 2020, Fissiha *et Kinde* 2021).

Celosvětový rozsah anthelmintické rezistence dokládá také řada studií. Národní studie v Austrálii prokázala 96% prevalenci rezistence k benzimidazolům a levamisolu a 54% prevalenci k makrocyclickým laktonům. Studie provedené ve Skotsku odhalily více než 80% rezistenci k benzimidazolům. Podobná situace je i v Jižní Americe, kde v některých oblastech Brazílie dosahuje rezistence k albendazolu a ivermektinu 100 %, přičemž 54 % testovaných farem vykazuje známky multilékové rezistence. Obdobné výsledky přinesl i průzkum z Jižní Afriky, podle něhož vykazovala vlasovka slezová 99% rezistenci k minimálně jednomu testovanému anthelmintiku (benzimidazoly, ivermektin, levamisol, rafoxanid) (Muchiut *et al.* 2018).

2.2.1 Mechanismy anthelmintické rezistence

Aktivita anthelmintik závisí na procesech farmakodynamických, týkajících se vazby léčiva na cílové místo, ale také farmakokinetických, které předurčují koncentraci, v jaké se léčivo ke svému cíli dostane. Podstatou anthelmintické rezistence jsou změny těchto farmakodynamických i farmakokinetických procesů, jejichž následkem je pak snížení aktivity léčiv (Stuchlíková Raisová *et al.* 2018). Mezi nejvýznamnější mechanismy rezistence patří:

1. modifikace cílové struktury

Alterace cílové struktury léčiva vede ke snížení afinity léčiva k danému místu či úplné ztrátě schopnosti toto místo rozpoznat. Cílovým místem může být enzym, transportér nebo jiná buněčná struktura, jejichž funkce je vazbou léčiva znemožněna. Podstatou modifikace cílového místa je mutace v genu kódující danou strukturu (Harder 2016, Wolstenholme *et al.* 2004).

2. zesílení metabolismu léčiva

Anthelmintická rezistence je také spojena se zvýšenou aktivitou biotransformačních enzymů, které se podílejí na deaktivaci xenobiotik, včetně anthelmintik. Zvýšenou konstitutivní expresi můžeme pozorovat jak u některých enzymů první fáze biotransformace, které xenobiotika deaktivují oxidačními, redukčními či hydrolyzačními reakcemi (cytochromy P450), tak u biotransformačních enzymů druhé fáze, využívající reakce konjugační (např. UDP-glykosyltransferázy) (Matoušková *et al.* 2016).

3. zvýšený eflux léčiva

Součástí systému, jenž interaguje s xenobiotiky a chrání tělo parazita před jejich působením, jsou také efluxní transportéry. Jedná se o transportní proteiny lokalizované v cytoplazmatické membráně buněk, které zprostředkovávají aktivní přesun xenobiotik do extracelulárního prostoru. Tímto mechanismem snižují intracelulární koncentraci léčiv a možnost jejich navázání na cílové místo. Nejznámějšími efluxními transportéry jsou P-glykoproteiny (Fissiha *et* Kinde 2021).

2.2.2 Anthelmintická rezistence u vlasovky slezové

V současné době je vlasovka slezová schopna vyvinout rezistenci ke všem dostupným anthelmintikům, včetně jejich kombinací (Besier *et al.* 2016). Doba potřebná k rozvoji rezistence se pohybuje od 4 do 9 let po zavedení léčiv do praxe (Herath *et al.* 2021).

1. Rezistence k benzimidazolům

Rezistence k této třídě anthelmintik je založena na modifikaci cílové struktury léčiva, konkrétně β -tubulinu. Tato změna je výsledkem jednonukleotidového polymorfismu (SNP) z TTC₂₀₀ na TAC₂₀₀, která vede k náhradě fenylalaninu tyrosinem v pozici 200. Další SNP je možné nalézt v kodonech 167 a 198, avšak jejich výskyt není příliš rozšířený. Tyto mutace se mohou vyskytovat souběžně, avšak nikdy na stejné alele (Kotze *et* Prichard 2016).

2. Rezistence k imidazothiazolům

Příčinou rezistence k imidazolovým anthelmintikům je patrně alterace jejich cílového místa, tedy nikotinových acetylcholinových receptorů (NAchR). U rezistentních jedinců je popisováno několik způsobů modifikace těchto receptorů. První možností je zkrácení genů Hco-unc-63 a Hco-acr-8 pro podjednotky NAchR receptoru, což vede k narušení správné funkce receptoru. Další možnou změnou je snížená exprese genů pro podjednotky tohoto receptoru (konkrétně genů Hco-unc-63a, Hco-unc-63b, Hco-acr-8a a všech paralogů genu Hco-unc-29) a také snížená exprese genů pro proteiny, které se na správné funkci NAchR podílejí (Hco-unc-74, Hco-unc-50, Hco-ric-3.1 a Hco-ric-3.2). Všechny výše zmíněné modifikace vedou ke snížení počtu NAchR, která je pak samotnou podstatou rezistence k této skupině léčiv (Arsenopoulos *et al.* 2021, Kotze *et* Prichard 2016).

3. Rezistence k makrocyclickým laktonům

Rezistence vůči makrocyclickým laktonům doposud nebyla jednoznačně objasněna. Studie, zabývající se tímto typem rezistence, totiž poukazují na několik možných mechanismů vedoucích ke ztrátě citlivosti k těmto anthelmintikům. Mezi zvažované příčiny rezistence patří mutace v genu pro α -podjednotku glutamát-chloridového kanálu, změny receptorů pro kyselinu γ -aminomáselnou, ale také zvýšený eflux zajištěný P-glykoproteiny (Kotze *et* Prichard 2016).

4. Rezistence k derivátům amino-acetonitrilu

Ztráta citlivosti vlasovky slezové k monepantelu, která byla navozena experimentálními podmínkami, je spojována s mutacemi v genech Hco-acr-23H a Hco-MPTL-1 pro nikotinový acetylcholinový receptor. Tyto mutace vedly k chybnému sestřihu pre-mRNA a předčasné terminaci translace (Kotze *et* Prichard 2016). Rezistence k monepantelu již byla pozorována i v přírodních podmínkách, avšak mechanismy jejího vzniku zatím nebyly objasněny (Van Den Brom *et al.* 2015).

5. Rezistence k salicylanilidům

Mechanismy vzniku rezistence ke closantelu zatím nejsou plně vysvětleny. Existuje však několik předpokladů založených na výsledcích doposud provedených studií, které detekovaly redukované množství anthelmintika v tělech rezistentních červů. Domnělou příčinou této rezistence by mohl být snížený příjem anthelmintika rezistentními parazity, pevná vazba closantelu na albumin a jeho obtížná disociace v trávicím traktu červa či zvýšená exkrece pomocí efluxních transportérů (Arsenopoulos *et al.* 2021).

2.2.3 Detekce anthelmintické rezistence

K odhalení a monitorování rezistence k anthelmintickým léčivům slouží metody prováděné *in vivo*, *in vitro* a metody molekulárně-biologické (Fissiha *et* Kinde 2021).

1. *In vivo* testy

Celosvětově využívanou metodou pro posouzení přítomnosti anthelmintické rezistence je testování úbytku vajíček parazita v trusu infikovaného zvířete neboli FECRT (z angl. *Faecal Egg Count Reduction Test*). Provedení tohoto testu je pracné, ale nevyžaduje porážení

infikovaných zvířat. Samotný test spočívá v porovnání počtu vajíček parazita v trusu zvířete před zahájením léčby a po léčbě (Muchiut *et al.* 2018). Testu se účastní také skupina infikovaných zvířat, která léčbu nepodstoupila a figuruje zde jako kontrolní soubor.

K výpočtu FECRT je možné použít níže uvedenou rovnici, kde parametr X_T představuje aritmetický průměr počtu vajíček na 1 gram trusu zvířete léčeného anthelmintiky a X_C aritmetický průměr počtu vajíček v 1 gramu trusu zvířete z kontrolní skupiny (Kaplan 2009).

$$FECR[\%] = 100 \times (1 - X_T/X_C)$$

Rezistence je považována za přítomnou, je-li procentuální pokles v počtu vajíček parazita nižší než 95 % a spodní 95% hladina spolehlivosti je nižší než 90 % (Kotze *et Prichard* 2016).

Další *in vivo* technikou k vyšetření anthelmintické rezistence je kontrolovaný test účinnosti zkráceně CET (z angl. *Controlled Efficacy Test*), který je vysoce spolehlivý, avšak oproti FECRT vyžaduje porážku vyšetřovaných zvířat. Podstata této techniky spočívá v určení skutečného počtu parazitů v gastrointestinálním traktu získaného během pitvy ze zvířete léčeného anthelmintiky a zvířete neléčeného. Pro svou nákladnost však tento test není příliš využíván (Muchiut *et al.* 2018).

2. *In vitro* metody

Tato skupina metod oproti technikám *in vitro* nestanovuje skutečné počty parazitických hlístic či jejich vajíček, ale zkoumá schopnost anthelmintik zasáhnout do vývojového cyklu parazitů a eliminovat tak počet dospělých jedinců.

Test líhnutí vajíček neboli EHT (z angl. *Egg Hatch Test*) umožňuje detekovat přítomnost rezistence ke skupině benzimidazolových anthelmintik. Tato skupina léčiv totiž disponuje ovicidními vlastnostmi, inhibuje embryonaci a líhnutí čerstvých vajíček parazitů. Provedení testu je založeno na inkubaci čerstvých vajíček parazita s roztoky anthelmintika o různé koncentraci. Vajíčka rezistentních kmenů parazita jsou schopny podléhat dalšímu vývoji a líhnout se i v takových koncentracích léčiva, která jsou pro citlivé kmeny letální. Ze získaných dat je určena hodnota LC_{50} , která je porovnána s oficiální LC_{50} uznávanou pro dané léčivo (Fissiha *et Kinde* 2021).

Další *in vitro* technikou je testování vývoje larev neboli LDA (z ang. *Larval development assay*), kterou je možno využít k detekci rezistence proti benzimidazolům, imidazothiazolům a makrocyclickým laktonům. Výhodou je možnost vyšetřit rezistenci k těmto anthelmintikům současně během jednoho testovacího běhu. Principem testu je sledování schopnosti vývoje parazita ze stádia vajíčka po infekční L3 larvu v přítomnosti různých koncentrací anthelmintik. Samotný test pak existuje ve dvou modifikacích, a to buď s kultivačním médiem tekutým či agarovým (Kotze *et Prichard* 2016).

3. Metody molekulárně-biologické

Tyto metody detekují anthelmintickou rezistenci na úrovni mutací DNA, přítomných u rezistentních parazitů. Mezi techniky využívané k detekci těchto změn patří zejména alelově-specifická PCR, real-time PCR, analýza polymorfismu délky restrikčních fragmentů či pyrosekvenování. Výhodou molekulárně-biologických metod je především jejich vysoká sensitivita a specifita a možnost použití DNA izolované nejen z dospělých parazitů, ale také z vajíček a larev. V současné době lze však těmito metodami stanovit pouze rezistenci k benzimidazolům, neboť je její genetická podstata plně definována (Muchiut *et al.* 2018).

2.3 ABC transportéry

ABC transportéry náleží do velké a rozmanité rodiny ABC proteinů, které nalzáme napříč všemi živými organismy. Pro tuto proteinovou rodinu je charakteristická schopnost hydrolýzy nukleosid trifosfátu (NTP) a využití uvolněné energie ke katalýze různých biochemických procesů (Hopfner 2016).

ABC transportéry jsou lokalizovány v plazmatické membráně buněk či buněčných organel. Tyto proteiny hydrolyzují ATP a uvolněnou energii využívají k transportu různorodých substrátů skrze lipidovou dvojvrstvu. Tento proces je na dodání energie závislý, neboť se jedná o transport látek proti jejich koncentračnímu gradientu. Substrátem ABC transportérů mohou být ionty, cukry, aminokyseliny, polysacharidy, peptidy, proteiny, ale také různá xenobiotika. U prokaryot zajišťují ABC transportéry export látek endogenních, ale také import látek nezbytných k životu. U eukaryot mají tyto proteiny efluxní charakter a slouží tedy k transportu substrátu z buněk do extracelulárního prostoru (Goffeau *et Hertogh* 2013).

2.3.1 Struktura a mechanismus funkce transportérů

ABC transportéry jsou v aktivním stavu složeny celkem ze čtyř domén - dvou nukleotid-vázajících domén (NBD) a dvou domén transmembránových (TMD). Tyto domény se mohou nacházet jak separátně na izolovaných polypeptidových řetězcích (typicky prokaryot), tak společně na jednom polypeptidovém řetězci (Theodoulou *et* Kerr 2015). Ty je pak možné dále rozlišit na transportéry celistvé, tvořené polypeptidovým řetězcem se všemi čtyřmi doménami (TMD-NBD-TMD-NBD), a transportéry poloviční (TMD-NBD), které musí dodatečně dimerizovat, aby byl transportér funkční (Liu *et* Pan 2019).

NBD domény jsou umístěny v cytoplazmě, kde váží a hydrolyzují ATP. V jejich struktuře lze odlišit dvě subdomény – katalytickou a α -helikální. Katalytická subdoména obsahuje strukturně konzervované motivy. Jedná se např. o Walkerův A motiv, jenž interaguje s fosfátovými skupinami ATP, a Walkerův B motiv s charakteristickou sekvencí *h-h-h-h-D*, kde *h* představuje jakékoliv hydrofobní reziduum a *D* aminokyselinu glutamát, která aktivuje molekulu vody k ataku γ -fosfátu ATP. Dalšími konzervovanými strukturami jsou pak D-smyčka, nacházející se v místě kontaktu dvou NBD domén, a A-smyčka, jejíž postranní aromatický řetězec leží v blízkosti adeninové části vázaného ATP. α -helikální subdoména obsahuje C-smyčku s typickým motivem LSGGQ, jenž se podílí na navázání struktury ATP a Q-smyčku, důležitou ke kontaktu s TMD doménami. Obě domény NBD zaujímají vzájemnou konformaci „hlava-ocas“. Strukturně konzervované motivy jsou tak orientovány proti sobě na rozhraní těchto domén, čímž vznikají dvě vazebná místa pro ATP (Liu *et* Pan 2019, Hollenstein *et al.* 2007).

Transmembránové domény (TMD) zajišťují vlastní translokaci příslušných substrátů. Ve své struktuře obsahují hydrofobní aminokyseliny umožňující jejich pevné ukotvení v lipidové dvojvrstvě. Oproti doménám NBD jsou strukturně variabilní, což podtrhuje jejich schopnost transportu chemicky různorodých substrátů. Mohou se lišit jak primární strukturou, tak délkou, konformací či počtem transmembránových úseků. Efluxní ABC transportéry obsahují 6 transmembránových úseků na jednu TMD doménu, zatímco ABC importéry prokaryot mají těchto úseků celkem 10-20 (Hollenstein *et al.* 2007, Pierman *et al.* 2018). Další odlišností efluxních transportérů je přítomnost intracelulárních smyček, které vybíhají z lipidové dvojvrstvy hlouběji do cytoplazmy. Mezi transmembránovými úseky nalezneme také tzv. párovací smyčky, které zajišťují napojení na NBD domény v oblasti Q-smyček α -helikálních subdomén (Rees *et al.* 2009).

Mechanismus translokace substrátu ABC transportérem spočívá ve změně jeho konformace, která je vyvolána navázáním ATP. V době nepřítomnosti nukleotidu zauímají NBD domény otevřené uspořádání. To se však mění po vazbě ATP, kdy se domény přiblíží a dochází k těsnému sevření nukleotidu. Tato konformační změna je prostřednictvím Q-smyčky přenesena na TMD domény s navázaným substrátem, kde iniciuje změnu afinity k substrátu ze stavu vysokoafinitního na nízkoafinitní. V této chvíli je substrát uvolněn na opačnou stranu membrány. Následná hydrolyza ATP vede k otevření NBD domén svírajících nukleotid a obnovení vysokoafinitního uspořádání TMD domén na původní straně membrány (Liu *et Pan* 2019, Hollenstein *et al.* 2007).

2.3.2 Lidské ABC transportéry

V lidském těle nalezneme 49 ABC transportních proteinů uspořádaných do 7 podrodin (ABCA až ABCG), které sdružují transportéry s obdobnou strukturou genu, aminokyselinovou sekvencí a doménovou organizací. Tyto transportní proteiny jsou lokalizovány na apikálním či bazolaterálním povrchu buněk mnoha orgánů, např. jater, tenkého střeva, ledvin či mozku, kde kromě transportu látek endogenních zajišťují přenos také řady xenobiotik, včetně léčiv. Některé ABC transportéry jsou navíc zapojeny do procesů udržení buněčné homeostázy, buněčného dělení, prezentace antigenu či regulace iontových kanálů (Liu *et Pan* 2019, Russel 2010).

U lidí mohou ABC transportéry zastávat také roli kauzálních faktorů při rozvoji některých onemocnění. Dochází k tomu tehdy, je-li příslušný gen mutován a funkce transportéru narušena. Nejvýznamnějším příkladem takového onemocnění je cystická fibróza, při níž dochází k mutaci genu CFTR/ABCC7, jehož produktem je ATP-řízený chloridový kanál. Mezi další onemocnění, jejichž podstatou je narušená funkce ABC transportérů, patří Tangierova choroba, Pseudoxanthoma elasticum či Dubin-Johnsonův syndrom (Theodoulou *et Kerr* 2015).

Neméně významné je uplatnění ABC transportérů při rozvoji mnohočetné lékové rezistence (MDR), která se u lidí týká zejména léčiv protinádorových. Pojem MDR označuje schopnost buněk rozvinout rezistenci k širokému spektru strukturálně a funkčně odlišných léčiv. Podstatou této rezistence je nadměrná exprese ABC transportérů rakovinnými buňkami. Zvýšený eflux léčiv je pak důsledkem jejich snížené intracelulární koncentrace, což vede k omezení jejich apoptického či cytotoxického účinku. Na rozvoji MDR se největší měrou podílejí tři ABC transportéry: P-glykoprotein (ABCB1), multidrug resistance protein 1

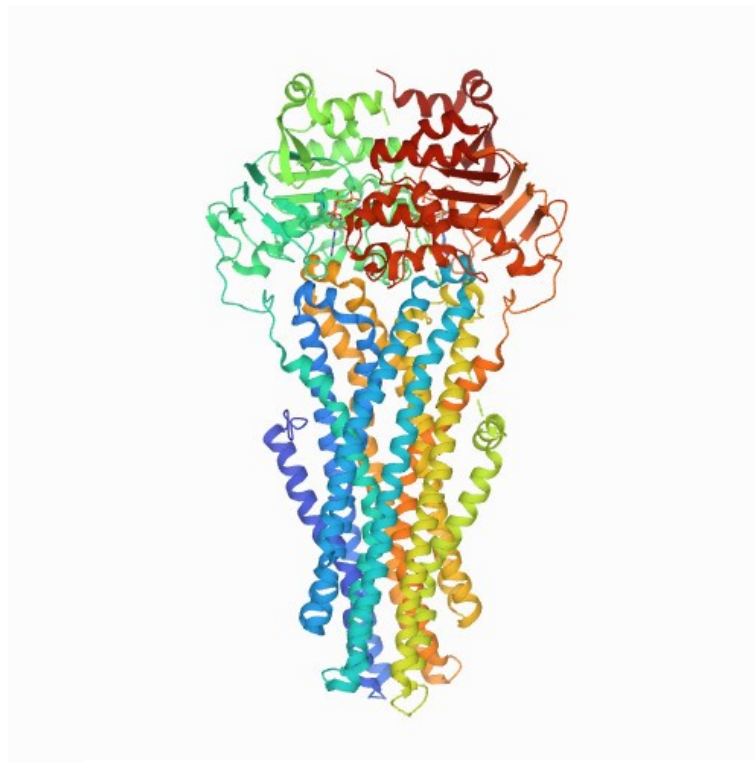
(MRP1, ABCC1) a breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) (Sun *et al.* 2012, Lange 2007).

P – glykoprotein (ABCB1)

P-glykoprotein (z angl. *Permeability-associated glycoprotein*) je nejdéle známým a nejlépe popsáným ABC transportérem nacházejícím se v lidském těle. Tento transportní protein o hmotnosti 170 kDa a délce 1280 aminokyselin je kódován genem MDR1/ABCB1, nacházejícím se na chromozomu 7q21 (Xiao *et al.* 2021).

