

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

Klonování a příprava plasmidu pro expresi reduktasy
sdr12 z vlasovky slezové

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2024

Bc. Štěpánka Jakubcová

„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 2024

Bc. Štěpánka Jakubcová

Poděkování

Chtěla bych moc poděkovat doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za odborné vedení, za předání cenných zkušeností v rámci výzkumné činnosti a za čas věnovaný kontrolám této diplomové práce. Ráda bych také poděkovala Mgr. Nikole Rychlé za pomoc při tvorbě experimentální části a za konzultace. Děkuji katedře biochemických věd, která umožnila realizaci diplomové práce. Za finanční podporu děkuji projektu GAČR (20-14581Y).

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Štěpánka Jakubcová

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

Název diplomové práce: Klonování a příprava plasmidu pro expresi reduktasy *sdr12* z vlasovky slezové

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je parazitická hlístice způsobující závažné onemocnění nazývané hemonchóza, které postihuje hospodářská zvířata, zejména ovce a kozy. Problematika rezistence hlístic na léčbu anthelmintiky představuje významný problém v zemědělském sektoru s výraznými ekonomickými dopady spojenými s nižší produktivitou zvířat. Dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) jsou významné enzymy podílející se na metabolické přeměně xenobiotik v organismu, které by mohly souviset s anthelmintickou rezistencí.

V teoretické části diplomové práce je popsána vlasovka slezová, hemonchóza, rezistence hlístic na léčbu a biotransformace xenobiotik s důrazem na enzymy SDR.

Experimentální část práce zahrnuje přípravu vektoru (plasmidu) nesoucího kódující oblast genu *sdr12*, expresi a izolaci příslušného proteinu. Výsledků bylo dosaženo využitím molekulárně biologických metod, jakými jsou: PCR, ligace insertu do vektoru, transformace kompetentních buněk, restrikční štěpení, sekvenování, agarosová elektroforéza a western blot.

Rekombinantní protein bude využit k funkční charakterizaci enzymatické aktivity, jejíž studium může přispět k rozvoji nových terapeutických strategií a lepšímu pochopení mechanismu rezistence.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Štěpánka Jakubcová

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

Title of diploma thesis: Plasmid construction for expression of *sdr12* reductase from *Haemonchus contortus*

The barber's pole worm (*Haemonchus contortus*) is a parasitic nematode causing a severe disease known as haemonchosis, affecting livestock, especially sheep and goats. Anthelmintic resistance represents a significant problem in the agricultural sector, with notable economic impacts associated with decreased animal productivity. Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs) are essential enzymes involved in the biotransformation of xenobiotics and may relate to anthelmintic resistance.

The theoretical section describes the barber's pole worm, haemonchosis, treatment resistance, and the biotransformation of xenobiotics focusing on SDR enzymes.

The experimental section involves the preparation of a vector (plasmid) carrying the protein-coding region of the *sdr12* gene to express and isolate the recombinant protein. The results were achieved by using molecular biology methods such as PCR, ligation of the insert to vector, transformation of competent cells, restriction enzyme digestion, DNA sequencing, agarose gel electrophoresis, and western blot.

The recombinant protein will be used for further functional characterization of enzymatic activity, which can contribute to the development of new therapeutic strategies and a better understanding of the resistance mechanisms.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Vlasovka slezová (<i>Haemonchus contortus</i>).....	10
2.1.1	Charakteristika	10
2.1.2	Životní cyklus.....	10
2.2	Hemonchóza.....	11
2.2.1	Charakteristika a klinické příznaky.....	11
2.2.2	Možnosti v diagnostice hemonchózy	12
2.2.3	Prevence, léčba a anthelmintické rezistence	14
2.3	Metabolismus xenobiotik a <i>H. contortus</i>	16
2.3.1	Enzymy 1. fáze biotransformace.....	17
2.3.2	Enzymy 2. fáze biotransformace.....	18
2.3.3	Přenašeče (transportéry) xenobiotik.....	20
2.4	Dehydrogenasy/Reduktasy s krátkým řetězcem (SDR).....	21
2.4.1	Charakteristika SDR.....	21
2.4.2	Nomenklatura SDR	23
2.4.3	Zástupci lidských SDR.....	24
2.4.4	SDR u <i>H. contortus</i>	25
3	Cíl práce	27
4	Experimentální část.....	28
4.1	Použitý materiál a technické vybavení.....	28
4.1.1	Biologický materiál, chemikálie a reagentie	28
4.1.2	Markery, média a a pufry	29
4.1.3	Enzymy	29
4.1.4	Kity.....	29