P-glykoprotein je fyziologicky exprimován v celé řadě tkání. Nalezneme jej na povrchu buněk proximálních tubulů ledvin, hepatocytů, v buňkách kůry nadledvin, tenkého střeva, placenty či hematoencefalické bariéry. Místem lokalizace je vždy apikální či lumenální strana buněk. Tento transportér zde totiž plní ochrannou funkci a brání buňky před vstupem nežádoucích a potenciálně toxických látek. Exprimován je však i v rakovinných buňkách, kde je příčinou již zmíněné MDR. Vyskytuje se v buňkách solidních nádorů i hematologických malignit, kde jeho přítomnost negativně koreluje s pozitivní léčebnou odezvou (Sun *et al.* 2012).

Tento transportér je schopen vázat a přenášet širokou škálu substrátů, od malých molekul s hmotností 350 Da až po polypeptidové struktury s hmotností 4 000 Da. Typicky se však jedná o neutrální či pozitivně nabitě látky hydrofobního charakteru. Z léčiv se kromě cytostatik jako jsou antracykliny, vinca alkaloidy a taxany, jedná například o blokátory vápenatých kanálů, imunosupresiva, antihistaminika či inhibitory HIV proteáz (Liu *et Pan* 2019, Sun *et al.* 2012).



Obr. 3: Struktura lidského P-glykoproteinu
(Protein Data Bank [online])

Multidrug resistance protein 1 (MRP1)

Tento protein, kódovaný genem *ABCC1* na chromozomu 16p13, byl prvním objeveným zástupcem C podrodiny ABC transportérů. Fyziologicky jej můžeme nalézt např. ve tkáni plic, varlat, placenty, ledvin, kosterního svalstva či mozku. Lokalizován je kromě mozkových kapilár a placentární tkáně vždy na bazolaterální membráně buněk. Zvýšená exprese MRP1 byla pozorována také u několika typů rakovinných onemocnění např. neuroblastomu či nemalobuněčného karcinomu plic (Xiao *et al.* 2021). Obdobně jako P-glykoprotein má i tento transportér širokou substrátovou specifitu, umožňující rozvoj MDR. Charakteristickými substráty MRP1 jsou organické anionty amfipatické povahy, které jsou většinou konjugovány s glutathionem, glukuronidy či sulfáty. Kromě celé řady xenobiotik se MRP1 podílí také na transportu některých endogenních látek, a to třeba cysteinylleukotrienu C4 (Liu *et Pan* 2019).

Breast cancer resistance protein (BCRP)

Transportér BCRP o hmotnosti 72 kDa a délce 655 aminokyselin je kódován genem ABCG2 nacházejícím se na chromozomu 4q22. Řadíme jej mezi transportéry poloviční, které musí pro své správné fungování dimerizovat. BCRP je exprimován na apikální membráně buněk placenty, tenkého střeva, mléčných žláz, prostaty, mozku, jater a vaječníků, ale také v mnoha typech rakovinných buněk. Jeho exprese je zde považována za negativní prognostický marker, a to zejména u akutní myeloidní leukémie. Zvýšenou expresi BCRP, která je důsledkem MDR, můžeme pozorovat také např. u rakoviny tlustého střeva, prsou, žaludku či glioblastomu. Mezi substráty BCRP patří kromě protinádorových léčiv a dalších xenobiotik také látky endogenní, a to např. konjugáty steroidních hormonů (Sun *et al.* 2012, Degorter *et al.* 2012).

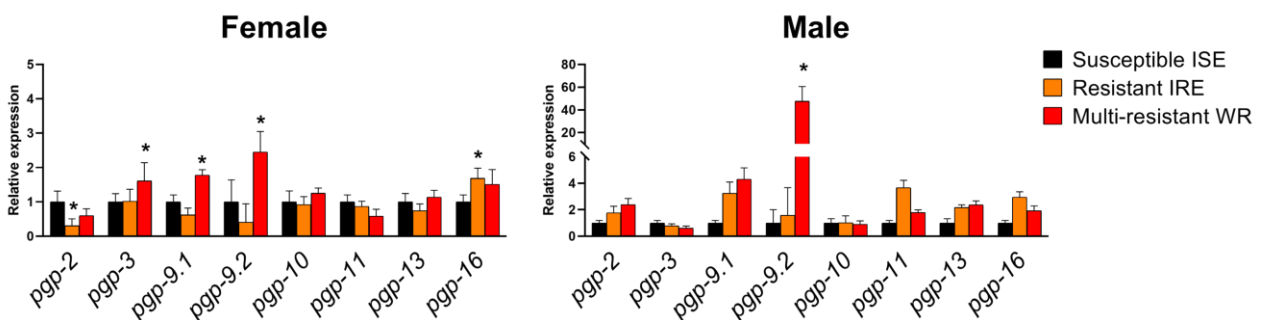
2.3.3 ABC transportéry u vlasovky slezové

Jak již bylo řečeno dříve, ABC transportéry nalézáme napříč všemi živými organismy, včetně hlístic. Obdobně jako u lidí i zde plní řadu fyziologických funkcí, především však poskytují ochranu před toxiny pocházejícími z okolního prostředí. V současnosti je těmto transportérům věnována pozornost zejména v souvislosti s anthelmintickou rezistencí, na jejímž rozvoji nesou dle řady studií významný podíl. U rezistentních kmenů některých helmintů byla totiž prokázána zvýšená exprese několika ABC transportérů. Narušením či úplnou delecí genů pro tyto transportéry byla citlivost k anthelmintikům zvýšena. Rovněž užití inhibitorů ABC transportérů vedlo k obnovení citlivosti rezistentních hlístic k anthelmintické léčbě (Ardelli 2013).

Studium ABC transportérů u vlasovky slezové započalo odkrytím jejího genomu v roce 2013 (Laing *et al.* 2013). Celkem bylo v genomu vlasovky identifikováno 46 ABC transportérů (Matoušková 2016). Největší pozornost je přitom věnována P-glykoproteinům, a to z důvodu jejich známé účasti na lékové rezistenci u savců. Oproti lidem, u nichž nacházíme pouze jeden P-glykoprotein, je pro helminty typický výskyt několika homologních zástupců tohoto transportéru. Odlišné P-glykoproteiny by tak mohly bránit poškození gangliové nervové soustavy hlístice toxiny, zatímco u savců funkci ochrany centrálního nervového systému zajišťuje P-glykoprotein exprimovaný v hematoencefalické bariéře (Prichard *et al.* 2007). U vlasovky slezové bylo nalezeno celkem 10 P-glykoproteinů (Laing *et al.* 2013). Dle studie provedené Kellerovou P. a kolektivem se konstitutivní exprese těchto

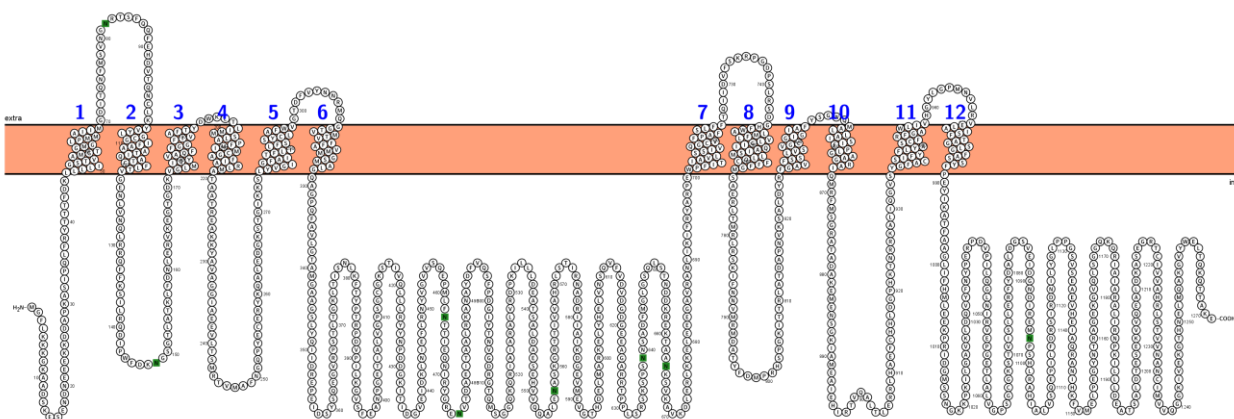
transportérů liší v závislosti na pohlaví a také mezi rezistentními (IRE - Inbred resistant-Edinburgh, WR - Wild River) a citlivým (ISE - Inbred susceptible-Edinburgh) kmenem vlasovky. Ze sedmi studovaných genů pro P-glykoproteiny vykazoval nejvyšší míru konstitutivní exprese u rezistentních kmenů gen Pgp-9.2 a dále Pgp-9.1 a Pgp-11. V rámci této studie byla také sledována změna exprese jednotlivých P-glykoproteinů po vystavení červů subletálními dávkami ivermektinu. Významně zvýšená exprese navozená ivermektinem byla pozorována u Pgp-9.2 (u samců), Pgp-10 a Pgp-11 (u samic). Většina studovaných transportérů byla silněji exprimována v červech samčího pohlaví, což může indikovat odlišnost detoxifikačních mechanismů mezi pohlavími (Kellerová *et al.* 2019).

Významné rozdíly v expresi jednotlivých P-glykoproteinů byly pozorovány také v průběhu vývojového cyklu vlasovky slezové. V parazitických stádiích (larva L4 a dospělec) byla oproti volně žijícím formám prokázána zvýšená exprese Pgp-3, Pgp-9.2, Pgp-11 a Pgp-16 (Issouf *et al.* 2014). Výsledky další studie navíc prokázaly zvýšenou expresi Pgp-9.2 v L3 larvách rezistentního izolátu oproti citlivému izolátu vlasovky slezové (Raza *et al.* 2016).



Obr. 4: Konstitutivní exprese Pgp-9.2 u rezistentních a citlivého kmene vlasovky slezové

(Kellerová *et al.* 2019)



Obr. 5: Znárodnění struktury Pgp-9.2 pomocí programu Protter

[<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>]

2.4 RNA *in situ* hybridizace

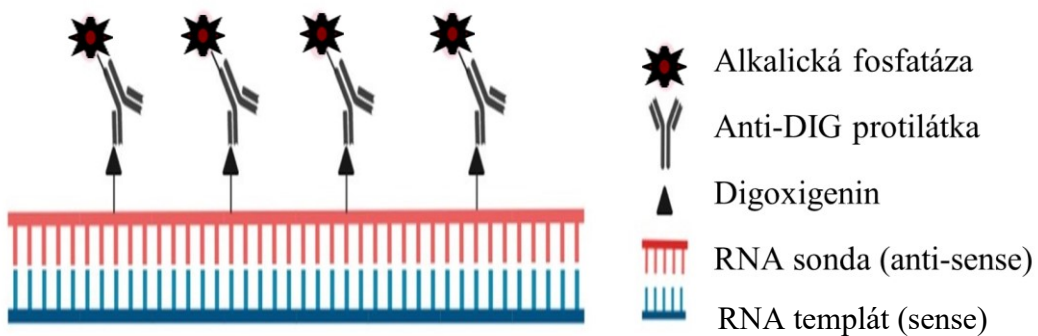
RNA *in situ* hybridizace je molekulárně-biologická metoda využíváná k vizualizaci genové exprese a stanovení prostorové distribuce mRNA transkriptů. Podstatou této metody je specifická vazba značené RNA sondy ke komplementární sekvenci RNA v biologickém materiálu. Výsledkem spojení značené *anti-sense* sondy se *sense* mRNA je pak dvouřetězcová hybridní molekula, kterou je možno detekovat metodou kompatibilní s charakterem použité značky. Zkoumaný biologický materiál přitom může být zpracován do podoby histologických řezů, či ponechán celistvý (modifikace metody na tzv. Whole Mount *in situ* hybridization) (Tsai *et* Harding 2013, Jensen 2014).

RNA sondy mohou být značeny třemi základními typy látek: radioizotopy, fluorochromy a hapteny (antigeny). Značení radioizotopy (nejčastěji ^3H , ^{35}S , ^{125}I , ^{32}P) je však dnes na ústupu, a to zejména kvůli časové náročnosti autoradiografické detekce, krátké životnosti izotopů a nutnosti dodržování přísných pravidel, které s sebou práce s radioaktivním materiálem přináší. Většina současných aplikací *in situ* hybridizace využívá sondy značené biotinem, digoxigeninem, fluoresceinem či bromodeoxyuridinem. Dle způsobu jejich detekce pak rozlišujeme dvě modifikace této metody, a to fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) a mladší chromogenní *in situ* hybridizaci (CISH) (Long *et* Lloyd 1997, Chotteau-Lelièvre *et al.* 2005).

2.4.1 Chromogenní *in situ* hybridizace (CISH)

Podstatou metody chromogenní *in situ* hybridizace je reakce enzymu peroxidázy či alkalické fosfatázy s chromogenním substrátem, která vede ke vzniku barevného precipitátu v místě hybridizované RNA sondy. Tato sonda je nejčastěji značená digoxigeninem, který je do její struktury inkorporován během procesu *in vitro* transkripce. Vlastní detekce navázaných sond je poté umožněna přidáním anti-digoxigenin protilátek konjugovaných s enzymem (Jensen 2014, Chottteau-Lelièvre *et al.* 2005).

Nespornou výhodou chromogenní *in situ* hybridizace oproti metodě FISH je možnost detekce barevného produktu pomocí klasické světelné mikroskopie, nižší cena provedení, ale také stabilita výsledných preparátů (Hanna *et* Kwok 2006).



Obr. 6: Mechanismus chromogenní RNA *in situ* hybridizace

(Young *et al.* 2020, upraveno)

3. CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce byla příprava plazmidů pro *in vitro* syntézu hybridizačních RNA sond značených digoxigeninem a užití těchto sond při detekci mRNA P-glykoproteinu-9.2 v histologických řezech vlasovky slezové metodou chromogenní RNA *in situ* hybridizace.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Technické a chemické vybavení, biologický materiál

4.1.1 Technické vybavení

Přístroje

Autokláv, SHP Steriltechnik AG

Automatické pipety, Eppendorf

Centrifuga 5415 D, Eppendorf

Centrifuga Biofuge stratus Heraeus, Thermo Fisher Scientific

Elektroforetická soustava Owl™ EasyCast™ B1A Mini Gel, Thermo Scientific™

Elektroforetický zdroj PowerPac Basic, BioRad

Hlubokomrazicí box Vxe Series Jouan, Thermo Scientific

Inkubátor Incubat 80, Melag

Inkubátor NB-205, N-Biotek

Kuličkový homogenizátor FastPrep24, M.G.P.

Laboratorní váha M-Prove, Sartorius

Laminární box UVC/T-AR, BioSan

Mikroskop Eclipse TS 100, Nikon

Mikrovlnná trouba, Zanussi

Minicentrifuga Sprout, Heathrow Scientific

Spark Multimode Reader, Tecan

Thermocycler TAdvanced with High-Performance Smart Lid, Biometra

Thermomixer comfort, Eppendorf

Uvitec Alliance Q9 Advanced, Baria

Vodní lázeň s termostatem, Memmert

Vortex V-1, BioSan

Pomůcky

Laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, Erlenmeyerovy baňky, skleněné Petriho misky), barvicí nádoby, skleněný stojan na sklíčka, mikrozkušavky Eppendorf, jednorázové špičky, podložní a krycí sklíčka, plastové Petriho misky, očkovací hokejky, plastové falkony, parafilm, filtr 0,22 μm, stojany na zkumavky

4.1.2 Chemické vybavení

Chemikálie

20x SSC, Serva

Agarosa, Serva

Bouin's solution, Sigma-Aldrich

Dextran sulfate sodium salt, Sigma-Aldrich

Diethyl pyrocarbonate (DEPC), Sigma-Aldrich

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, Penta Chemicals

DTT, Sigma-Aldrich

EDTA disodium salt dihydrate, Sigma-Aldrich

Ethanol absolutní, Penta Chemicals

FastRed TR/Naphtol AS-MX tablety, Sigma-Aldrich

Formamid deionized, Carl Roth

Glycerin bezvodý, Penta Chemicals

Glycin p.a., Lachema n.p. Brno

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Penta Chemicals

Kyselina chlorovodíková, Penta Chemicals

Kyselina octová, Penta Chemicals

LB (Luria Bertani) agar, VWR Biochemicals

LB (Luria Bertani) broth, VWR Biochemicals

Maleinová kyselina, Sigma-Aldrich

Montovací medium ProLong Gold Antifade, Invitrogen

NaCl, Penta Chemicals

Proteinase K from *Tritirachium album*, Sigma-Aldrich

S.O.C. medium, Invitrogen

TRIreagent, Molecular Research Center

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Penta Chemicals

Tween 20, Sigma-Aldrich

Xylenes, Sigma-Aldrich

Enzymy

OneTaq[®] Quick-Load DNA polymeráza, New England BioLabs

Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase, New England BioLabs

Restrikční endonukleáza NcoI, New England BioLabs

Reverse Transcriptase- ProtoScript II, New England BioLabs

Kity

DIG Nucleic Acid Detection Kit, Roche

DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7), Roche

NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel

NucleoSpin Plasmid (No Lid), Macherey-Nagel

pGEM[®] -T Easy Vector Systems, Promega

ZymoPURE[™] II Plasmid Midiprep Kit, Zymo Research

Ostatní

Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche

DNA ladder 1 kbp, New England Biolabs

DNA ladder 100 bp, New England Biolabs

dNTP, Eurogentech

E. Coli competent cells JM109, Promega

Koňské sérum, Sigma-Aldrich

Green Gel Loading Buffer with DNA stain, Jena Bioscience

M13 Forward/Reverse Primer, Generi Biotech

Náhodné hexamery, GeneriBiotech

Ribonucleic Acid from *Torula utilis*, Sigma-Aldrich

Specifické primery pro přípravu sond, GeneriBiotech

SYBR Safe DNA Stain, Invitrogen

4.1.3 Příprava pufrů, roztoků a kultivačních médií

1x TAE pufr (500 ml)

1x TAE pufr byl připraven zředěním z 10x TAE pufru DEPC vodou. K 50 ml 10x TAE bylo přidáno 450 ml DEPC vody. Složení výsledného pufru bylo 40 mM Tris, 20 mM kyseliny octové a 1mM EDTA.

LB (Luria Bertani) agar (300 ml)

Tato kultivační půda byla připravena rozpuštěním 12 g LB agaru ve 300 ml destilované vody a následnou sterilizací při 121 °C v autoklávu. Ke zchlazenému LB agaru (na cca 50 °C) bylo přidáno 300 µl ampicilinu s koncentrací 50 mg/ml. Petriho kultivační misky byly naplněny zhruba 20 ml takto připravené směsi. Po úplném zatuhnutí bylo na půdu každé misky postupně rozetřeno 100 µl IPTG a 20 µl X-Gal. Zhotovené plotny byly uchovávány při teplotě 4 °C.

LB médium (100 ml, 50 ml)

LB médium bylo připraveno do jedné uzavíratelné lahve o objemu 150 ml a tří Erlenmeyerových baněk o objemu 50 ml. Navážky LB média v práškové podobě byly rozmíchány v destilované vodě v poměru 0,025 g/1 ml a po úplném rozpuštění autoklávovány při teplotě 121°C. Následně byl do vychladlého média přidán ampicilin (50 mg/ml) v poměru 1 µl na 1 ml média.

DEPC voda (4 x 900 ml)

V prostoru digestoře bylo do 4 lahví naplněných 900 ml ultračisté vody přidáno 900 µl DEPC činidla (diethyl pyrokarbonát). Směs byla důkladně promíchána a inkubována přes noc při laboratorní teplotě. Autoklávování proběhlo následující den při teplotě 121°C.

Pufr kyseliny maleinové – MAB (2 x 600 ml)

Navážka 7,55 g kyseliny maleinové (0,1 M) a 5,7 g chloridu sodného (0,15 M) byla rozpuštěna ve 650 ml DEPC vody. Výsledné pH pufru bylo pomocí peciček NaOH upraveno na hodnotu 7,5. Sterilizace pufru proběhla v autoklávu při 121 °C.

10% Tween 20 (2 ml)

Roztok 10% Tweenu 20 byl připraven do 5 ml sterilní zkumavky smícháním 200 µl Tweenu 20 a 1800 µl DEPC vody.

20% glycerol (250 ml)

Z důvodu vysoké hustoty glycerolu bylo jeho potřebné množství stanoveno skrze hmotnost. Roztok 20% glycerolu tak vznikl smícháním 63 g glycerolu a 200 ml DEPC vody. Sterilizace roztoku proběhla v autoklávu při 121 °C.