4.1.5	Technické vybavení a přístroje	30
4.2	Metodické postupy	31
4.2.1	Příprava DNA insertu.....	31
4.2.2	Klonování.....	34
4.2.3	Izolace rekombinantního proteinu.....	44
4.2.4	Purifikace a odsolení rekombinantního proteinu	45
4.2.5	BCA stanovení proteinů.....	46
4.2.6	Western blot (imunoblot).....	47
5	Výsledky	50
5.1	Amplifikace genu <i>sdr12</i>	50
5.2	PCR kolonií s klonovacím vektorem pGEM®-T Easy.....	51
5.3	Izolace zaligovaného klonovacího vektoru pGEM®-T Easy	51
5.4	Restrikční štěpení zaligovaného klonovacího vektoru pGEM®-T Easy 53	
5.5	PCR kolonií s expresním vektorem pET-22b(+)	53
5.6	Koncentrace a čistota vektoru pET-22b(+) se zaligovaným insertem <i>sdr12</i>	54
5.7	Restrikční štěpení zaligovaného expresního vektoru pET-22b(+).....	55
5.8	Sekvenace.....	56
5.9	Izolace celkových proteinů	57
5.10	Chemiluminiscenční detekce proteinů	58
6	Diskuse.....	60
7	Závěr	63
8	Seznam zkratk	64
9	Seznam obrázků	67
10	Seznam tabulek	67
11	Seznam použité literatury.....	68
12	Elektronické zdroje	75

13	Přílohy	76
----	---------------	----

1 Úvod

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je hlístice, která parazituje především ve slezu ovcí nebo koz a žíví se hostitelskou krví. Zvířata se nakazí pozřením infekčního larválního stádia *H. contortus*. U vnímavých jedinců se pak projeví onemocnění zvané hemonchóza a to nejčastěji v podobě bledosti sliznic v rámci anemického syndromu, čehož se využívá v diagnostice. Základním terapeutickým přístupem je léčba benzimidazoly, imidazothiazoly, makrocyclickými laktony, nebo deriváty aminoacetonitrilu. Tato léčiva představují skupinu běžných anthelmintik, ke kterým hlístice mohou vykazovat rezistenci a léčba infikovaných zvířat je tedy neúčinná. Úhyn zvířat na hemonchózu a nízká produktivita nakažených zvířat má významný dopad na zemědělství a ekonomiku.

Fyziologicky *H. contortus* metabolizuje anthelmintika pomocí enzymů přeměňující léčiva na metabolity, které se snadněji eliminují z organismu. První fáze biotransformace se účastní několik enzymů, včetně dehydrogenas/reduktas s krátkým řetězcem (SDR). Nesprávným podáváním anthelmintik může dojít ke změně míry exprese *sdr*, nebo jiných genů kódujících biotransformační enzymy a vytvoření rezistence. Urychlením metabolismu anthelmintik dojde ke snížení požadované odpovědi hlístic na dané léčivo.

Na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty UK je SDR enzymům z různých organismů věnována velká pozornost. V rámci projektu GAČR Dr. Raisové Stuchlíkové se studují SDR z *H. contortus*, především jejich fylogenetická, transkriptomická, proteomická a funkční analýza.

V mé experimentální části práce jsem s využitím molekulárně biologických metod amplifikovala kódující sekvenci genu *sdr12*, kterou jsem naklonovala do vektoru. Po transformaci a kultivaci buněk, které obsahují vektor s vloženou sekvencí genu *sdr12*, jsem připravila kódovaný protein. Tento rekombinantní protein bude dále využit ke studiu enzymatické aktivity.

2 Teoretická část

2.1 Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*)