Substrátový pufr (250 ml)

Ve 250 ml DEPC vody bylo rozpuštěno 5,84 g chloridu sodného (0,4 M) a 3,03 g tris(hydroxymethyl)aminomethanu (0,1 M). pH výsledného roztoku bylo upraveno na hodnotu 8,2. Sterilizace pufru proběhla při 121 °C v autoklávu.

Pufr proteinázy K (250 ml)

Ve 250 ml DEPC vody bylo rozpuštěno 4,65 g disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) (50 mM) a 3,03 g Tris (0,1 M). Výsledné pH pufru bylo upraveno na hodnotu 8. Sterilizace pufru proběhla při 121 °C v autoklávu.

20% kyselina octová (200 ml)

Roztok 20% kyseliny octové byl připraven v den jeho použití přidáním 40 ml 99% kyseliny octové do 160 ml DEPC vody.

0,2% glycin (250 ml)

Roztok 0,2 % glycinu byl připraven rozpuštěním 0,5 g glycinu ve 250 ml DEPC vody.

0,1M fosfátový pufr (250 ml)

K přípravě 0,1 M fosfátového pufru byly nejdříve nachystány roztoky A a B. Roztok A vznikl rozpuštěním 7,16 g hydrogen fosforečnanu disodného dodekahydrátu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ve 100 ml DEPC vody. Obdobně byl připraven roztok B, a to rozpuštěním 3,12 g dihydrogen fosforečnanu sodného dihydrátu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 100 ml DEPC vody. Pro přípravu 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,2 bylo smícháno 90 ml roztoku A s 35 ml roztoku B a doplněno do 250 ml DEPC vodou. Na závěr bylo přidáno 1,75 g chloridu sodného. Takto připravený roztok byl autoklávován při 121 °C.

Promývací pufr (450 ml)

K přípravě promývacího pufru byly navážky 5,22 g kyseliny maleinové (0,1 M) a 3,95 g chloridu sodného (0,15 M) rozpuštěny ve 450 ml DEPC vody. Následně bylo do pufru přidáno 1,35 ml Tween 20. Výsledné pH pufru bylo upraveno na hodnotu 7,5 a takto připravený roztok byl sterilizován v autoklávu při 121 °C.

Detekční pufr (200 ml)

Detekční pufr vznikl rozpuštěním 3,15 g Tris hydrochloridu (0,1 M) a 1,17 g chloridu sodného (0,1 M) ve 200 ml DEPC vody. Poté byla upravena hodnota pH na 9,5 a pufr autoklávován při teplotě 121°C.

Blokovací pufr (50 ml)

Pro přípravu blokovacího pufru bylo naváženo 5 g blokovacího činidla (součást DIG Nucleic Acid Detection Kit) a rozpuštěno v 50 ml MAB pufru. Sterilizace takto připraveného pufru proběhla v autoklávu při 121 °C.

Blokovací roztok (200 ml)

Blokovací roztok byl přichystán naředěním blokovacího pufru s MAB pufrům v poměru 1:10. Pro zajištění čerstvosti byl tento roztok připravován teprve v den použití.

Roztok chromogenního substrátu BCIP/NBT (2 ml)

Roztok chromogenního substrátu vznikl rozpuštěním 40 µl BCIP/NBT zásobního roztoku (součást DIG Nucleic Acid Detection Kit) ve 2 ml detekčního pufru. Příprava tohoto roztoku byla provedena těsně před jeho použitím.

Roztok chromogenního substrátu Fast Red (10ml)

Ve zkumavce zakryté alobalem byla v 10 ml DEPC vody postupně rozpuštěna tableta s Tris-pufrům a tableta Fast Red a výsledný roztok byl přefiltrován přes stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,22 µm. Příprava tohoto roztoku byla provedena těsně před jeho použitím.

4.1.4 Biologický materiál

Jako biologický materiál byli pro účely této práce použiti dospělci vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*) z citlivého kmene ISE (Inbred susceptible-Edinburgh). Zdravá mláďata ovce domácí o stáří 3-4 měsíců byla orálně infikována suspenzí s cca 5 000 infekčními larvami L3. V době nejvýraznějších příznaků infekce, zhruba po 50 dnech, byla zvířata poražena v souladu se zákonem č.246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání. Ze získaného ovčího slezu byli dospělci izolováni pomocí agarové metody a následně promyti fyziologickým roztokem. Na základě morfologických charakteristik byli červi rozříděni dle pohlaví a pro izolaci RNA uloženi při -80 °C v TRIzol Reagentu. Pro přípravu histologických řezů byli 30 minut fixováni v Bouinově roztoku a následně ihned zaléváni do parafínu (provedla paní Lukešová).

4.2 Metodika

4.2.1 Izolace RNA

Ribonukleová kyselina (RNA) byla izolována z dospělých jedinců vlasovky slezové uložených při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 1 ml TRIzol Reagentu. TRIzol Reagent je komerčně dostupná směs fenolu, guanidin isothiokyanátu a červeného barviva, která zajišťuje solubilizaci biologického materiálu a denaturaci proteinů během homogenizace vzorku. Zároveň však inhibuje aktivitu ribonukleáz (RNáz), čímž zachovává integritu izolované RNA.

Veškerá práce se vzorky byla následně provedena v laminárním boxu, jehož pracovní deska byla dekontaminována přípravkem RNaseZAP. K manipulaci se vzorky byly použity sterilní zkumavky a čisté rukavice, jejichž použití dále eliminovalo možnost degradace vzorku ubikvitně se vyskytujícími RNázami.

Vzorky vyjmuté z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se nechaly při laboratorní teplotě rozmrazit. Následně byly dávkovačem přidány kovové kuličky různé velikosti a vzorky přemístěny do kuličkového homogenizátoru, kde došlo k vytvoření stejnorodé směsi. Po 5 minutách odstání při laboratorní teplotě bylo ke směsi přidáno 200 μl chloroformu. Vzorky byly protřepány a dále centrifugovány po dobu 15 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 12 000g. Odstředěním došlo k vytvoření tří vrstev: horní vodné fáze obsahující RNA, mezifáze a růžově zbarvené organické fáze s proteiny a DNA.

Vodná fáze byla opatrně přenesena do sterilní 1,5 ml zkumavky, do níž bylo přidáno 500 μl isopropanolu. Po 10 minutách inkubace při laboratorní teplotě byly vzorky opět centrifugovány při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 12 000g po dobu 10 minut. Následně byl odstraněn supernatant a vzniklá peleta RNA byla omyta čerstvě naředěným 75 % ethanolem. Vzorky byly pečlivě promíchány a centrifugovány při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 7 500g po dobu 5 minut. Supernatant byl opět odstraněn a peleta RNA usušena na vzduchu zhruba 10 minut, dokud nezačala zprůhledňovat. Nakonec bylo do zkumavek přidáno 20 – 100 μl vody ošetřené diethyl pyrokarbonátem (DEPC), dle velikosti pelety.

Po promíchání a úplném rozpuštění pelety byla spektrofotometricky stanovena koncentrace RNA přístrojem Tecan Spark. Stanovení probíhá při vlnové délce 260 nm, při které dochází k absorpci UV záření heterocyklickou strukturou pyrimidinových a purinových bází. K posouzení kvality izolace nukleové kyseliny a jejího znečištění proteiny či fenolem jsou využívány poměry A260/A280 a A260/A230. Izolace nukleové kyseliny je úspěšná, jsou-li tyto poměry větší než 1,8. Takto připravené vzorky RNA byly do doby dalšího zpracování uchovávány při teplotě -80°C .

4.2.2 DNase treatment

Pojmem DNase treatment označujeme proces, při němž jsou vzorky izolované RNA očištěny od zbytků genomové DNA pomocí enzymu DNázy I. Jedná se o DNA selektivní endonukleázu, která odbourává jedno- i dvouřetězcové struktury DNA na krátké oligonukleotidy.

Celý následující postup byl prováděn v laminárním boxu určeném pro práci s RNA. Do čistých 1,5 ml zkumavek byly nejprve naředěny vzorky RNA pomocí DEPC vody tak, aby byla jejich výsledná koncentrace 5 µg a objem 26 µl. K takto připraveným vzorkům byla pipetována směs enzymu a pufru do celkového objemu 30 µl. Po důkladném promíchání a krátkém stočení byly vzorky inkubovány při 37 °C a otáčkách 500 rpm po dobu 25 minut. Za účelem inhibice enzymu byl dále přidán 1,5 µl 0,1M EDTA a vzorky inkubovány při 75 °C 10 minut. Po skončení inkubace a krátkém umístění na led bylo ke vzorkům přidáno 18,5 µl DEPC vody.

Tab. 1: Složení reakční směsi pro DNase treatment

10x reakční pufr	3 µl
DNáza	1 µl
Templát (izolovaná RNA)	5 µg
DEPC voda	X µl (doplněno do celkového objemu)
Celkový objem	30 µl

4.2.3 Reverzní transkripce

Proces reverzní transkripce zajišťuje převod molekul RNA do podoby cDNA (complementary DNA) pomocí enzymu reverzní transkriptázy. Tento enzym prodlužuje úseky primerů přidaných do reakce, čímž zajišťuje vznik jednořetězcového vlákna DNA komplementárního k sekvenci templátové RNA. Jako primery zde byly použity náhodné hexamery – oligonukleotidy o délce šesti nukleotidů o náhodné sekvenci. Reverzní transkripce je pro další práci nezbytným krokem, a to z důvodu strukturní nestability RNA a její náchylnosti k degradaci ubikvitinými RNázami.

V laminárním boxu byly připraveny dvě sady vzorků, z nichž k jedné z nich nebyla přidána reverzní transkriptáza. Tato sada sloužila jako tzv. noRT kontrola pro zjištění kontaminace vzorků genomovou DNA. Do čistých zkumavek byla napipetována RNA zředěná na koncentraci 1000 ng a hexamery. Takto připravená směs byla přemístěna do PCR cykleru nastaveného na teplotu 65°C. Po uplynutí 5 minut byly vzorky z cykleru vyjmuty a přemístěny do chladicího stojánku, kde bylo ke každému vzorku přidáno 14 µl mastermixu (složení v Tab. 2). Poté byly navraceny zpět do PCR cykleru, kde došlo nejprve k jejich zahřátí na 10 minut při 25 °C a poté byla při 42 °C po dobu 50 minut syntetizována cDNA. Poslední fází pak byla denaturace enzymu, která probíhala 5 minut při 80 °C. Takto upravené vzorky byly naředěny redestilovanou vodou na 100 µl a uchovávány při -20 °C.

Tab. 2: Složení mastermixu pro reverzní transkripci jednoho vzorku

RT směs	noRT směs
4 µl pufr 5x	4 µl pufr 5x
2 µl dithiothreitol	2 µl dithiothreitol
2 µl dNTPs	2 µl dNTPs
0,5 µl reverzní transkriptáza	-
5,5 µl DEPC voda	6 µl DEPC voda
Celkový objem	14 µl

4.2.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro přípravu sond, pomocí nichž bude provedena vlastní detekce P-glykoproteinu-9.2, byly vybrány tři úseky příslušného genu Hco-Pgp-9.2. Sekvence tohoto genu s barevně vyznačenými oblastmi amplifikace je umístěna v příloze 12.1. Tyto úseky byly vyselektovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) za použití specifických primerů navržených doc. Ing. Petrou Matouškovou, PhD. Sekvence primerů uvádí Tab. 3.

Nejprve byl dle Tab. 4 připraven mastermix (vyjma primerů) v 3,5 násobném množství, který byl po 48 µl rozpipetován do 0,2 ml zkumavek. Do každé zkumavky byl následně přidán jeden pár primerů specifických pro přípravu sondy č.1, č.2 a č.3. Takto připravené vzorky byly promíchány na vortexu, krátce stočeny na stolní centrifuze

a umístěny do PCR cyklieru k započetí amplifikace. Teplotní podmínky a délku jednotlivých fází PCR reakce znázorňuje Tab.5.

Tab. 3: Sekvence primerů pro přípravu inzertů reprezentujících hybridizační sondy

	Forward Primer	Reverse Primer	Velikost amplikonu
Inzert č.1	CAACGATTCAGGCGACATGT	AGCCAATACCAACATACAAGGA	510 nt
Inzert č. 2	AGGATCTGGAGCGACTGAAA	GTCGAAGTAGGTGGCATCCA	383 nt
Inzert č. 3	ACACAAAACCAACAGACGGA	CAGAGCCGTCCAAAGCATC	497 nt

Tab. 4: Složení reakční směsi pro PCR

5x Q5 reakční pufr	10 µl
10 mM dNTPs	2 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Q5 DNA Polymeráza	0,5 µl
Templát (cDNA)	2 µl
voda	33,5 µl
Celkový objem	50 µl

Tab. 5: Reakční podmínky PCR

	teplota	čas	
Počáteční denaturace	98 °C	30 s	
Denaturace	94 °C	20 s	30 x
Annealing	55 °C	20 s	
Elongace	68 °C	1 min	
Finální elongace	68 °C	5 min	

4.2.5 Agarosová elektroforéza

Pro detekci PCR produktů by použita agarosová elektroforéza, jejíž princip spočívá v rozdílné pohyblivosti fragmentů nukleových kyselin v závislosti na jejich délce a prostorové konformaci. Kratší fragmenty putují k anodě rychleji, zatímco pohyb delších fragmentů je výrazněji brzděn strukturou agarosového gelu. K odhadnutí velikosti fragmentů slouží velikostní marker tzv. *DNA ladder*, jenž je na gel nanášen spolu se vzorky a obsahuje směs fragmentů známé délky.

K samotné elektroforéze byl použit 1% agarosový gel, který byl připraven z 0,4 g agarosu a 40 ml 1x TAE pufru. Takto připravená směs byla zahřáta v mikrovlnné troubě do stavu úplného rozpuštění agarosu. Následně byla nalitá do elektroforetické vany s hřebínkem, jenž byl po ztuhnutí gelu vytažen. Gel byl ponořen do 1xTAE pufru a do první jamky byly nanесeny 3 μ l velikostního markeru. Ze zkumavky s PCR produkty bylo odebráno 5 μ l, smícháno na parafilmu s 1,5 μ l nanášecí barvy a aplikováno do jamky agarosového gelu. Elektroforéza probíhala při 100 V po dobu 20 minut a výstup byl zviditelněn v přístroji Uvitec.

4.2.6 Přečištění PCR produktu a stanovení jeho koncentrace

Pro odstranění zbytků nukleotidů, primerů a dalších složek polymerázové reakce byl zbytek vzorku následně přečištěn pomocí kitu NucleoSpin® Gel and Clean-up dle přiloženého návodu (viz příloha 12.2). Poté byla změřena koncentrace přečištěného vzorku přístrojem Tecan Spark.

4.2.7 Klonování

Po elektroforetické detekci a přečištění PCR produktů bylo přistoupeno k vlastnímu klonování. Účelem tohoto procesu bylo získání dostatečného množství cDNA nezbytného k syntéze RNA sond. Použity zde byly vektory typu p-GEM®-T Easy a kompetentní buňky JM109.

4.2.7.1 A-tailing

Pojmem A-tailing rozumíme enzymaticky katalyzované vnesení nukleotidu dATP na 3' konce PCR produktů s tupými konci. Využívá se zde schopnosti *Taq* DNA polymerázy nespécificky připojit na 3' konec jeden adenosin. Použitý vektor p-GEM®-T Easy

je linearizovaný a své 3' konce má modifikované thymidiny, což zvyšuje účinnost samotné ligace při inserci PCR produktu a zamezuje samovolné recirkulizaci vektoru.

Do třech čistých 0,2 ml zkumavek byla připravena reakční směs dle Tab. 6 o celkovém objemu 10 μ l. Do každé této zkumavky byl přitom přidán jeden ze tří PCR produktů reprezentující hybridizační sondy 1,2 a 3. Takto nachystané vzorky byly inkubovány po dobu 30 minut při 70 °C.

Tab. 6: Složení reakční směsi pro A-tailing

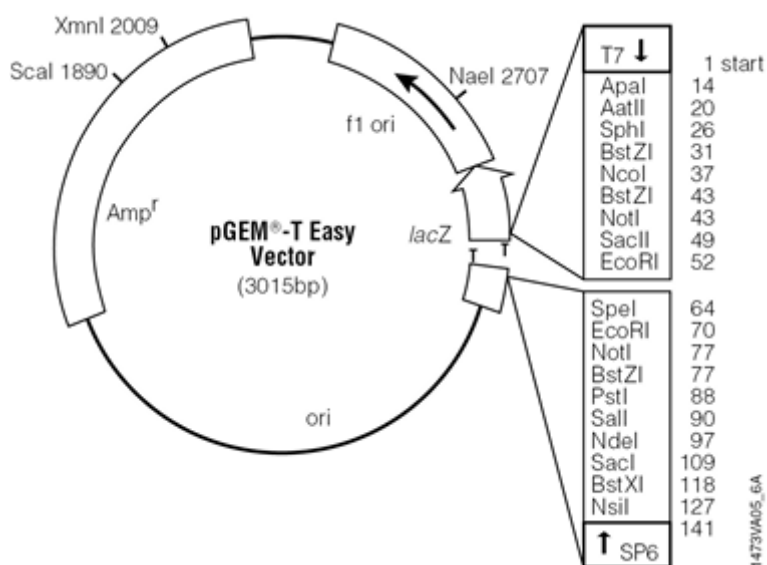
PCR produkt	2 μ l
10x <i>Taq</i> reakční pufr	1 μ l
2 mM dATP	1 μ l
<i>Taq</i> DNA polymeráza	1 μ l
Deionizovaná voda	5 μ l
Celkový objem	10 μl

4.2.7.2 Ligace do vektoru p-GEM[®]-T Easy

V tomto kroku byl insert, v našem případě PCR produkt s připojeným adenosinem na 3' konci vnesen do vektoru p-GEM[®]-T Easy a pevně připojen enzymem T4 DNA Ligázou. Vlastní inserce PCR produktu přitom proběhla do tzv. mnohočetného klonovacího místa (z angl. *multiple cloning site*, MCS), které leží v oblasti reportérového genu lacZ kódujícího enzym β -galaktosidázu. Oblast MCS, jež nese celou řadu restrikčních míst, je dále lemována promotory pro enzymy T7 a SP6 RNA polymerázu. Použitý vektor p-GEM[®]-T Easy o celkové velikosti 3015 bp nesou také selekční gen Amp^r, který poskytuje transformovaným buňkám schopnost rezistence vůči ampicilinu.

Pro úspěšný průběh ligační reakce bylo nezbytné stanovit množství vkládaného inzeru tak, aby byl poměr množství inzeru ku vektoru 3:1. Výpočet byl proveden dle níže uvedené rovnice.

$$\text{Množství inzeru (ng)} = \text{Množství vektoru (ng)} \times \text{velikost inzeru (kb)} / \text{Velikost vektoru (kb)} \times 3$$



Obr. 7: Struktura pGEM®-T Easy Vector

(Promega [online])

Před sestavením vlastní reakce byly zkumavky s vektorem a pufrům řádně promíchány a krátce stočeny. Poté byla do tří 0,2 ml zkumavek připravena ligační směs, jejíž složení popisuje Tab. 7. Do každé zkumavky byl přitom přidán jeden ze tří PCR produktů s modifikovanými 3' konci. Reakční směs byla poté promíchána pipetou a inkubována po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě.

Tab. 7: Složení reakční směsi pro ligační reakci

2x reakční pufr	2,5 μ l
pGEM®-T Easy vektor (50 ng)	0,5 μ l
PCR produkt	1 μ l
T4 DNA Ligáza	0,5 μ l
voda	0,5 μ l
Celkový objem	20 μl

4.2.7.3 Transformace kompetentních buněk JM109

Pro transformaci byly vybrány kompetentní buňky *E.coli* typu JM109, které zajišťují vysokou stabilitu inzertu díky deficienci endonukleáz. Vlastní transformace byla provedena teplotním šokem při 42 °C, při níž se stala cytoplazmatická membrána buněk prostupnou a vektor mohl proniknout do buněk.

Celý proces transformace byl prováděn v laboratoři vyčleněné pro práci s GMO a za sterilních podmínek při zapáleném kahanu. Buňky JM109, skladované při teplotě -80 °C, byly umístěny na led, dokud neroztály. Mezitím byly na led nachystány tři 1,5 ml sterilní zkumavky pro oddělenou transformaci buněk vektory s třemi odlišnými inzerty. Do každé z těchto zkumavek byly napipetovány 2 µl jedné ligační směsi a 50 µl buněčné suspenze. Pipetování buněk bylo prováděno velmi opatrně z důvodu jejich vysoké křehkosti. Po jemném promíchání transformační reakce pipetou byly zkumavky ponechány 20 minut na ledě. Teplotní šok byl následně proveden ponořením zkumavek na 45-50 sekund do vodní lázně o teplotě 42 °C a jejich okamžitým navrácením na led. Po 2 minutách bylo k obsahu každé zkumavky přidáno 600 µl S.O.C. média a tato finální směs byla inkubována při 37 °C 1,5 hodiny s třepáním 200 rpm. Pro každou transformační kulturu byly nachystány dvě předeřáté plotny s LB agarem. Na každou plotnu bylo nanášeno a důkladně rozetřeno 100 µl transformační směsi a takto zaočkované plotny byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C.

Kolonie, které byly na plotnách pozorovatelné následující den, byly tvořeny pouze úspěšně transformovanými buňkami obsahujícími vektor s genem rezistence k ampicilinu. Rozlišení buněk mající vektor s insertovaným fragmentem bylo dále umožněno tzv. modro-bílou selekcí.

4.2.8 Colony PCR

K předběžnému průkazu (screeningu) přítomnosti vektoru s insertem byla použita modifikace polymerázové řetězové reakci, tzv. *colony* PCR, při níž není templátem izolovaná DNA, ale fragment kolonie.

V GMO laboratoři při zažehnutém kahanu bylo na plotnách očíslováno 5 bílých kolonií z každé transformační reakce. Do sterilních zkumavek obsahujících 10 µl vody byl pipetovací špičkou přidán fragment příslušné kolonie a vzorky byly na 10 minut přemístěny do cyklu, kde byly zahřáty na 95 °C. Mezitím byl dle Tab. 8 připraven mastermix vyjma primerů, které byly do každé reakce přidány zvlášť. Do zkumavek se zahřátým templátem bylo přidáno 9 µl mastermixu a příslušné primery v uvedeném množství. Poté byly vzorky

navráceny do cyklu započítí amplifikační reakce. Přítomnost produktů byla ověřena agarosovou elektroforézou, jejíž přípravu a postup uvádí kapitola 4.2.5.

Kolonie, u nichž se přítomnost vektoru s insertem předběžně prokázala, byly přeočkovány do kultivačních zkumavek s 3 ml sterilního LB média s ampicilinem (příprava viz. kapitola 4.1.3) a kultivovány přes noc při teplotě 37 °C a 200 rpm.

Tab. 8: Složení reakční směsi pro *Colony* PCR

Templát	10 µl
10x <i>Taq</i> reakční pufr	4 µl
10 mM dNTPs	0,5 µl
Forward + Reverse primer	0,5 µl + 0,5 µl
<i>Taq</i> DNA Polymeráza	0,1 µl
voda	4,4 µl
Celkový objem	20 µl

Tab. 9: Reakční podmínky *Colony* PCR

	Teplota	Čas	
Iničiační denaturace	94 °C	30 s	
Denaturace	94 °C	15 s	30x
Annealing	55 °C	30 s	
Elongace	68 °C	25 s	
Finální elongace	68 °C	5 min	

4.2.9 Izolace plazmidové DNA a *Quick-Load* PCR

Druhý den po zaočkování LB média buňkami JM109 z pozitivních kolonií byla provedena izolace plazmidové DNA pomocí komerčně dostupného kitu NucleoSpin Plasmid. Vlastní postup izolace je uveden v příloze 12.3.

Výsledky screeningu byly ověřeny reakcí *Quick-Load* PCR, při níž byla použita DNA polymeráza v tzv. *Quick-Load* pufru zelené barvy, která se při elektroforéze nemusí míchat s nanášecím pufrem. Pro odpovídající počet vzorků byl nejprve připraven mastermix dle Tab.10, který byl po 19,5 μ l rozpipetován do čistých 0,2 ml zkumavek. V mastermixu byly přitom použity komerční primery M13, jejichž vazebné místo leží v sekvenci vektoru mimo oblast MCS. Následně bylo do reakce přidáno 0,5 μ l příslušné plazmidové DNA jako templát. Po promíchání a krátkém stočení byly zkumavky přeneseny do PCR cykleru. Detekce produktů byla provedena agarosovou elektroforézou dle kapitoly 4.2.5., modifikovanou přidavkem barviva SYBR safe (0,4 μ l) pro následnou vizualizaci fragmentů.

Tab. 10: Složení reakční směsi pro *Quick-Load* PCR pro jeden vzorek

5x <i>Quick-Load</i> pufr	4 μ l
10 mM dNTPs	0,5 μ l
Forward + Reverse M13 primer	1 μ l
<i>OneTaq Quick-Load</i> DNA polymeráza	0,1 μ l
templát	0,5 μ l
voda	13,9 μ l
Celkový objem	20 μl

Tab. 11: Reakční podmínky *Quick-Load* PCR

	Teplota	Čas	
Iničiační denaturace	94 °C	30 s	
Denaturace	94 °C	15 s	30 x
Annealing	55 °C	20 s	
Elongace	68 °C	1 min	
Finální elongace	68 °C	5 min	

4.2.10 Sekvence plazmidové DNA

Přítomnost kýžených inzertů v plazmidové DNA byla definitivně potvrzena v Eurofins Genomics pomocí Sangerova sekvenování. Jednotlivé vzorky plazmidové DNA byly připraveny do 1,5 ml zkumavek označených čárovými kódy. Do každé zkumavky bylo napipetováno 5 μ l primeru, 3 μ l plazmidové DNA (při koncentraci 200 až 300 ng/ μ l) a 2 μ l ddH₂O. Jako sekvenační primer byl použit reverzní M13 primer, jehož vazebné místo v plazmidu p-GEM[®]-T Easy leží před oblastí MCS, konkrétně v rozmezí 176.-197. nukleotidu.

Dle výsledků sekvenace bylo také možné určit, v jakém směru byly inserty do vektorů zaligovány. Tato informace je nezbytná pro výběr restriční endonukleázy a RNA polymerázy pro pozdější linearizaci plazmidu a tvorbu hybridizačních RNA sond.

4.2.11 Masivní namnožení plazmidu v kompetentních buňkách a jeho izolace

Plazmidy se sekvenačně potvrzenou přítomností inzertu byly namnoženy za účelem získání dostatečného množství plazmidové DNA, které je nezbytné k úspěšné syntéze RNA sond.

Úvodním krokem tohoto procesu byla transformace kompetentních buněk JM109 plazmidy, jejichž izolace je popsána v kapitole 4.2.9. Vlastní proces transformace a kultivace buněk v S.O.C. médiu pak proběhl za podmínek uvedených v kapitole 4.2.7.3. K pomnožení transformovaných buněk byly přichystány tři Erlenmeyerovy baňky s 50 ml LB média s obsahem ampicilinu. Do každé baňky bylo přidáno 20 μ l transformační kultury a směs inkubována přes noc při teplotě 37 °C s třepáním 200 rpm.

Druhý den byly kultury transformovaných buněk přelity z Erlenmeyerových baněk do centrifugačních zkumavek a stočeny po dobu 5 minut při 2000g. Po odstranění supernatantu byla započata izolace plazmidové DNA pomocí komerčně dostupného kitu ZymoPURE Plasmid MidiPrep Kit. Postup izolace je uveden v příloze 12.4. Výsledkem tohoto kroku byly tři vzorky plazmidové DNA s obsahem odlišných inzertů, z nichž budou hybridizační RNA sondy transkribovány.

4.2.12 Linearizace plazmidové DNA

Aby mohly být plazmidové inzerty převedeny do podoby RNA sond, bylo nutné plazmidy enzymaticky linearizovat. K tomuto účelu byla vybrána taková restriční endonukleáza, jejíž restriční místo leží v oblasti MCS a zároveň neštěpí žádný z našich inzertů. Jako vhodný enzym tak byla vybrána endonukleáza NcoI.

Před samotnou linearizací byla změřena koncentrace plazmidové DNA pomocí přístroje Tecan Spark. Z důvodu nízké koncentrace vzorku s insertem č.1 bylo dále pracováno pouze s plazmidy obsahující inserty 2 a 3.

Do dvou 1,5 ml sterilních zkumavek byla připravena reakční směs dle Tab. 12, přičemž restriční endonukleáza byla přidána až jako poslední. Obsah směsi byl jemně promíchán pipetou a krátce stočen ve stolní centrifuze. Poté byly vzorky inkubovány 3 hodiny při teplotě 37 °C s třepáním 500 rpm. Inaktivace enzymu dále proběhla při 80 °C po dobu 20 minut. Produkty linearizace byly detekovány pomocí agarosové elektroforézy (viz. kapitola 4.2.5), kde byly porovnány s plazmidy v cirkulární podobě.

Tab. 12: Složení reakční směsi pro linearizaci plazmidu

	Plazmid s insertem 2	Plazmid s insertem 3
Restriční endonukleáza NcoI	6 µl	6 µl
10x NEB pufr	5 µl	5 µl
Plazmidová DNA (6 µg)	14,4 µl	25,2 µl
voda	24,6 µl	13,8 µl
Celkový objem	50 µl	

4.2.13 Ethanolová precipitace

Precipitace vzorků ethanolem byla provedena za účelem jejich přečištění a zakoncentrování. Nejprve byl do obou zkumavek s linearizovanými plazmidy přidán 1 µl glykogenu pro zviditelnění DNA pelety. Vzorky byly dále smíchány v poměru 10:1 s 3M octanem sodným o pH 5,2. Ve 2,5 násobném množství byl k této směsi přidán 100% ethanol vychlazený na teplotu -20 °C. Po důkladném promíchání byly vzorky umístěny

na 30 minut do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následovalo stočení vzorků při $16\ 000\ \text{x}\ \text{g}$ po dobu 10 minut v centrifuze vychlazené na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po odstranění supernatantu bylo do zkumavek přidáno $20\ \mu\text{l}$ 80% ethanolu, směs promíchána a znovu centrifugována. Po opětovném odstranění supernatantu byla peleta linearizované plazmidové DNA 5 minut sušena při laboratorní teplotě a finálně rozpuštěna ve sterilní ddH_2O .

4.2.14 Tvorba RNA sond značených digoxigeninem

Po linearizaci a přečištění plazmidové DNA mohlo být přistoupeno k vlastní tvorbě hybridizačních sond. K tomuto procesu byl využit komerčně dostupný DIG RNA Labelling Kit, jenž obsahoval SP6 a T7 RNA polymerázu a směs nukleotidů s UTP značeným digoxigeninem (DIG). SP6 i T7 RNA polymerázy jsou DNA-dependentní enzymy, které katalyzují syntézu RNA řetězce ve směru $5'\rightarrow 3'$ bez přítomnosti primerů. Jejich promotorové oblasti jsou lokalizovány kolem MCS oblasti v pGEM[®]-T Easy vektoru, čímž je umožněn obousměrný přepis inzertu do RNA. Hybridizační sondy bylo nutné připravit ve směru *anti-sense* tak, aby byly po aplikaci na cílové místo schopné hybridizovat se *sense* mRNA. Na základě orientace insertů ve vektorech byla pro naše potřeby zvolena SP6 RNA polymeráza. Množství značených RNA sond vytvořených během *in vitro* transkripce závisí zejména na množství templátové DNA vložené do reakce. Za standardních podmínek vzniká z $1\ \mu\text{g}$ templátu přibližně $10\ \mu\text{g}$ RNA značené digoxigeninem.

Proces přípravy vzorků pro tvorbu hybridizačních sond byl prováděn v laminárním boxu určeném pro práci s RNA. Před přípravou reakční směsi bylo nejprve potřeba vypočítat objem vnášené plazmidové DNA tak, aby bylo její počáteční množství v každé zkumavce $1\ \mu\text{g}$. K patričnému objemu templátu byla přidána DEPC voda a poté byly zkumavky umístěny na led. Zbytek reakční směsi byl přidán dle Tab.13. Po jemném promíchání a stočení byly vzorky inkubovány 2 hodiny při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ v cykleru. Pro odstranění DNA templátu byly do každé zkumavky přidány $2\ \mu\text{l}$ DNázy I a obsah inkubován 15 minut při 37°C . Reakce byla zastavena přidáním $2\ \mu\text{l}$ $0,2\ \text{M}$ EDTA o pH 8. Koncentrace RNA sond byla stanovena přístrojem Tecan Spark. Připravené hybridizační sondy byly skladovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tab. 13: Složení reakční směsi pro *in vitro* transkripci RNA sond

	Sonda 2	Sonda 3
Plazmidová DNA	5,8 μ l	4,3 μ l
DEPC-H2O	7,2 μ l	8,7 μ l
10x NTP značící směs	2 μ l	
10x transkripční pufr	2 μ l	
Inhibitor RNáz	1 μ l	
RNA Polymeráza SP6	2 μ l	
Celkový objem	20 μl	

4.2.15 Příprava histologických řezů

Histologické řezy vlasovky slezové byly připraveny na katedře biologických a lékařských věd paní laborantkou P. Lukešovou. Stručný postup práce je uveden níže.

K fixaci dospělců vlasovky slezové byl použit Bouinův roztok, jenž obsahuje formaldehyd, kyselinu pikrovou a kyselinu octovou. Po fixaci trvající 30 minut byly vzorky na hodinu ponořeny do 80% ethanolu a následně odvodněny ve třech lázních acetonu během 24 hodin. Poté byly ošetřeny xylenem, a to ve dvou lázních po dobu 10 minut, který zajistil projasnění tkáně. Vzorky byly dále přemístěny do termostatu, kde byly 2 hodiny inkubovány při teplotě 56 °C ve dvou lázních parafinu a nakonec zality do parafinového bločku.

Z parafinových bločků byly pomocí mikrotomu vytvořeny řezy o tloušťce 7 nm. Ty byly napnuty položením na vodní hladinu a následně umístěny na podložní sklíčka. Takto připravené řezy byly skladovány při teplotě 4 °C.

4.2.16 RNA *in situ* hybridizace

Připravené RNA sondy a histologické řezy vlasovky slezové byly finálně použity k detekci mRNA P-glykoproteinu-9.2 pomocí techniky RNA *in situ* hybridizace. Průběh této techniky můžeme rozdělit tři klíčových kroků:

- a) deparafinace histologických řezů a nanesení hybridizačních sond
- b) stringentní promývání a aplikace anti-DIG protilátek konjugovaných s alkalickou fosfatázou
- c) nanesení chromogenního substrátu, jenž umožní kolorimetrickou detekci hybridizované sondy

Ke kolorimetrické detekci byly použity dva typy chromogenních substrátů - FastRed TR/Naphtol AS-MX, jenž poskytuje červený precipitát, a BCIP/NBT, který byl součástí kitu DIG Nucleic Acid Detection Kit a vytváří precipitát tmavě modrý. Oba tyto substráty vyžadovaly přípravu odlišných pufovacích roztoků a částečnou modifikaci pracovního postupu. Postup deparafinace histologických řezů a nanesení hybridizačních sond byl proveden pro oba substráty shodným způsobem, stejně jako proces stringentního promývání. Následující kroky však nesly značné odlišnosti, a proto jsou pro každý substrát popsány odděleně. Celý experiment RNA *in situ* hybridizace při použití substrátu FastRed TR/Naphtol trval 3 dny, neboť zahrnoval dvě celonoční inkubace. Využití DIG Nucleic Acid Detection Kitu a substrátu BCIP/NBT tuto dobu značně zkrátilo, a to na pouhý jeden den.

4.2.16.1 Deparafinace histologických řezů a nanesení hybridizačních sond

Procesy deparafinace i další opracování histologických řezů bylo provedeno ve sterilních skleněných vanách, které byly naplněny cca 200 ml příslušných roztoků. Mikroskopická sklička byla do těchto roztoků vždy zcela ponořena a ponechána k inkubaci. Přesné pořadí roztoků a časy inkubace uvádí Tab. 14. Před započítáním celého procesu byla sklička označena číslem sondy (2 nebo 3), která bude při hybridizaci použita.

Nejprve byla provedena deparafinace histologických řezů pomocí xylenu a roztoků ethanolové řady o sestupné koncentraci. Následně byly řezy zavodněny pomocí DEPC-H₂O a dále inkubovány v 0,2M roztoku kyseliny chlorovodíkové. Mikroskopická sklička byla dále přesunuta nejprve do PK pufru předehřátého na 37 °C, k němuž byla posléze přidána

Proteináza K (16 μ l/100ml). Po inkubaci sklíček v roztoku 0,2% glycinu byl proveden krátký oplach v ledové 20% kyselině octové umístěné v digestoři. Poté navazovala inkubace sklíček v roztoku 20% glycerolu a jejich šetrné omytí v roztoku 2x SSC.

Mezitím byly připraveny dva hybridizační mixy, jejichž složení popisují Tab. 15 a 16. Z takto připravených mixů byly dle Tab. 17 namíchány dvě hybridizační směsi, každá s obsahem jiné RNA sondy (sondy 2 nebo sondy 3). Objemy jednotlivých složek hybridizační směsi uvedené v Tab 17. však bylo potřeba vynásobit počtem sklíček tak, aby bylo možné na každé sklíčko aplikovat objem 200 μ l. Hybridizační směs byla namíchána těsně před aplikací na sklíčka. Do té doby byl hybridizační MIX 1 uchováván v termostatu při teplotě 70 °C a MIX 2 při teplotě laboratorní.

Sklička omytá v roztoku 2x SSC byla položena na přehřátou skleněnou desku, na níž byla na dobu 10-12 minut přemístěna do teploty 70 °C. Po vyjmutí z termostatu byla sklíčka krátce ochlazená položením na ledovou desku vymraženou na -80 °C a poté umístěna na pracovní plochu. Na každé sklíčko bylo aplikováno 200 μ l čerstvě připravené hybridizační směsi s příslušnou sondou. Takto připravené řezy byly překryty krycím sklíčkem a přemístěny do vlhké komůrky, kde byly inkubovány při teplotě 60 °C. Sklička určená k detekci pomocí substrátu Fast Red byla inkubována přes noc po dobu cca 18 hodin, zatímco sklíčka pro detekci substrátem BCIP/NBT byla inkubována pouze 2,5 hodiny. Do procesu RNA *in situ* hybridizace byly začleněny také preparáty kontrolní, které byly inkubovány s hybridizační směsí bez obsahu hybridizačních sond.

Tab. 14: Postup opracování histologických řezů před nanesením hybridizačních sond

Typ roztoku	Doba inkubace
Xylen	15 min
Xylen	15 min
100 % Ethanol	15 min
100 % Ethanol	15 min
96% Ethanol	5 min
70% Ethanol	5 min
50% Ethanol	5 min
30% Ethanol	5 min
DEPC-H ₂ O	5 min
0,2M HCl	20 min
PK pufr (37 °C)	5 min
Proteináza K (37 °C)	17 min
0,2% glycin	5 min
20% kyselina octová (vychlazená na ledu)	15 s
0,1M fosfátový pufr (PBS)	5 min
20% glycerol	15 min
2x SSC	5 s

Tab. 15: Složení hybridizačního mixu 1

Hybridizační MIX 1	
20x SSC	0,625 ml
Torula RNA	2,5 mg
0,1M fosfátový pufr	0,375 ml
Celkový objem	1 ml

Tab. 16: Složení hybridizačního mixu 2

Hybridizační MIX 2	
Deionizovaný formamid	1,25 ml
10% Tween 20	0,25 ml
dextran	0,25 g
Celkový objem	1,5 ml

Tab. 17: Složení hybridizační směsi

Hybridizační směs	
Hybridizační MIX 1	77 μ l
Hybridizační MIX 2	122,5 μ l
RNA sonda č. 2 nebo č. 3	0,5 μ l
Celkový objem	200 μl

4.2.16.2 Stringentní promývání

Cílem stringentních oplachů bylo odstranění nespecificky navázaných RNA sond, které by mohly následně sloužit jako zdroj falešně pozitivních signálů.

Po uplynutí doby hybridizace byla mikroskopická sklíčka vyjmuta z termostatu a pinzetou z nich byla šetrně odstraněna krycí sklíčka. Preparáty byly ponořeny do roztoku 2x SSC s obsahem Tweenu 20 a navraceny do termostatu, kde proběhla inkubace při 50 °C. Dále byly preparáty inkubovány při laboratorní teplotě ve třech dalších roztocích SSC o klesající koncentraci. Přesné časy inkubace a koncentrace roztoků jsou uvedeny v Tab. 18.