2.1.1 Charakteristika

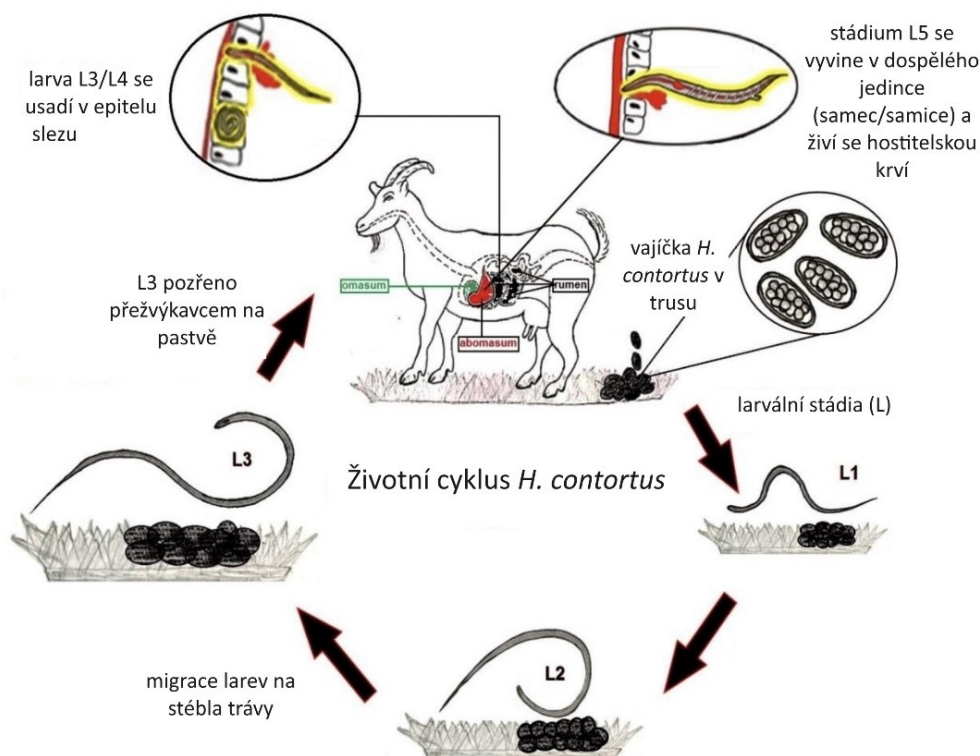
Haemonchus contortus je parazitická hlístice, která se živí krví a spadá do kmene: Nematoda, třídy Secernentea, řádu Strongylida a čeledi Trichostrongylidae (později Haemonchidae). *H. contortus* je jedním z nejvýznamnějších parazitů slezu ovcí a koz. Způsobuje onemocnění zvané hemonchóza, které má velký dopad na zdraví a výkonost hospodářských zvířat. Hlístice je adaptabilní na různé klimatické podmínky, ale nejlépe prosperuje v teplém a vlhkém prostředí (Flay, Hill, Muguiro 2022). Samci dosahují průměrné délky 10-20 mm, zatímco samice jsou větší s průměrnou délkou 18-30 mm (Naeem, Iqbal, Roohi 2021).

2.1.2 Životní cyklus

H. contortus prochází několika stádii života – vajíčko, larvální stádia a dospělý jedinec. Vajíčka parazita se dostávají trusem na pastviny. Z vajíček se vyvinou volně žijící larvy během jednoho až sedmi dnů – 1. stádium (L1), 2. stádium (L2) a infekční stádium (L3). Vývoj larev závisí na vhodných podmínkách prostředí (Naeem, Iqbal, Roohi 2021).

Larvy L3 jsou infekčním stádiem *H. contortus*, které jsou zkonsumovány hostitelem při spásání potravy. Přežití a usazení larev L3 ve slezu ovlivňuje stáří, plemeno a zdravotní stav hostitele (Flay, Hill, Muguiro 2022).

Po požití vnímavými jedinci se L3 diferencuje postupně přes stádium L4 do stádia L5. Kolem desátého a jedenáctého dne se u nezralých L5 vyvine v bukální dutině lanceta, kterou larva poškodí tkáň slezu a vyvolá krvácení. Larvy L5 následně dozrávají do dospělých forem a rozmnožují se. Dospělé samice začínají produkovat vajíčka mezi 12. a 15. dnem s vysokým biotickým potenciálem (Flay, Hill, Muguiro 2022).



Obrázek 1 Schéma životního cyklu *H. contortus* u koz

Zdroj: upraveno a převzato z (Ehsan et al. 2020)

2.2 Hemonchóza

2.2.1 Charakteristika a klinické příznaky

Hemonchóza je onemocnění způsobené hlísticí *H. contortus* parazitující ve slezu ovcí a koz. Infikovaná zvířata mohou vykazovat anémii s hypoproteinémií, což se následně může projevit bledostí sliznic a edémem v submandibulární oblasti (Adduci et al. 2022). Manifestovat se mohou u zvířat i další klinické příznaky kterými jsou: letargie, slabost, zrychlené dýchání a srdeční frekvence. Onemocnění může způsobit úhyn stád, anebo jen výrazně snížit produktivitu hospodářských zvířat. V závislosti na množství pozřených larev parazitém a klinických příznacích lze hemonchózu kategorizovat na hyperakutní, akutní a chronickou (Flay, Hill, Muguero 2022).