Tab. 18: Postup provedení stringentního promývání

Typ roztoku	Doba inkubace
2x SSC+ 0,1% Tween 20 (50 °C)	15 min
1x SSC	15 min
0,5x SSC	15 min
0,1x SSC	15 min

4.2.16.3 Aplikace anti-DIG protilátek a detekce substrátem Fast Red

Po provedení stringentních oplachů v roztocích SSC byla sklíčka inkubována 5 minut v MAB pufru. V mezičase byly připraveny dva blokovací pufrы, jejichž složení uvádí Tab. 19. Objemy jednotlivých složek byly přitom vynásobeny počtem analyzovaných sklíček tak, aby bylo možné na každé z nich aplikovat 200 μ l připraveného pufru. Anti-DIG protilátky byly přitom do 2% blokovacího pufru přidány těsně před jeho užitím. Sklíčka vyjmutá z MAB pufru byla přemístěna do vlhké komůrky, kde byla převrstvena 200 μ l 4% blokovacího pufru a inkubována 30 minut při laboratorní teplotě.

Poté byl pufr z preparátů odstraněn opatrným sklepnutím a sklíčka ponechána k vyschnutí. Suché preparáty byly pokryty 200 μ l 2% blokovacího pufru s obsahem anti-DIG protilátek a po uzavření krycími sklíčky navraceny do vlhké komůrky. Následně proběhla při 4 °C celonoční inkubace trvající cca 18 hodin.

Tab. 19: Složení blokovacích pufrů

	4% blokovací pufr	2% blokovací pufr
Koňské sérum	8 μ l	4 μ l
MAB pufr	192 μ l	195,6 μ l
Anti-DIG protilátky	-	0,4 μ l

Nadcházející den byla sejmuta krycí skla a preparáty inkubovány ve dvou MAB pufrech, v každém po dobu 20 minut. Poté byla sklíčka přemístěna na 5 minut do substrátového pufru. V mezičase byl připraven roztok s chromogenním substrátem Fast Red. Následně bylo aplikováno 200 μ l takto připraveného chromogenního substrátu na suché preparáty, které byly přemístěny do zatemněného prostoru. Vyvolávací reakce probíhala cca 15 minut. Preparáty byly následně šetrně omyty DEPC vodou a zafixovány montovacím médiem. Finální preparáty byly skladovány při teplotě 4 °C.

4.2.16.4 Aplikace anti-DIG protilátek a detekce substrátem BCIP/NBT

Proces aplikace anti-DIG protilátek a detekce chromogenním substrátem BCIP/NBT byla provedena dle instrukcí přiložených ke kitu DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche). Není-li uvedeno jinak, je příprava použitých roztoků a pufrů popsána v kapitole 4.1.3. Jejich pořadí při experimentu a časy inkubace zobrazuje Tab. 20.

Po inkubaci histologických řezů s hybridizačními sondami a stringentním promýváním (kapitola 4.2.16.1 a 4.2.16.2) byla sklíčka šetrně opláchnuta promývacím pufrem a inkubována v prostředí blokovacího pufru.

Mezitím byl připraven pracovní roztok s anti-DIG protilátkami, který vznikl naředěním protilátek blokovacím roztokem v poměru 1: 5 000. Vialka s anti-DIG protilátkami (součást DIG Nucleic Acid Detection Kit) byla před použitím centrifugována po dobu 5 minut při 10 000 rpm. Poté bylo do 5 ml sterilní zkumavky napipetováno 2,5 ml blokovacího roztoku, k němuž bylo přidáno 0,5 μ l stočené suspenze protilátek.

Po vypršení doby inkubace v blokovacím pufru byla sklíčka lehce osušena a připravena k aplikaci 200 μ l roztoku s anti-DIG protilátkami. Preparáty s naneseným roztokem protilátek byly překryty krycím sklíčkem a inkubovány 30 minut při laboratorní teplotě. Poté proběhlo opatrné sejmutí krycích sklíček a ošetření preparátů v promývacích roztocích, v každém po dobu 15 minut. Za účelem ekvilibrace preparátů před nanesením chromogenního substrátu byla sklíčka krátce ponořena do detekčního pufru. Poté bylo na každé sklíčko nanášeno 200 μ l roztoku chromogenního substrátu BCIP/NBT a preparáty přemístěny do zatemněného prostoru. Tvorba barevného precipitátu byla velmi rychlá, proto byla vyvolávací reakce po cca 20 minutách ukončena oplachem sklíček DEPC vodou. Vytvořené preparáty byly zafixovány montovacím médiem a uchovávány při teplotě 4 °C.

Tab. 20: Postup detekce substrátem BCIP/NBT

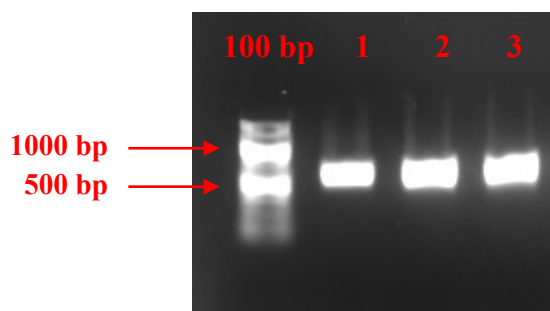
Typ roztoku	Doba inkubace
Promývací pufr	5 sec
Blokovací roztok	30 min
Roztok anti-DIG protilátek	30 min
Detekční pufr	2-5 min
Roztok chromogenního substrátu	15 min

5. VÝSLEDKY

5.1 Příprava hybridizačních RNA sond

5.1.1 Příprava inzertů

Prvotním krokem v přípravě hybridizačních sond byla polymerázová řetězová reakce, která umožnila z templátové cDNA vyselektovat a amplifikovat tři žádoucí úseky genu Hco-Pgp-9.2. Přítomnost těchto úseků, reprezentujících sondy č.1, 2 a 3, byla následně potvrzena agarosovou elektroforézou. K posouzení délky fragmentů byl použit 100 bp *DNA ladder*. Výstup agarosové elektroforézy dokumentuje Obr. 8.



Obr. 8: Detekce ampliconů pomocí agarosové elektroforézy

Do jamky vlevo je nanesen 100 bp *DNA ladder*, následují amplicony č. 1, 2 a 3.

Po přečištění PCR produktů pomocí komerčního kitu NucleoSpin Gel and PCR product Clean-up, byla stanovena jejich koncentrace přístrojem Tecan Spark (Tab. 21). Posouzení čistoty ampliconů bylo provedeno na základě poměru absorbancí A260/A280. Hodnoty poměrů větší než 1,8 naznačují vysoký stupeň čistoty.

Tab. 21: Koncentrace ampliconů PCR

	Koncentrace (ng/μl)	A260/280
Amplicon 1	142,31	1,91
Amplicon 2	77,47	1,90
Amplicon 3	93,05	1,98

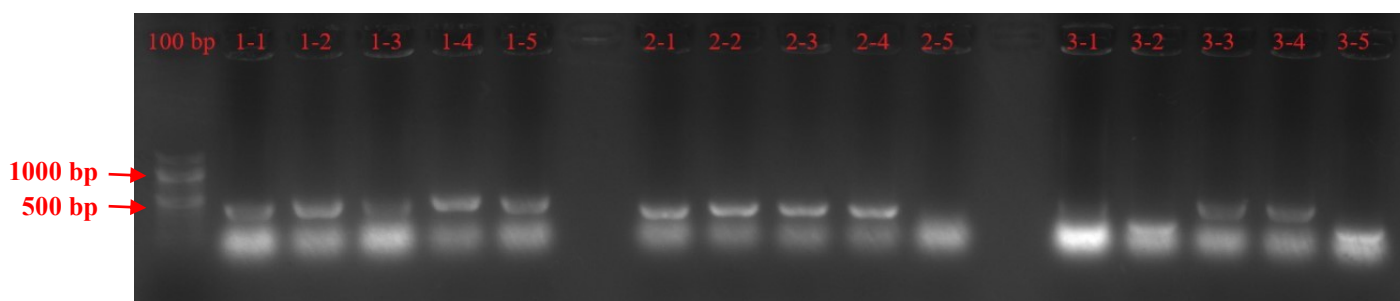
5.1.2 Ověření úspěšnosti klonování

Očištěné PCR produkty byly opatřeny adeninovými koncovkami, zaligovány do vektorů P-GEM-T Easy a vneseny do kompetentních buněk *E. Coli* typu JM109. Transformované buňky byly následně kultivovány na plotnách s živnou půdou s obsahem ampicilinu.

5.1.2.1 Colony PCR

Úspěšnost ligace a přítomnost insertu byla v narostlých koloniích ověřena pomocí screeningové metody *Colony PCR*. Z každé dvojice ploten bylo vybráno a očíslováno 5 kolonií bílé barvy, které byly do reakce vneseny jako templát. Detekce produktů byla provedena elektroforézou na 1% agarosovém gelu. Jako velikostní marker byl použit 100 bp *DNA ladder*.

Výstup elektroforézy znázorňuje Obr. 9. Zleva je nanesen *DNA ladder*, následují kolonie s insertem č. 1, 2 a 3. Přítomnost kýženého insertu byla pozitivně testována u všech kolonií kromě kolonií s označením 2-5, 3-1, 3-2 a 3-5. K následnému pomnožení v LB médiu byly vybrány dvě kolonie z každé skupiny, konkrétně kolonie s označením 1-2, 1-4, 2-2, 2-4, 3-3 a 3-4 a jako kontrola jedna modrá kolonie (K), která obsahuje vektor bez insertu.

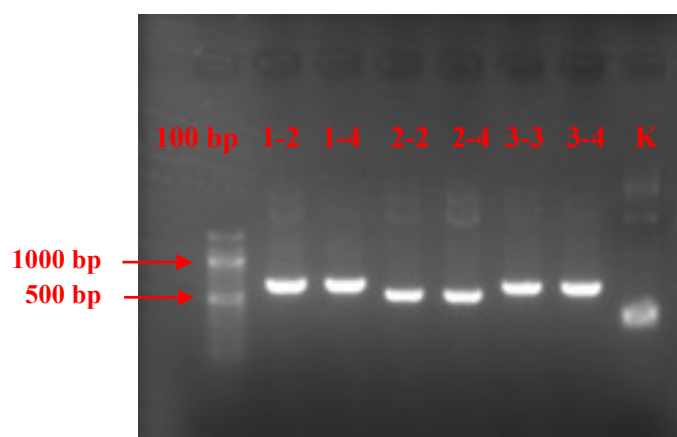


Obr. 9: Detekce produktů *Colony PCR* pomocí agarosové elektroforézy

5.1.2.2 Quick-Load PCR

Z bakteriálních kultur, jež vznikly pomnožením vybraných kolonií v LB médiu, byla vyizolována plasmidová DNA. Ta byla použita jako templát v reakci *Quick-Load PCR*, pomocí níž byly potvrzeny výsledky předešlého screeningu. K amplifikační reakci byly využity primery M13, jejichž vazebné místo leží v sekvenci vektoru mimo oblast MCS. Délka produktů byla porovnána s velikostním markerem 100 bp.

Detekce amplikonů byla provedena agarosovou elektroforézou (Obr.10) Zleva je nanesen *DNA ladder*, poté následují plazmidové DNA pocházející z kolonií 1-2, 1-4, 2-2, 2-4, 3-3, 3-4 a kontroly (K). Přítomnost žádoucích insertů byla potvrzena ve všech reakcích. Koncentrace plazmidové DNA ve vzorcích byla následně stanovena přístrojem Tecan Spark (Tab. 22).



Obr. 10: Elektroforetická detekce produktů reakce *Quick-Load* PCR

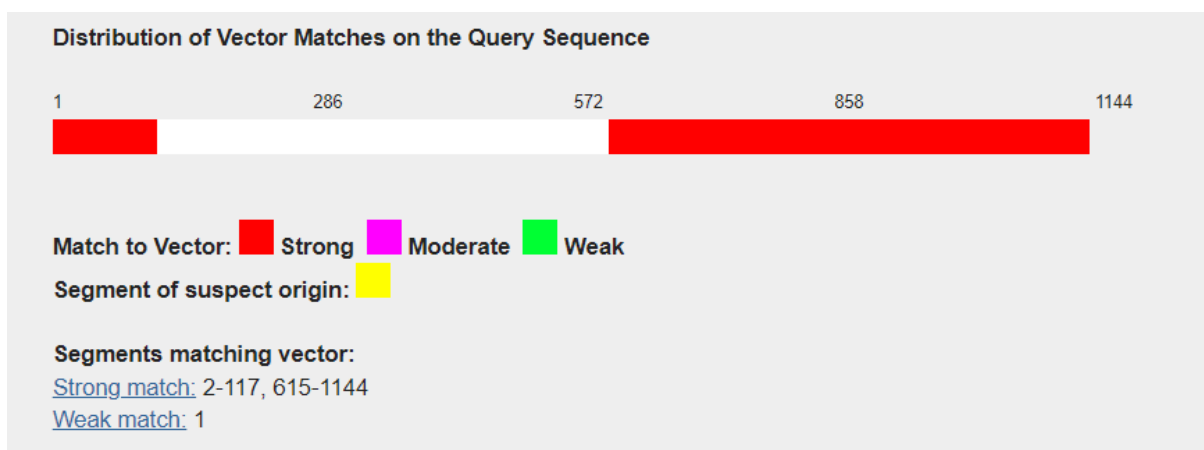
Tab. 22: Koncentrace izolované plazmidové DNA

	Koncentrace (ng/ μ l)	A260/A280
Plazmidová DNA 1-2	219,53	1,97
Plazmidová DNA 1-4	218,13	1,93
Plazmidová DNA 2-2	190,12	1,92
Plazmidová DNA 2-4	115,38	1,99
Plazmidová DNA 3-3	238,77	1,93
Plazmidová DNA 3-4	240,32	1,93

5.1.2.3 Sekvenace

Definitivní potvrzení přítomnosti insertů v plazmidové DNA bylo provedeno Sangerovým sekvenováním v Eurofins Genomics. Výstupní data z elektroforeogramů byla převedena programem Chromas do FASTA formátu, který je kompatibilní s bioinformačními programy.

Protože byl jako sekvenační primer použit reversní primer M13, bylo nutné sekvence očistit od vektorových reziduí a přeložit do reverzně komplementární podoby. K tomuto účelu byly použity webové programy VecScreen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecsreen/>), DNA Range Extractor (http://www.bioinformatics.org/sms2/range_extract_dna.html) a Reverse Complement (http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_comp.html). Ukázka výstupu z programu VecScreen je znázorněna na Obr. 11.

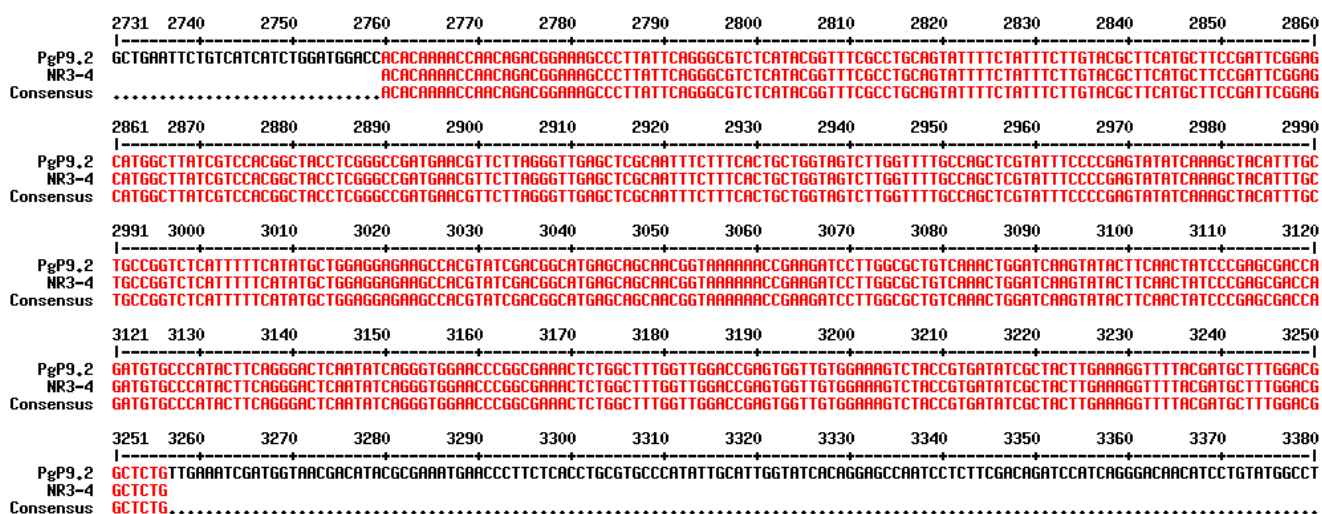


Obr. 11: Výstup programu VecScreen.

Oblasti zbarvené červeně označují úseky sekvence náležící vektoru. Žádoucí sekvence našeho inzertu je zbarvena bíle.

Takto zpracované sekvence bylo možné porovnat se sekvencemi referenčními pomocí programu MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), viz obr.12, 13 a 14. V sekvenci inzertu č. 2 byla nalezeno několik nukleotidových záměn, z nichž většina má charakter *same-sense* mutací.

Na základě výše provedených kroků bylo potvrzeno, že oba inzerty byly do vektoru zaligovány ve směru od promotoru T7 RNA polymerázy k promotoru SP6 RNA polymerázy.



Obr. 14: Porovnání výsledků sekvenace inzertu č. 3 s referenční sekvencí genu Hco-Pgp-9.2.

5.1.3 Izolace masivně namnoženého plazmidu

Pro následnou tvorbu sond bylo zapotřebí získat větší množství plazmidu o vyšší koncentraci. Po izolaci plazmidové DNA kitem ZymoPURE Plasmid MidiPrep Kit byla změřena koncentrace plazmidové DNA přístrojem Tecan Spark. K posouzení čistoty izolátů byl využit poměr absorbcí A260/A280. Jak je uvedeno v Tab. 23, koncentrace prvního vzorku je oproti ostatním výrazně nižší, proto byly v dalších krocích využity pouze plazmidy s inzertem č. 2 a 3.

Tab. 23: Koncentrace masivně namnožených plazmidů

	Koncentrace (ng/μl)	A260/A280
Plazmidová DNA s insertem č.1	96,65	1,94
Plazmidová DNA s insertem č. 2	422,74	1,95
Plazmidová DNA s insertem č. 3	237,17	1,95

5.1.4 Linearizace plazmidové DNA

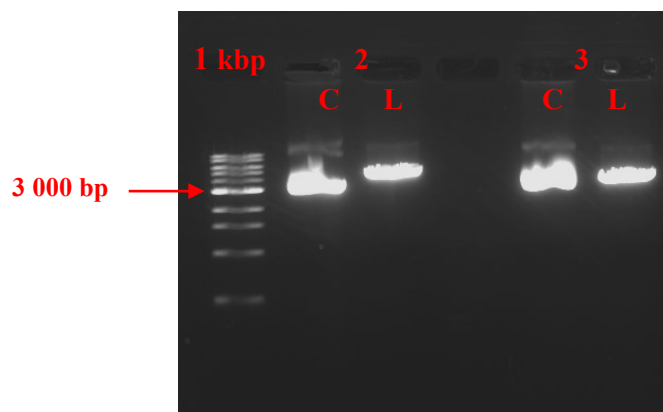
Výběr vhodné restriktivní endonukleázy byl proveden pomocí webového programu Restriction Summary (http://www.bioinformatics.org/sms2/rest_summary.html), který zadané sekvence prověřil na přítomnost restriktivních míst mnoha endonukleáz. Ukázkou výstupu z tohoto programu dokumentuje Obr. 15. Enzymy zbarvené zeleně štěpí zadanou sekvenci jednou, žlutě zbarvené dvakrát. Z enzymů, které inzert neštěpí (bílé barvy), byl vybrán takový, jehož restriktivní místo v sekvenci vektoru p-GEM-T Easy leží na straně přilehlé k promotorové oblasti T7 RNA polymerázy. Jedině tak bude možné v následujícím kroku nasynetizovat RNA sondu v *anti-sense* směru.

MspI c cgg	94, 262
NaeI gcc ggc	none
NarI gg cgcc	none
NcoI c catgg	none
NdeI ca tatg	247
NdeII gatc	166, 188
NgoMIV g ccggc	none

Obr. 15: Výstup programu Restriction Summary

(https://www.bioinformatics.org/sms2/rest_summary.html)

Úspěšnost linearizace byla ověřena agarosovou elektroforézou, kde byly linearizované plazmidy porovnány s původními vzorky cirkulárních plazmidů. Jako velikostní marker byl použit 1 kbp *DNA ladder*. Výsledek elektroforézy zachycuje Obr.16 – zleva je nanesen *DNA ladder*, následuje plazmid s inzertem č. 2 a č. 3 v cirkulární (C) a linearizované (L) podobě. Pohyb linearizovaného plazmidu by měl být pomalejší než plazmidu cirkulárního, čemuž odpovídá i výstup provedené elektroforézy. Koncentrace přečištěných produktů linearizace byla následně stanovena přístrojem Tecan Spark.



Obr. 16: Vizualizace cirkulárních a linearizovaných plazmidů

Vlevo vizualizován *DNA ladder*, následuje vektorová DNA s inzertem č.2 v cirkulární (C) a linearizované (L) podobě a obdobně vektorová DNA s inzertem č. 3

Tab. 24: Koncentrace linearizovaných vektorů

	Koncentrace (ng/μl)	A260/A280
Linearizovaný vektor s inzertem 2	172,58	1,84
Linearizovaný vektor s inzertem 3	234,99	1,84

5.1.5 Tvorba RNA sond značených digoxigeninem

Linearizované vektory s inzerty byly použity v procesu *in vitro* transkripce jako templáty pro tvorbu RNA sond značených digoxigeninem (DIG). Koncentrace a čistota připravených sond byla stanovena spektrofotometrickým měřením na přístroji Tecan Spark (Tab. 25).

Tab. 25: Koncentrace RNA sond značených digoxigeninem

	Koncentrace (ng/μl)	A260/A280
DIG-RNA sonda 2	854,72	1,85
DIG-RNA sonda 3	1248,69	1,87

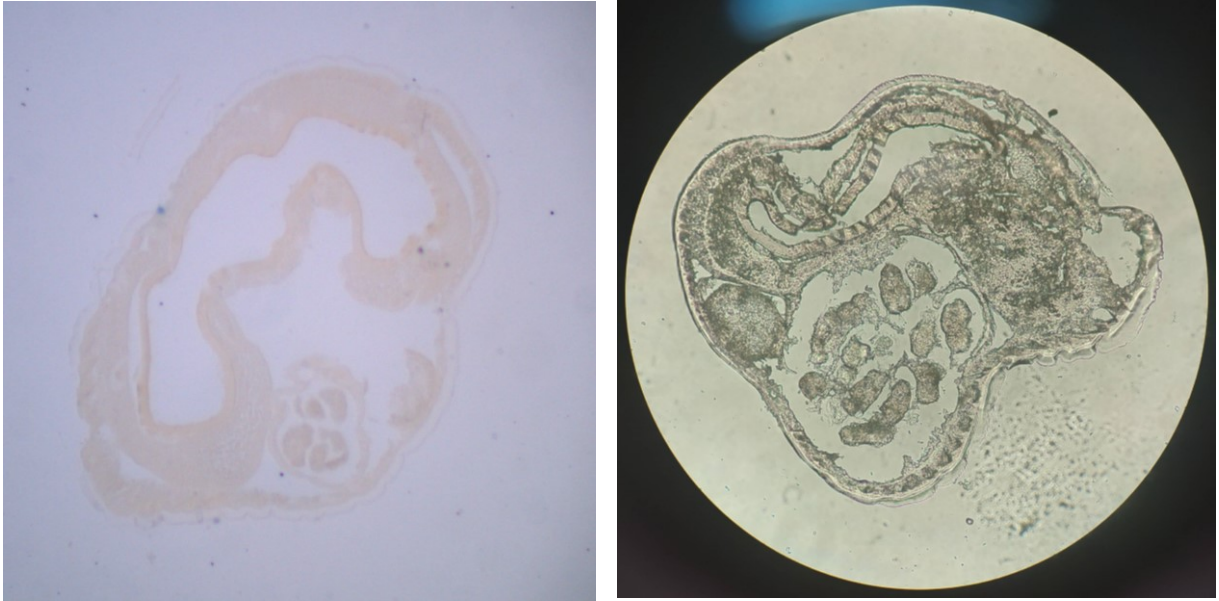
5.2 RNA *in situ* hybridizace

Vytvořené hybridizační sondy byly finálně použity k detekci mRNA P-glykoproteinu-9.2 v histologických řezech vlasovky slezové. Vlastní detekce byla provedena pomocí dvou typů chromogenních substrátů - FastRed a BCIP/NBT, jimž byl přizpůsoben celý proces RNA *in situ* hybridizace. Výsledné preparáty byly pozorovány a zdokumentovány ve světelném mikroskopu (Obr. 17-20.)

Na Obr. 17 jsou zaznamenány vzorky negativní kontroly, které byly připraveny inkubací histologických řezů vlasovky slezové s hybridizační směsí bez obsahu RNA sondy.

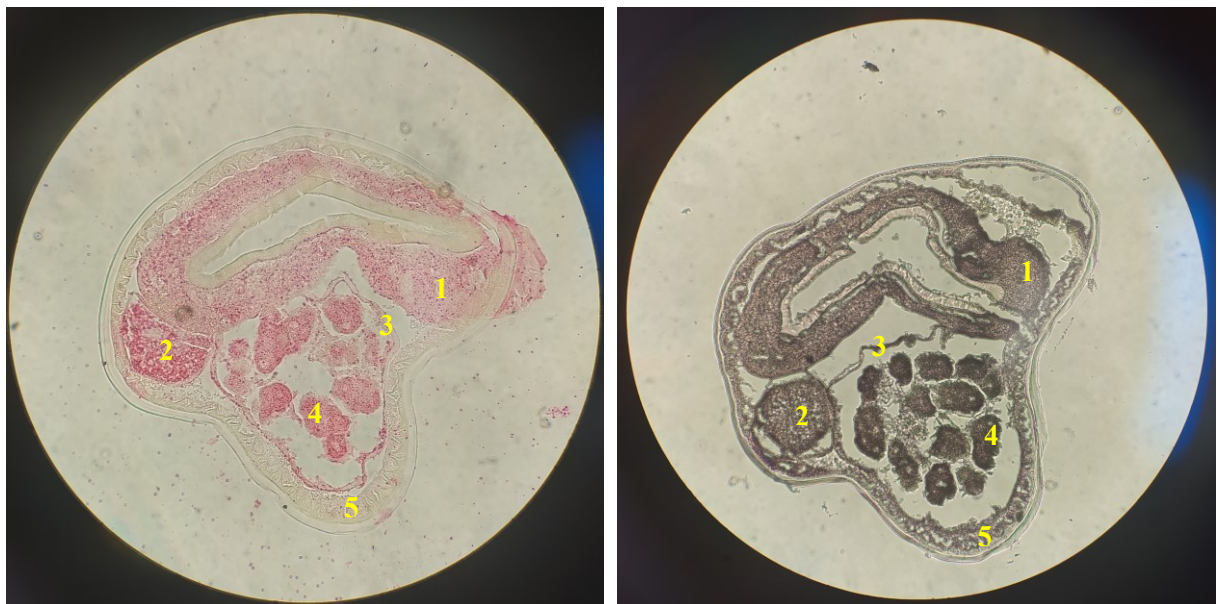
Obr. 18 porovnává výstup detekce substrátem FastRed (vlevo) a BCIP/NBT (vpravo) při hybridizaci sondy č. 2 na řez vlasovky slezové samičího pohlaví. Vznik barevného precipitátu je patrný ve tkáni střeva (*intestinum*), vaječníku (*ovarium*) a dělohy (*uterus*) naplněné vajíčky (*ovum*). Na řezu, kde byl k vizualizaci hybridizačních sond použit substrát BCIP/NBT, se navíc jeví jasně zabarvená i oblast hypodermis. Ta je však po aplikaci substrátu FastRed zabarvena velice slabě. Aplikace RNA sondy č. 3 přinesla výsledky shodné se sondou č. 2 (Obr.19).

Z důvodu nedostatečného počtu a nízké kvality histologických řezů ze samců vlasovky slezové, byla RNA *in situ* hybridizace provedena pouze s chromogenním substrátem FastRed. Jak dokumentuje Obr.20, i takto použité řezy byly přetřhané, čímž byla znemožněna jejich plnohodnotná interpretace. Pozitivně lze hodnotit pouze gonadální tkáň (*testes*) a hypodermis, v nichž je patrný vznik barevného precipitátu.



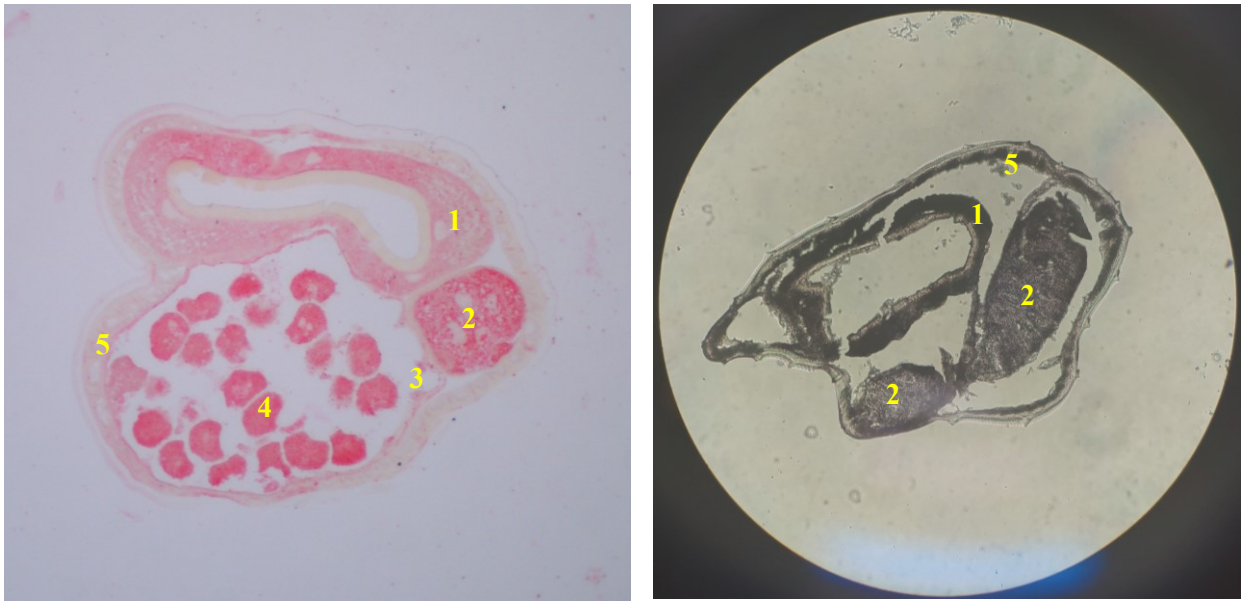
Obr. 17: Kontrolní vzorky

Histologické řezy samic vlasovky slezové inkubované s hybridizačním mixem bez přítomnosti hybridizačních sond. Na preparátu vlevo byla provedena detekce substrátem Fast Red, vpravo substrátem BCIP/NBT.



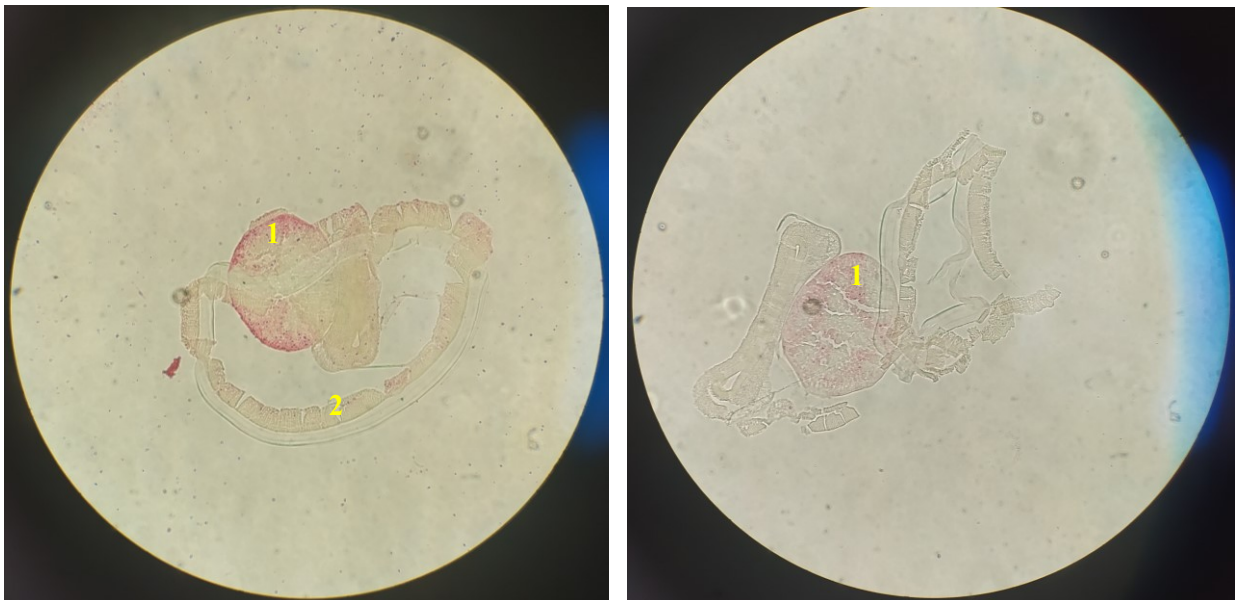
Obr. 18: Detekce mRNA Pgp-9.2 u samic vlasovky slezové pomocí RNA sondy č.2

Na preparátu vlevo byl k detekci použit substrát FastRed, vpravo substrát BCIP/NBT. (1) intestinální tkáň, (2) ovarium, (3) uterus, (4) ovum, (5) hypodermis



Obr. 19: Detekce mRNA Pgp-9.2 u samic vlasovky slezové pomocí RNA sondy č.3

Na preparátu vlevo byl k detekci použit substrát FastRed, vpravo BCIP/NBT. (1) intestinální tkáň, (2) ovarium, (3) uterus, (4) ovum, (5) hypodermis



Obr. 20: Detekce mRNA Pgp-9.2 u samců vlasovky slezové pomocí RNA sondy č. 2.

U obou samčích preparátů byl využit chromogenní substrát FastRed. (1) testes, (2) hypodermis

6. DISKUZE

P-glykoprotein byl prvním ABC transportérem, který byl v lidském těle identifikován. Dnes je na něj pozornost upřena zejména v souvislosti s chemoterapeutickou rezistencí a neúspěšnou léčbou řady onkologických onemocnění. Celosvětově nejčastějším typem rakoviny byla v roce 2020 rakovina prsu, která tvořila 12,5 % všech případů (WHO [online]). V buňkách karcinomu prsu vykazujících mnohočetnou lékovou rezistenci byla zjištěna 2,74x vyšší exprese P-glykoproteinu oproti buňkám citlivým (Mechetner *et al.* 1998). Výsledky další studie prokázaly, že zvýšená exprese P-glykoproteinu významně snižuje odezvu na léčbu ze 68 % na pouhých 17 % (Burger *et al.* 2003). Exprese P-glykoproteinu v maligních buňkách byla také pozorována u více než 50 % pacientů s relapsem akutní myeloidní leukémie. Nižší míru exprese přitom vykazovali pacienti mladší 35 let, což může částečně vysvětlit horší odezvu na léčbu u pacientů staršího věku (Han *et al.* 2001, Leith *et al.* 1999).

Uplatnění P-glykoproteinu na lékové rezistenci není tématem pouze humánní medicíny, ale týká se také oblasti veterinární. Parazitické hlístice disponují velkým potenciálem pro rozvoj anthelmintické rezistence. U vlasovky slezové, krevsajícího parazita malých přežvýkavců, se již rezistence projevila vůči všem užívaným anthelmintikům. Významnou úlohu v jejím rozvoji hrají kromě biotransformačních enzymů homology P-glykoproteinu. Ty mohou při nesprávném managementu anthelmintické léčby podléhat zvýšené expresi a omezit tak vazbu léčiva na cílové struktury. U vlasovky slezové byla doposud zdokumentovaná zvýšená exprese navozená makrocyclickými laktony u genů Hco-Pgp-2, Hco-Pgp-9.1, Hco-Pgp-13 a Hco-Pgp-16 (Godoy *et al.* 2015a, Godoy *et al.* 2016, David *et al.* 2018, Godoy *et al.* 2015b). Pro porozumění uplatnění těchto transportérů v mechanismech anthelmintické rezistence je nezbytná nejen jejich důkladná charakterizace, ale také lokalizace.

Doposud byly v těle vlasovky slezové lokalizovány tři P-glykoproteiny – Pgp-2, Pgp-9.1 a Pgp-13. Ve pharyngeální části trávicí trubice byly detekovány dva transportéry, a to Pgp-2 a Pgp-13. P-glykoprotein-13 byl navíc lokalizován v hlavových neuronech, pravděpodobně amfidech, a v epiteliální tkáni lemující exkretční kanály (Godoy *et al.* 2015a, David *et al.* 2018). Výskyt P-glykoproteinu-9.1 byl prokázán v samičí pohlavní soustavě, konkrétně ve tkáni dělohy (Godoy *et al.* 2016). Detekce všech těchto tří transportérů byla provedena technikou fluorescenční imunolokalizace, jejíž podstata spočívá ve vazbě specifických protilátek na epitopy zkoumaného proteinu. Tyto protilátky je přitom nutné připravit

procesem cílené imunizace zvířat, k němuž je použita emulze s obsahem příslušných *in vitro* syntetizovaných antigenů. Fluorescenční značkou pak může být označena protilátka primární, připravená výše uvedeným způsobem, či komerčně dostupná protilátka sekundární (Zaqout *et al.* 2020).

V této diplomové práci jsme se zaměřili na detekci mRNA P-glykoproteinu-9.2 pomocí poměrně nové techniky chromogenní RNA *in situ* hybridizace. Základem této techniky je hybridizace digoxigeninem-značených *anti-sense* sond, které byly připraveny metodami molekulárního klonování, k *sense* mRNA v histologických řezech vlasovky slezové. Vlastní vizualizace cílové mRNA pak byla umožněna anti-digoxigenin protilátkami konjugovanými s alkalickou fosfatázou. Technika chromogenní RNA *in situ* hybridizace obchází nutnost přípravy specifických protilátek, které hrají v procesu fluorescenční imunolokalizace klíčovou roli, a umožňuje detekci barevného signálu ve světelném mikroskopu. Stává se tak technikou nenáročnou a velmi dostupnou.

Výstup provedené RNA *in situ* hybridizace byl v našem případě hodnotitelný pouze u samic. Samčí preparáty byly znehodnocené potrháním či ztrátou některých částí histologických řezů. Jedná se pravděpodobně o následek menších tělesných rozměrů a vyšší křehkosti, než je tomu u samic vlasovky slezové. Fixaci a následné zalévání do parafínu by bylo vhodné u samců vlasovky slezové optimalizovat.

Lokalizace cílové mRNA byla v samičích řezech shodná u obou použitých RNA sond, detekujících odlišné úseky genu Hco-pgp-9.2. Barevný precipitát při užití substrátu FastRed i BCIP/NBT byl identifikovatelný v hypodermis, intestinální tkáni, vaječnicích a děloze, včetně vajíček. Intenzita zbarvení oblasti hypodermis byla po aplikaci substrátu FastRed oproti BCIP/NBT nízká, avšak chromogenní RNA *in situ* hybridizace je metodou kvalitativní, proto můžeme hodnotit i tento náález jako pozitivní.

Rozsáhlá distribuce mRNA P-glykoproteinu-9.2 v rozličných orgánech samic vlasovky slezové může svědčit pro jeho významné fyziologické uplatnění. Zažívací trakt slouží nejen k příjmu živin, ale funguje také jako vstupní brána pro látky škodlivé. P-glykoprotein-9.2 by zde mohl plnit protektivní úlohu a bránit vstřebání nebezpečných xenobiotik z lumenálního prostoru. Detekce P-glykoproteinu-9.2 v pohlavním traktu by mohla nasvědčovat také jeho úloze v zachování reprodukční schopnosti v případě, dostane-li se do těla vlasovky xenobiotikum např. s ovicidními vlastnostmi. Těmito vlastnostmi disponují mimo jiné také anthelmintika ze skupiny benzimidazolů (Fissiha *et* Kinde 2021).