2.2.1.1 Hyperakutní hemonchóza

Hyperakutní hemonchóza se vyskytuje nejčastěji u mladých zvířat, která jsou vystavena vysoké parazitární zátěži dosahující až 30 000 larev *H. contortus*. Hyperakutní forma hemonchózy se vyznačuje náhlým úmrtím. U přeživších zvířat je pozorována anémie a meléna. Infikovaná zvířata mohou vykrváct do jednoho týdne,

ještě před rozvinutím kompenzační erythropoézy. Závažné krvácení způsobuje rychlý pokles cirkulujícího krevního objemu, které vyústí v hypovolemický šok (Flay, Hill, Muguero 2022).

2.2.1.2 Akutní hemonchóza

Akutní hemonchóza je charakterizovaná nižší parazitární zátěží (2 000-20 000 larev *H. contortus*) zvířat. Na rozdíl od hyperakutní formy hemonchózy, dochází v tomto případě k menším krevním ztrátám u infikovaných jedinců a k delšímu rozvoji anémie v průběhu onemocnění. Zvířata při akutní hemonchóze vykazují letargii, slabost, zrychlené dýchání, zrychlenou srdeční frekvenci a bledé sliznice. V důsledku poklesu hematokritu a nepřetržité ztráty krve nastává kompenzační erythropoéza a stav nedostatku železa. Hemonchóza způsobuje kromě anémie také hypoproteinémii. V důsledku hematofágní aktivity *H. contortus* dochází k úniku proteinů do lumen slezu hostitele přes narušené buněčné spoje. K hypoproteinémii přispívá rovněž i snížená absorpce proteinů, zapříčiněná ztrátou buněk epitelu slezu, a také hojné využívání proteinů k opravě poškozených tkání. Důsledkem hypoalbuminémie je snížený intravaskulární onkotický tlak a generalizovaný, nebo lokalizovaný edém (Flay, Hill, Muguero 2022).

2.2.1.3 Chronická hemonchóza

Chronická hemonchóza vzniká při ingesci menšího počtu larev v porovnání s akutní hemonchózou. Chronická hemonchóza se vyskytuje v prostředích, která nemají tak vhodné podmínky pro vývoj infekčních larev. Onemocnění se může u zvířat projevit snížením produktivity, změnou v rychlosti růstu, nebo doživostí (Flay, Hill, Muguero 2022).

2.2.2 Možnosti v diagnostice hemonchózy

2.2.2.1 Hematologické nálezy a systém FAMACHA[®]

V jižní Africe byla vyvinuta praktická metoda umožňující terénní klasifikaci anémie, která je založená na hodnocení zbarvení spojivkové sliznice u malých přežvýkavců. Systém FAMACHA[®] byl pojmenovaný po Dr. Faffa Malan (FAffa MAlan Chart) a byl vyvinut porovnáním barev spojivek nemocných zvířat s jejich naměřenými hodnotami hematokritu (HCT). Na škále 1-5 je hodnota 1 považována za neanemickou, naopak hodnota 5 odpovídá těžké anémii (Flay, Hill, Muguero 2022).

Tabulka 1 Systém FAMACHA[®]

FAMACHA [®]	Hematokrit (HCT)	Barva spojivek	Doporučení léčby
1	≥28 %	červená	ne
2	23–27 %	↓	ne
3	18–22 %		dle potřeby
4	13–17 %		ano
5	≤12 %	bledá	ano

Zdroj: (Vatta et al. 2001)

Na hodnocení anémie se kromě HCT podílí i koncentrace hemoglobinu (Hb), střední objem erytrocytu (MCV) a střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech (MCHC). Měření hematologických parametrů vyžaduje odběr vzorků krve a přístup k vhodnému laboratornímu diagnostickému zařízení (Flay, Hill, Muguiro 2022).

2.2.2.2 Post-mortem examinace

Ohniska hemonchózy jsou často poprvé rozpoznána až při úhynu zvířat. Post mortem examinace umožňuje rychlé potvrzení diagnózy vizualizací parazitů ve slezu nakažených zvířat. Hlístice *H. contortus* mají charakteristické spirálovité zbarvení, kde střeva naplněná krví jsou červená a rozmnožovací systém samice je bílý. Vlasovce slezové se díky tomuto typickému vzhledu přezdívá „barber’s pole worm“ (Flay, Hill, Muguiro 2022; Besier et al. 2016).