Některé studie, využívající metodiku RNA *in situ* hybridizace, aplikovaly při použití kromě *anti-sense* sondy také sondy kontrolní. Cílem pozitivní kontrolní sondy byla obvykle

mRNA nesoucí informaci o bílkovině strukturního významu a známém místě exprese. Jednalo se například o molekulu β -tubulinu, který je součástí cytoskeletární soustavy eukaryotních buněk. Negativní kontrolní sondy byly naopak namířeny vůči strukturám organismu z jiné říše, než kam náleží organismus studovaný. V parazitologických studiích tak byla využívána negativní kontrolní sonda proti mRNA reductázy z bakterie *Bacillus subtilis* (Chelladurai *et al.* 2019). Za negativní kontrolu lze považovat také *sense* sondy, avšak jejich použití může být problematické, neboť častokrát poskytují signál na pozadí (tzv. *background staining*) (Hejátko *et al.* 2006). V našem případě byla použita pouze negativní kontrola bez přítomné sondy, která eliminovala vliv pozadí, tedy navázání barviva bez přítomnosti sondy. Pro ověření výsledků našeho experimentu a jeho publikování je však do budoucna nutné začlenit do procesu RNA *in situ* hybridizace obě kontrolní sondy.

7. ZÁVĚR

Cílem předkládané diplomové práce byla příprava plazmidů pro *in vitro* syntézu hybridizačních RNA sond značených digoxigeninem a užití těchto sond při detekci mRNA P-glykoproteinu-9.2 v histologických řezech vlasovky slezové metodou chromogenní RNA *in situ* hybridizace.

Plnohodnotná interpretace výsledků RNA *in situ* hybridizace byla z důvodu značného poškození samčích preparátů provedena pouze u histologických řezů samic vlasovky slezové. Vznik barevného precipitátu, detekující přítomnost studované mRNA, byl zaznamenán v hypodermis, intestinální tkáni, vaječnicích a děloze s vajíčky. Pro ověření námi zjištěné lokalizace P-glykoproteinu-9.2 je do budoucna nutné do experimentu začlenit také sondy kontrolní.

8. ZKRATKY

ABC	ATP binding cassette
ATP	adenosin trifosfát
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-fosfátat
cDNA	complementary DNA, komplementární DNA
CET	controlled efficiency test, kontrolovaný test účinnosti
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CISH	chromogenní <i>in situ</i> hybridizace
dATP	deoxyadenosin trifostát
ddH ₂ O	double-distilled water, dvakrát destilovaná voda
DEPC	diethyl pyrokarbonát
DIG	digoxigenin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid trifosfáty
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EHT	egg hatch test, test líhnutí vajíček
FECRT	faecal egg count reduction test, test snížení počtu vajíček v trusu zvířete
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
H ₂ O	voda
Hco	<i>Haemonchus contortus</i>
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid
IRE	Inbread resistant-Edinburgh
ISE	Inbread susceptible-Edinburgh
kbp	kilobase pairs, 1000 párů bazí
LB médium	Luria-Bertani medium
LC ₅₀	letální koncentrace
LDA	larval development assay, test vývoje larev
MCS	multiple cloning site
mRNA	messenger RNA, mediátorová RNA
NAchR	nikotinový acetylcholinový receptor
NBD	nukleotid-vázající doména

NBT	nitroblue tetrazolium
noRT	no reverse transcriptase, reakční směs bez obsahu reverzní transkriptázy
PCR	polymerázová řetězová reakce
Pgp	P-glykoprotein
RNA	ribonukleová kyselina
RNázy	ribonukleázy
rpm	počet otáček za minutu
RT	reverse transcriptase, reakční směs s obsahem reverzní transkriptázy
SNP	single nucleotide polymorphism, jednonukleotidoový polymorfismus
TAE pufr	Tris-acetát-EDTA pufr
TMD	transmembránová doména
UTP	uridin trifosfát
WR	Wild River
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galakto-pyranosid

9. ZDROJE

ABONGWA, M. et al. A brief review on the mode of action of antinematodal drugs. *Acta Veterinaria*. 2017, 67(2), 137-152. ISSN 1820-7448. doi:10.1515/acve-2017-0013

ANGULO-CUBILLAN, F. et al. *Haemonchus contortus* – Sheep relationship: A review. *Revista Científica de Veterinaria*, 2007, 17(6), 577-587

ARDELLI, B. F. Transport proteins of the ABC systems superfamily and their role in drug action and resistance in nematodes. *Parasitology International*. 2013, 62(6), 639-646. ISSN 13835769. doi:10.1016/j.parint.2013.02.008

ARSENOPOULOS, K. V. et al. Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats. *Animals*. 2021, 11(2). ISSN 2076-2615. doi:10.3390/ani11020363

ASHTON, F. T. et al. Chemo- and thermosensory neurons: structure and function in animal parasitic nematodes. *Veterinary Parasitology*. 1999, 84(4), 297-316. ISSN 03044017. doi:10.1016/S0304-4017(99)00037-0

BÁRTOVÁ, E. et KLIMEŠ, J. *Zoologie pro veterinární mediky*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2004. ISBN 80-730-5489-2.

BASYONI, M. M. A. et RIZK, E. M. A. Nematodes ultrastructure: complex systems and processes. *Journal of Parasitic Diseases*. 2016, 40(4), 1130-1140. ISSN 0971-7196. doi:10.1007/s12639-015-0707-8

BESIER, R. B. et al. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants: a review. *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Elsevier. 2016, 93, 95-143. *Advances in Parasitology*. ISSN 0049-4747. doi: 10.1016/bs.apar.2016.02.022

BURGER, H. et al. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin cancer res*. 2003, 9(2), 827-36. ISSN 1557-3265

DAVID, M. et al. Structural model, functional modulation by ivermectin and tissue localization of *Haemonchus contortus* P-glycoprotein-13: in situ localisation and characterisation of macrocyclic lactone transport. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2018, 8(1), 145-157. ISSN 22113207. doi:10.1016/j.ijpddr.2018.02.001

DEGORTER, M.K. et al. Drug Transporters in Drug Efficacy and Toxicity: Importance in Drug Absorption, Distribution, and Removal. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2012, 2010-10-24, 52(1), 249-273 ISSN 0362-1642. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134529

FISSIHA, W. et KINDE, M. Z. Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A Review. *Infection and Drug Resistance*. 2021, 14, 5403-5410. ISSN 1178-6973. doi:10.2147/IDR.S332378

GODOY, P. et al. Haemonchus contortus P-glycoprotein-2: in situ localisation and characterisation of macrocyclic lactone transport. *International Journal for Parasitology*. 2015a, 45(1), 85-93. ISSN 00207519. doi:10.1016/j.ijpara.2014.09.008

GODOY, P. et al. Characterisation of P-glycoprotein-9.1 in Haemonchus contortus: in situ localisation and characterisation of macrocyclic lactone transport. *International Journal for Parasitology*. 2016, 9(1), 85-93. ISSN 1756-3305. doi:10.1186/s13071-016-1317-8

GODOY, P. et al. Characterization of Haemonchus contortus P-glycoprotein-16 and its interaction with the macrocyclic lactone anthelmintics. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2015b, 204(1), 11-15. ISSN 01666851. doi:10.1016/j.molbiopara.2015.12.001

GOFFEAU, A. et HERTOIGH, B. D. Membrane Transport, ABC Transporters. *Encyclopedia of Biological Chemistry III*. Elsevier, 2013, 1076-1081. ISBN 9780128220405. doi:10.1016/B978-0-12-819460-7.00501-6

HAN, K. et al. Expression of Functional Markers in Acute Nonlymphoblastic Leukemia. *Acta Haematologica*. 2001, 104(4), 174-180. ISSN 0001-5792. doi:10.1159/000046511

HANNA, W.M. et KWOK, K. Chromogenic in-situ hybridization: a viable alternative to fluorescence in-situ hybridization in the HER2 testing algorithm. *Modern Pathology*, 2006, 19(4), 481-487.

HARDER, A. The Biochemistry of Haemonchus contortus and Other Parasitic Nematodes. *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Elsevier, 2016, 93, 69-94. Advances in Parasitology. ISBN 9780128103951. doi:10.1016/bs.apar.2016.02.010

HEJÁTKO, J. et al. In situ hybridization technique for mRNA detection in whole mount Arabidopsis samples. *Nature Protocols*. 2006, 1(4), 1939-1946, ISSN 1754-2189, doi:10.1038/nprot.2006.333

HERATH, H. M. P. et al. Advances in the discovery and development of anthelmintics by harnessing natural product scaffolds. Elsevier, 2021, 111 203-251 Advances in Parasitology. ISBN 9780128246030. doi: 10.1016/bs.apar.2020.10.002

HOLLENSTEIN, K. et al. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. 2007, 17(4), 412-418. ISSN 0959440X. doi:10.1016/j.sbi.2007.07.003

HOPFNER, K. P. Invited review: Architectures and mechanisms of ATP binding cassette proteins. *Biopolymers*. 2016, 105(8), 492-504. ISSN 0006-3525. doi:10.1002/bip.22843

CHELLADURAI, J. et al. Detection and quantification of Parascaris P-glycoprotein drug transporter expression with a novel mRNA hybridization technique. *Veterinary Parasitology*. 2019, 267(1), 75-83. ISSN 03044017. doi:10.1016/j.vetpar.2019.02.002

CHOTTEAU-LELIÈVRE, A. et al. Expression Analysis of Murine Genes Using In Situ Hybridization With Radioactive and Nonradioactively Labeled RNA Probes. *In Situ Hybridization Protocols*. New Jersey: Human Press, 2005, 61-88. ISBN 1-59745-007-3. doi:10.1385/1-59745-007-3:61

ILIEV, P. et al. Clinical study of acute haemonchosis in lambs. *Trakia Journal of Science*. 2017, 15(1), 74-78. ISSN 13121723. doi:10.15547/tjs.2017.01.012

ISSOUF, M. et al. Haemonchus contortus P-Glycoproteins Interact with Host Eosinophil Granules: A Novel Insight into the Role of ABC Transporters in Host-Parasite Interaction. *PLoS ONE*. 2014, 9(2), 1123-1132. ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0087802

JENSEN, E. Technical Review: In Situ Hybridization. *The Anatomical Record*. 2014, 297(8), 1349-1353. ISSN 19328486. doi:10.1002/ar.22944

KAPLAN, R. M. Anthelmintic Treatment in the Era of Resistance. *Food Animal Practice*. Fifth edition. Elsevier, 2009, s. 470-478. ISBN 978-1-4160-3591-6.

KAPLAN, R. M. Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Management of Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2020, 36(1), 17-30. ISSN 07490720. doi:10.1016/j.cvfa.2019.12.001

KELLEROVÁ, P. et al. Ivermectin-induced changes in the expression of cytochromes P450 and efflux transporters in Haemonchus contortus female and male adults. *Veterinary Parasitology*. 2019, 273, 24-31. ISSN 03044017. doi:10.1016/j.vetpar.2019.07.006

KOTZE, A. C. et PRICHARD, R. K. Anthelmintic Resistance in Haemonchus contortus. *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Elsevier, 2016, 397-428. Advances in Parasitology. ISBN 9780128103951. doi:10.1016/bs.apar.2016.02.012

LAING, R. et al. The genome and transcriptome of Haemonchus contortus, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology*. 2013, 14(8). ISSN 1465-6906. doi:10.1186/gb-2013-14-8-r88

LANGE, E.C.M. Multi Drug Resistance P Glycoprotein and other Transporters: going strong 40 years on. *Encyclopedia of Stress*. Elsevier, 2007, 31(2), 774-783. ISBN 9780123739476. doi:10.1016/B978-012373947-6.00562-6

LANUSSE, C.E. et al. Gaining Insights Into the Pharmacology of Anthelmintics Using *Haemonchus contortus* as a Model Nematode. *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Elsevier, 2016, 93, 465-518. Advances in Parasitology. ISBN 9780128103951. doi:10.1016/bs.apar.2016.02.014

LEITH, C. P. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood*. 1999, 94(3), 1086-99. ISSN 0006-4971

LIU, X. et PAN, G. *Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity*, Singapore: Springer, 2019. ISBN 978-981-13-7647-4.

LONG, J. et Lloyd, R.V. In situ hybridization: Methods and applications. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 1997, 11(1), 2-9.

MATOUŠKOVÁ, P. et al. The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends in Parasitology*. 2016, 32(6), 481-491. ISSN 14714922. doi:10.1016/j.pt.2016.02.004

MECHETNER, E. et al. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin cancer res*. 1998, 4(2), 389-98. ISSN 1557-3265

MINAGAWA, M. et al. Dual Impact of a Benzimidazole Resistant β -Tubulin on Microtubule Behavior in Fission Yeast. *Cells*. 2021, 10(5). ISSN 2073-4409. doi:10.3390/cells10051042

MUCHIUT, M. S. et al. Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations. *Veterinary Parasitology*. 2018, 254, 43-48. ISSN 03044017. doi:10.1016/j.vetpar.2018.03.004

NAEEM, M. et al. Ovine haemonchosis: a review. *Tropical Animal Health and Production*. 2021, 53(1), 74-78. ISSN 0049-4747. doi:10.1007/s11250-020-02439-8

PIERMAN, B. et al. The ABC of ABC Transporters. *Membrane Transport in Plants*. Elsevier, 2018, 1-23. Advances in Botanical Research. ISBN 9780128093900. doi:10.1016/bs.abr.2018.09.005

PRICHARD, R. K. et al. ABC transporters and β -tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology*. 2007, 134(8), 1123-1132. ISSN 0031-1820. doi:10.1017/S0031182007000091

Promega [online] – P-GEM-T Easy systems [citováno 20.12. 2021] Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360#relationships>

Protein Data Bank [online] – 6C0V [citováno 6.12.2021] Dostupné z: <https://www.rcsb.org/structure/6C0V>

RAZA, A. et al. Effects of in vitro exposure to ivermectin and levamisole on the expression patterns of ABC transporters in *Haemonchus contortus* larvae. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2016, 6(2), 103-115. ISSN 22113207. doi:10.1016/j.ijpddr.2016.03.001

REES, D. C., JOHNSON E. et LEWINSON O. ABC transporters: the power to change. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009, 10(3), 218-227. ISSN 1471-0072. doi:10.1038/nrm2646

ROBERTS, L.S. a J. JANOVY. *Foundations of Parasitology*. Eighth Edition. New York: Mc Graw Hill, 2009. ISBN 978-0073028279.

ROEBER, F. et al. Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. *Biotechnology Advances*. 2013a, 31(8), 1135-1152. ISSN 07349750. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.01.008

ROEBER, F. et al. *Next-Generation Molecular-Diagnostic Tools for Gastrointestinal Nematodes of Livestock, with an Emphasis on Small Ruminants*. Elsevier, 2013b, 83, 267-333. *Advances in Parasitology*. ISBN 9780124077058. doi:10.1016/B978-0-12-407705-8.00004-5

RUSSEL, F. G. M. Transporters: Importance in Drug Absorption, Distribution, and Removal. *Enzyme- and Transporter-Based Drug-Drug Interactions*. NY: Springer, 2010, 2010-10-24, 27-49. ISBN 978-1-4419-0839-1. doi:10.1007/978-1-4419-0840-7_2

STUHLÍKOVÁ RAISOVÁ, L. et al. Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2018, 8(1), 50-58. ISSN 22113207. doi:10.1016/j.ijpddr.2018.01.005

SUN, Y. L. et al. Role of ABC transporters in cancer chemotherapy: going strong 40 years on. *Chinese Journal of Cancer*. 2012, 31(2), 51-57. ISSN 1000467X. doi:10.5732/cjc.011.10466

THEODOULOU, F. L. et KERR, I. D. ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochemical Society Transactions*. 2015, 43(5), 1033-1040. ISSN 0300-5127. doi:10.1042/BST20150139

TSAI, Ch. et HARDING, S. A. In situ Hybridization. *Laboratory Methods in Cell Biology - Imaging*. Elsevier, 2013, 339-359. Methods in Cell Biology. ISBN 9780124072398. doi:10.1016/B978-0-12-407239-8.00016-1

VAN DEN BROM, R. et al. Haemonchus contortus resistance to monepantel in sheep. *Veterinary Parasitology*. 2015, 209(4), 278-280. ISSN 03044017. doi:10.1016/j.vetpar.2015.02.026

WHO [online] – Cancer [citováno 5.4.2022] Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancera>

WOLSTENHOLME, A. J. et al. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*. Elsevier, 2004, 20(10), 469-476. Advances in Parasitology. ISBN 9780128103951. doi:10.1016/j.pt.2004.07.010

XIAO, H. et al. Clinically-Relevant ABC Transporter for Anti-Cancer Drug Resistance: Importance in Drug Absorption, Distribution, and Removal. *Frontiers in Pharmacology*. 2021, 2010-10-24, 12, 27-49. ISBN 978-1-4419-0839-1. ISSN 1663-9812. doi:10.3389/fphar.2021.648407

YOUNG, A. P. et al. A technical review and guide to RNA fluorescence in situ hybridization. *PeerJ*. 2020, 8. ISSN 2167-8359. doi:10.7717/peerj.8806

ZAQOUT, S. et al. Immunofluorescence Staining of Paraffin Sections Step by Step. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2020, 14(1), 11-15. ISSN 1662-5129. doi:10.3389/fnana.2020.582218

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Anatomie hlístic	11
Obr. 2: Životní cyklus vlasovky slezové	12
Obr. 3: Struktura lidského P-glykoproteinu	23
Obr. 4: Konstitutivní exprese Pgp-9.2 u rezistentních a citlivého kmene vlasovky slezové.....	25
Obr. 5: Znázornění struktury Pgp-9.2 pomocí programu Protter	26
Obr. 6: Mechanismus chromogenní RNA in situ hybridizace	27
Obr. 7: Struktura pGEM [®] -T Easy Vector.....	41
Obr. 8: Detekce amplikonů pomocí agarosové elektroforézy	56
Obr. 9: Detekce produktů <i>Colony</i> PCR pomocí agarosové elektroforézy.....	57
Obr. 10: Elektroforetická detekce produktů reakce <i>Quick-Load</i> PCR	58
Obr. 11: Výstup programu VecScreen.	59
Obr. 12: Porovnání výsledků sekvenace inzertu č. 1 s referenční sekvencí genu Hco-Pgp-9.2.....	60
Obr. 13: Porovnání výsledků sekvenace inzertu č. 2 s referenční sekvencí genu Hco-Pgp-9.2.....	60
Obr. 14: Porovnání výsledků sekvenace inzertu č. 3 s referenční sekvencí genu Hco-Pgp-9.2.....	61
Obr. 15: Výstup programu Restriction Summary.....	62
Obr. 16: Vizualizace cirkulárních a linearizovaných plazmidů	63
Obr. 17: Kontrolní vzorky	65
Obr. 18: Detekce mRNA Pgp-9.2 u samic vlasovky slezové pomocí RNA sondy č.2	65
Obr. 19: Detekce mRNA Pgp-9.2 u samic vlasovky slezové pomocí RNA sondy č.3	66
Obr. 20: Detekce mRNA Pgp-9.2 u samců vlasovky slezové pomocí RNA sondy č.2.	66

11. SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Složení reakční směsi pro DNase treatment.....	36
Tab. 2: Složení mastermixu pro reverzní transkripci jednoho vzorku	37
Tab. 3: Sekvence primerů pro přípravu inzertů reprezentujících hybridizační sondy.....	38
Tab. 4: Složení reakční směsi pro PCR.....	38
Tab. 5: Reakční podmínky PCR.....	38
Tab. 6: Složení reakční směsi pro A-tailing	40
Tab. 7: Složení reakční směsi pro ligační reakci	41
Tab. 8: Složení reakční směsi pro <i>Colony</i> PCR	43
Tab. 9: Reakční podmínky <i>Colony</i> PCR	43
Tab. 10: Složení reakční směsi pro <i>Quick-Load</i> PCR pro jeden vzorek.....	44
Tab. 11: Reakční podmínky <i>Quick-Load</i> PCR.....	44
Tab. 12: Složení reakční směsi pro linearizaci plazmidu	46
Tab. 13: Složení reakční směsi pro in vitro transkripci RNA sond.....	48
Tab. 14: Postup opracování histologických řezů před nanesením hybridizačních sond	51
Tab. 15: Složení hybridizačního mixu 1	51
Tab. 16: Složení hybridizačního mixu 2	52
Tab. 17: Složení hybridizační směsi.....	52
Tab. 18: Postup provedení stringentního promývání	53
Tab. 19: Složení blokovacích pufrů	53
Tab. 20: Postup detekce substrátem BCIP/NBT	55
Tab. 21: Koncentrace amplikonů PCR.....	56
Tab. 22: Koncentrace izolované plazmidové DNA.....	58
Tab. 23: Koncentrace masivně namnožených plazmidů	61
Tab. 24: Koncentrace linearizovaných vektorů.....	63
Tab. 25: Koncentrace RNA sond značených digoxigeninem.....	63

12. PŘÍLOHY

12.1 Sekvence genu Hco-Pgp-9.2

Žlutě je vyznačena sekvence insertu č. 1, modře insertu č. 2 a zeleně sekvence insertu č. 3.

>PgP9.2

```
ATGGGTTTCTTAAAGAAGAAAGGGAAAGCAGCCGATAGCAAAGAGTCAGAGAATGACAAC
GAAGAAGAAAAGAAAAGATGATGCACCGAAAGCCAGTATCCCACAACCTGTTCCGTTACACA
ACCACATTTCGACAAGTTGTTGCTCTTGATCGGTTCAACTGTCGCTATGGGTACTGGTATG
GGACTCCCAATGATGGCTATTATCATGGGTGACATCACGCAGAACTTCATGAGCGTCAAT
GGAAACAGAACTTCTTTTCAACAATTTGAACACGACGTGACACAAAACCTGTTTGAATAC
GTCTACCTTGGTTGTGGAATATTTCGCAGCAGCAACGATTTCAGGCGACATGTTTCCTGACT
GTCGGAGAAAACCTGGTGAATCAATTGAGGCGACAGTTTTTCAAGTCAATTCTTCGCCAA
GACATTCCATGGTTTGATAAGAATGGTTCAGGAACATTGGCCACAAAGCTGTTTCGACAAT
CTCGAACGAGTCAAGGAAGGAACCGGCGACAAAGTCCGGTCTGATGATCCAGTATGTGGCA
CAGTTCCTTCGGTGGCTTCATCGTGGCATTACCTATGACTGGAACTCACGCTGATTATG
ATGTCCCTGGCTCCATTCATGATCATGTGCGGAGCATTATTTGCTAGGTTGATGGCCACT
GCAGCGACTCGTGAGGCCAAAAAGTATGCAGTGGCTGGAGGAATAGCCGAAGAGGTGCTT
ACTTCGATGAGGACTGTTATGGCTTTCAACGGACAGCCTTATGAGTGCGAAAGGTACAAG
CAGGCACTGGAAGATGGTAAATCTACAGGAATAAAGAAATCCTTGTATGTTGGTATTGGC
TTCGCAATTACATTTCTGATCTTGTCTCTTCTTCTATTGCTTGGCATTTCCTGGTTCGGCACG
GATTTTCGTCTACAATAACCGGATGCAAGGTGGAACGTGATGACGGTCTTTTTTGGCCGTT
ATGATGGGCTCTATGGCGCTTGGACAAGCTGGACCTCAGTTTGCTGTTCTCGGCACAGCT
ATGGGTGCAGCCGGATCTCTTTATCAGATCATCGATAGAGAACCAGAGATTGACTCTTAC
TCGCAGGAAGGTGTGAGACCGTCTACTCTCACAGGGAAACTCACAATCTCAAACCTTGA
TTTACCTATCCAACACGACCAGATGTGCCTATTCTCAAGGGTGTCTCGTTTCGAAGCGAAT
CCTGGGGAACGATAGCATTGGTCGGTCCAAGTGGTTGCGGAAAAAGTACCATAGTCCAG
TTGTTGCTACGTTATTACAATCCTGATGACGGAAAGATTACGATAGATGGTGTGGAATC
GACAAGCTTAATATCGAGTTCCTTCGGAACCTACGTCGGAGTCGTCTCTCAAGAGCCAATG
CTTTTCAATACAACGATTGAACAGAACATCCGCTACGGACGAGAGAATGTCACGGACGCT
GAAATCACGGCTGCTCTACGTAAAGCAAACGCTTATGACTTTGTACAGTCATTCCCTGAT
GGAATCTATACGAACGTTGGTGACCGTGGCACCCAGATGTCCGGCGGCCAGAAGCAACGT
ATAGCCATTGCTCGTGCCTGGTGCAGAGATCCGAAAATTCTCCTGCTGGATGAGGCCACT
AGCGCTCTCGACGCCGAAAGTGAACATGTCGTCCAGCAGGCTCTAGAGAACGCTTCCAAG
GGAAGAACCACCATCGTTGTAGCTCATCGACTGTCTACTATTCGAAATGCTGACAGAATC
ATTGCTATTAAGGATGGAGAAGTATGGAAGTCCGCACTCATGACGAGCTGATGGCCCGG
AAAGAACTGTACCATGAATTGGTCAATTCTCAGGTGTTTCGTCGATGTCGACGGGGATGGT
GAGGAAGCTGGTGCAGCGGCGCACTCCGCCACTCTCACGATCAAAGTCCCGTTCGAATAAT
TCAGCTGACTTTATGGGCCTCGGATCCCAACTATCTACGAATGACGACAAAAGAGAAAAA
ACTGCTGCAAACAAGTCGGTGAAAGCCGTAAAGGATCTGGAGCGACTGAAAAAAGAAGTC
GAAGAAGAAGGTGCTGTCAGAGCGAACCTCATTAAAATCTTTAGGTATGCTCGACCCGAA
TGGCCTTTTATCACTATTGCCGTACTCTCCTCAATCGTACAAGGATGCGTTTTTCCAGCT
TTCTCCTTATTCTTCACACAAATTATCGACGTGTTCTCAAAGCGACCGGGTGATCCATCG
CTCAGGAGCGATGGCCATTTTTGGGCACTCATGTTTCTCGTACTGGGTATTATTCAAGCT
ATCTCTATGCTTCTACAGTGTTTCTTCTTTGGTATGTCAGCAGAAAGGCTCACAATGCGG
CTTCGTTCAAAGATCTTCAACAATGTGATGAGAATGGATGCCACCTACTTCGACATGCCT
CGCCATTCACCTGGCAAATCACCACCCGACTAGCCACGGATGCACCCAACGTGAAATCG
GCTCTCGACTACCGTTTTGGTGCCGTTTTTCAGTTCACCTTGTTCCTGGTGGGTTGTGGCATT
GGAATTGCATTCTATTTCTGGATGGCAAATGGCACTTTTAGCAATCTCCATCTTTCCTTTG
GGTGCAGCTGGGCGAGCGATTACAGATGAGGTTTCATGTCTGGTTCGTGCGACTGCCGATGCG
AAGGAGATGGAACAGTGGAAAGATTGCTATGGAAGCGATCGAGCATATTCGAACGGTA
CAGGCATTGACGTTGGAACGTCGGCTTCATGCTGAATTCTGTTCATCATCTGGATGGACCA
CACAAAACCAACAGACGGAAAGCCCTTATTTCAGGGCGTCTCATACGGTTTCGCCTGCAGT
ATTTTCTATTTCTTGTACGCTTCATGCTTCCGATTTCGGAGCATGGCTTATCGTCCACGGC
```

TACCTCGGGCCGATGAACGTTCTTAGGGTTGAGCTCGCAATTTCTTTCCTGCTGGTAGT
CTTGGTTTTGCCAGCTCGTATTTCCCGAGTATATCAAAGCTACATTTGCTGCCGGTCTC
ATTTTTTCATATGCTGGAGGAGAAGCCACGTATCGACGGCATGAGCAGCAACGGTAAAAA
CCGAAGATCCTTGGCGCTGTCAAAGTGGATCAAGTATACTTCAACTATCCCGAGCGACCA
GATGTGCCATACTTCAGGGACTCAATATCAGGGTGAACCCGGCGAAACTCTGGCTTTG
GTTGGACCGAGTGGTTGTGGAAAGTCTACCGTGATATCGCTACTTGAAAGGTTTTACGAT
GCTTTGGACGGCTCTGTTGAAATCGATGGTAACGACATACGCGAAATGAACCCTTCTCAC
CTGCGTGCCCATATTGCATTGGTATCACAGGAGCCAATCCTCTTCGACAGATCCATCAGG
GACAACATCCTGTATGGCCTGCCACCAGGTTCTGTCAAGTGAAGCTGAAGTGCATGAAATC
GCACAACGTGCTAACATCCACAAAATTCGTAATGGAATTGCCCGAGGGCTACAACACACGT
GCGGGAGAGAAAGGCGTGCAGCTGTCTGGTGGGCAGAAACAACGAATCGCCATCGCGCGT
GCTCTCATCAGAAATCCGAAAATTTGCTGCTTGACGAGGCTACCAGTGCCCTGGATACC
GAAAGCGAGAAGGTTGTGCAAGAGGCGCTCGACAAGGCATCAGAAGGCCGCACCTGTATC
GTTGTGGCACATCGGCTGTGACTGTGTCGTCGAATGCCAATTGCATCATGGTAGTCCAAGGA
GGAAAAATTGTTGAAAAAGGAACACACAACGAACTAATGCAAGCAAAGGTGTGTATTGG
GAGCTCACACAAAAGCAGACGACGGCAAAGAATAA

12.2 Postup práce s kitem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up

5 Protocols

5.1 PCR clean-up

The following protocol is suitable for PCR clean-up as well as DNA concentration and removal of salts, enzymes, etc. from enzymatic reactions (SDS < 0.1 %).

Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer NT3 was prepared according to section 3.
-

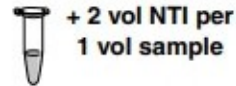
1 Adjust DNA binding condition

For very small sample volumes < 30 µL adjust the volume of the reaction mixture to 50–100 µL with water.

It is not necessary to remove mineral oil.

Mix **1 volume of sample** with **2 volumes of Buffer NT1** (e.g., mix 100 µL PCR reaction and 200 µL Buffer NT1).

Note: For removal of small fragments like primer dimers dilutions of Buffer NT1 can be used instead of 100 % Buffer NT1. Please refer to section 2.3.



2 Bind DNA

Place a **NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column** into a Collection Tube (2 mL) and load up to 700 µL sample.

Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.

Load remaining sample if necessary and repeat the centrifugation step.



3 Wash silica membrane

Add **700 µL Buffer NT3** to the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column. Centrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the column back into the collection tube.



Recommended: Repeat previous washing step to minimize chaotropic salt carry-over and improve A_{260}/A_{230} values (see section 2.7 for detailed information).



4 Dry silica membrane

Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g** to remove Buffer NT3 completely. Make sure the spin column does not come in contact with the flow-through while removing it from the centrifuge and the collection tube.



Note: Residual ethanol from Buffer NT3 might inhibit enzymatic reactions. Total removal of ethanol can be achieved by incubating the columns for 2–5 min at 70 °C prior to elution.



11,000 x g
1 min

5 Elute DNA

Place the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Column into a new 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided). Add **15–30 µL Buffer NE** and incubate at **room temperature** (15–25 °C) for **1 min**. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.



+ 15–30 µL NE
RT
1 min
11,000 x g
1 min

Note: DNA recovery of larger fragments (> 1000 bp) can be increased by multiple elution steps with fresh buffer, heating to 70 °C and incubation for 5 min. See section 2.6 for detailed information.

12.3 Postup práce s kitem NucleoSpin Plasmid (No Lid) (Macherey-Nagel)

Plasmid DNA purification

5 NucleoSpin® Plasmid / Plasmid (NoLid) protocols

5.1 Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli*

Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer A4 was prepared according to section 3.

1 Cultivate and harvest bacterial cells

Use **1–5 mL** of a saturated *E. coli* **LB culture**, pellet cells in a standard benchtop microcentrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard the supernatant and remove as much of the liquid as possible.



**11,000 x g,
30 s**

Note: For isolation of low-copy plasmids refer to section 5.2.

2 Cell lysis

Add **250 µL Buffer A1**. Resuspend the cell pellet completely by vortexing or pipetting up and down. Make sure no cell clumps remain before addition of Buffer A2!

**+ 250 µL A1
Resuspend**

Attention: Check Buffer A2 for precipitated SDS prior to use. If a white precipitate is visible, warm the buffer for several minutes at 30–40 °C until precipitate is dissolved completely. Mix thoroughly and cool buffer down to room temperature (18–25 °C).



**+ 250 µL A2
Mix
RT, 5 min**

Add **250 µL Buffer A2**. Mix gently by inverting the tube **6–8 times**. Do not vortex to avoid shearing of genomic DNA. Incubate at **room temperature** for up to **5 min** or until lysate appears clear.

Add **300 µL Buffer A3**. Mix thoroughly by inverting the tube **6–8 times** until blue samples turn colorless completely! Do not vortex to avoid shearing of genomic DNA!

**+ 300 µL A3
Mix**

Make sure to neutralize completely to precipitate all protein and chromosomal DNA. LyseControl should turn completely colorless without any traces of blue.

3 Clarification of lysate

Centrifuge for **5 min** at **11,000 x g** at room temperature. Repeat this step in case the supernatant is not clear!



**11,000 x g,
5–10 min**

4 Bind DNA

Place a NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) Column in a Collection Tube (2 mL) and decant the supernatant from step 3 or pipette a maximum of 700 µL of the supernatant onto the column. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flowthrough and place the NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) Column back into the collection tube.



Load supernatant



**11,000 x g,
1 min**

Repeat this step to load the remaining lysate.

5 Wash silica membrane

Recommended: If plasmid DNA is prepared from host strains containing high levels of nucleases (e.g., HB101 or strains of the JM series), **it is strongly recommended** performing an additional washing step with **500 µL Buffer AW, optionally preheated to 50 °C**, and centrifuge for **1 min** at **11,000 x g** before proceeding with Buffer A4. Additional washing with Buffer AW will also increase the reading length of DNA sequencing reactions and improve the performance of critical enzymatic reactions.



**Optional:
+ 500 µL AW**



**11,000 x g,
1 min**

Add **600 µL Buffer A4** (supplemented with ethanol, see section 3). Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flowthrough and place the NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) Column back into the **empty** collection tube.



**+ 600 µL A4
11,000 x g,
1 min**

6 Dry silica membrane

Centrifuge for **2 min** at **11,000 x g** and discard the collection tube.



Note: Residual ethanolic wash buffer might inhibit enzymatic reactions.



**11,000 x g,
2 min**

7 Elute DNA

Place the NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) Column in a 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided) and add **50 µL Buffer AE**. Incubate for **1 min** at **room temperature**. Centrifuge for 1 min at **11,000 x g**.



**+ 50 µL AE
RT, 1 min**



**11,000 x g,
1 min**

Note: For more efficient elution procedures and alternative elution buffer (e.g., TE buffer or water) see section 2.5.

12.4 Postup práce s kitem ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep Kit (Zymo Research)

Protocol

Buffer Preparation:

- ✓ Add 107 ml of 95% ethanol to the **28 ml ZymoPURE™ Wash 2 (Concentrate)** before use.
- ✓ The **ZymoPURE™ P2** and **ZymoPURE™ Binding Buffer** may have precipitated. If this occurs, dissolve the precipitate by incubating the bottles at 30-37 °C for 10-20 minutes and mix by inversion. Do not microwave!

Before Starting:

- ✓ Centrifuge up to 50 ml of bacterial culture at $\geq 3,400 \times g$ for 10 minutes to pellet the cells in a 50 ml conical tube. Discard supernatant.

Plasmid DNA Purification

The following procedure should be performed at room temperature (15-30°C).

1. Add 8 ml of **ZymoPURE™ P1 (Red)** to the bacterial cell pellet and resuspend completely by vortexing or pipetting.
2. Add 8 ml of **ZymoPURE™ P2 (Blue)** and immediately mix by gently inverting the tube 6 times. Do not vortex! Let sit at room temperature for 2-3 minutes¹. *Cells are completely lysed when the solution appears clear, purple, and viscous.*
3. Add 8 ml of **ZymoPURE™ P3 (Yellow)** and mix gently but thoroughly by inversion. Do not vortex! Invert the tube an additional 5 times after the sample turns completely yellow. *The sample will turn yellow when the neutralization is complete, and a yellowish precipitate will form.*
4. Ensure the plug is attached to the Luer Lock at the bottom of the **ZymoPURE™ Syringe Filter-X**. Place the syringe filter upright in a tube rack and load the lysate in the **ZymoPURE™ Syringe Filter-X²** and wait 5-8 minutes for the precipitate to float to the top.
5. Remove the Luer Lock plug from the bottom of the syringe and place it into a clean 50 ml conical tube. Place the plunger in the syringe and push the solution through the **ZymoPURE™ Syringe Filter-X** in one continuous motion until approximately 20 ml of cleared lysate is recovered. Save the cleared lysate!

The volume of lysate recovered from the syringe filter is critical for optimal plasmid DNA binding to the spin-column. Please refer to page 10 in the appendix regarding the adjustment of the volume of ZymoPURE™ Binding Buffer used in step 6 if the clarified lysate volume is below approximately 20 ml.

6. Add 8 ml of **ZymoPURE™ Binding Buffer** to the cleared lysate from step 5 and mix thoroughly by inverting the tube 8 times.

To continue processing the lysate using the recommended vacuum protocol, proceed to the next page. If a vacuum is not available, proceed to page 7 for an alternative centrifugation method.

¹ Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 3 minutes. Excessive lysis can result in denatured plasmid DNA.

² If the precipitate has formed a homogenous layer at the surface of the neutralized lysate, then invert the tube 3-4 times prior to loading the lysate into the **ZymoPURE™ Syringe Filter-X**.

Centrifugation Protocol:

Perform steps 1-6 as indicated in the general protocol on page 5 and continue with the protocol below using a swinging-bucket centrifuge.

7. Remove the **50 ml Reservoir** from the top of the **Zymo-Spin™ V-PS Column Assembly**. Ensure the connection between the **15 ml Reservoir-X** and **Zymo-Spin™ V-PS Column** is finger-tight and place the assembly into a 50 ml conical tube.
8. Add 10 ml of the mixture from step 6 into the **15 ml Reservoir-X/Zymo-Spin™ V-PS Column Assembly**, and centrifuge at 500 x g for 2 minutes. Empty the 50 ml conical tube and repeat this step until the entire mixture has passed through the column.
9. Add 5 ml of **ZymoPURE™ Wash 1** to the Zymo-Spin™ V-PS Column Assembly and centrifuge the column at 500 x g for 2 minutes. Discard the flow through.
10. Add 5 ml of **ZymoPURE™ Wash 2** to the Zymo-Spin™ V-PS Column Assembly and centrifuge at 500 x g for 2 minutes. Repeat this wash step.
11. Remove and discard the **15 ml Reservoir-X** from the **Zymo-Spin™ V-PS Column**. Place the Zymo-Spin™ V-PS Column in a **Collection Tube** and centrifuge at $\geq 16,000 \times g$ for 1 minute, in a microcentrifuge, to remove any residual wash buffer.
12. Transfer the Zymo-Spin™ V-PS Column into a clean 1.5 ml tube and add 200 μ l of **ZymoPURE™ Elution Buffer**^{1,2,3} directly to the column matrix. Incubate at room temperature for 2 minutes, and then centrifuge at $\geq 16,000 \times g$ for 1 minute in a microcentrifuge.
13. *Optional:* For removal of residual endotoxins^{4,5}, place the **EndoZero™ II Spin-Column** in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube. Add the entire eluate from step 13 into the **EndoZero™ II Spin-Column**, wait 2 minutes, and then centrifuge at 10,000 x g for 1 minute in a microcentrifuge. Store the eluted plasmid DNA at $\leq -20^{\circ}\text{C}$.

¹ The **ZymoPURE™ Elution Buffer** contains 10 mM Tris-HCl, pH 8.5, 0.1 mM EDTA. If required, pure water can also be used to elute the DNA.

² The DNA yield can be increased by pre-warming the **ZymoPURE™ Elution Buffer** to 50 °C and/or increasing the incubation period up to 10 minutes prior to centrifugation.

³ For low copy number plasmids or if higher concentration is desired, the plasmid DNA can be eluted in as little as 150 μ l.

⁴ This optional step will reduce endotoxin levels from ≤ 1 EU/ μ g of plasmid DNA to ≤ 0.025 EU/ μ g of plasmid DNA.

⁵ Due to the **EndoZero™ II Spin-Column** chemistry, some plasmid DNA will be lost during this step. The percent of plasmid DNA loss will be dependent on the amount of plasmid DNA that is going through the spin-column. The plasmid DNA loss is generally not significant for moderate and high-copy number plasmids. However, it can be significant for low-copy number plasmids or lower yielding preps.