2.2.2.3 Koprologické vyšetření

V trusu nakažených zvířat se nachází značné množství vajíček *H. contortus*. Pro kvantifikaci vajíček v trusu lze využít flotační metody McMaster nebo FLOTAC. Metoda FLOTAC má velmi vysokou citlivost a přesnost oproti metodě McMaster. FLOTAC ve svém postupu zahrnuje homogenizaci vzorku, filtraci, centrifugaci, aplikaci flotačního roztoku (například NaCl) a závěrečné mikroskopické hodnocení. Kvantitativní výstup analýzy se vyjadřuje jako počet vajíček na gram trusu (Cringoli et al. 2010; Besier et al. 2016; Naeem, Iqbal, Roohi 2021; Roepstorff, Nansen 1998).

2.2.2.4 Molekulární metody

Uplatnění nachází metoda real-time PCR, která kvantifikuje transkripci cílového genu např. druhého vnitřního transkribovaného spaceru (ITS2) ribosomální DNA

(Arsenopoulos et al. 2021; von Samson-Himmelstjerna, Harder, Schnieder 2002). K identifikaci a absolutní kvantifikaci *H. contortus* lze použít také kapkovou digitální polymerázovou řetězovou reakci (ddPCR). Metoda ddPCR je založená na mikrofluidice. Vzorky jsou před amplifikačním krokem PCR rozděleny do několika olejových nano kapiček. Měřením intenzity fluorescence se kapičky definují jako pozitivní nebo negativní na přítomnost templátu. Koncentrace DNA (počet kopií na μ l) se vypočítává pomocí Poissonovy statistiky (Elmahalawy et al. 2018; Naeem, Iqbal, Roohi 2021; Zarlenga, Hoberg, Tuo 2016).

2.2.2.5 Imunologické metody

Základní sérologickou metodou, kterou je možné použít pro stanovení antigenu *H. contortus* je ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Hassan et al. 2019). Imunologické metody však nenachází široké uplatnění v diagnostice hemonchózy. Omezením imunologických testů je antigenní specifita a také skutečnost, že protilátky přetrvávají v organismu i dlouho po úspěšném vyléčení infekce. Bylo také zjištěno, že hladina specifických protilátek hostitele stoupá na detekovatelnou úroveň až poté, co se začnou manifestovat klinické příznaky. Imunologické metody jsou důležitým nástrojem ve výzkumu pro odhad úrovně expozice, populační imunity a k identifikaci zvířat s nízkou imunitní odpovědí (Zarlenga, Hoberg, Tuo 2016).

2.2.3 Prevence, léčba a anthelmintické rezistence

2.2.3.1 Prevence hemonchózy

Stěžejním preventivním opatřením je odpovídající chovná praxe. Pravidelná rotace zvířat na pastvině může hrát významnou roli v prevenci hemonchózy. Efektivním řešením je střídání ovcí nebo koz na pastvině s dobyt看em, který má omezenou náchylnost k *H. contortus*. Nutriční podmínky zvířat do značné míry také ovlivňují jejich odolnost vůči hlísticím, a proto dobře živená zvířata mají lepší schopnost odolávat nákaze. Významným preventivním opatřením je také vakcinace (Besier et al. 2016). Vakcína Barbervax® je komerčně dostupná a byla schválena pro subkutánní podání ovcím (Adduci et al. 2022).

2.2.3.2 Léčba

Farmakoterapie zvířat představuje základní strategii v léčbě hemonchózy. Hospodářským zvířatům jsou v rámci léčby parazitárních onemocnění podávány některé

ze čtyř hlavních tříd běžných anthelmintik: benzimidazoly (např. albendazol, mebendazol, flubendazol, fenbendazol) imidazothiazoly (levamisol), makrocyklické laktony (ivermektin, moxidektin) a deriváty aminoacetonitrilu (monepantel). Účinnost dostupných anthelmintik se postupem času snížila v důsledku zvyšující se lékové rezistence. Vývoj různého stupně lékové rezistence mezi hlísticemi byl popsán u všech skupin anthelmintik (Zajíčková et al. 2021).

2.2.3.3 Anthelmintická rezistence

Anthelmintická rezistence je stav, kdy paraziti postupně ztrácejí citlivost vůči lékům (anthelmintikům). Hlavní faktory přispívající k rozvoji anthelmintické rezistence zahrnují vysokou frekvenci používání anthelmintik, nedodržování doporučeného dávkování, hromadnou profylaktickou léčbu stáda, nebo také nepřetržité užívání pouze jednoho léku (Fissiha, Kinde 2021; Shalaby 2013).

Mechanismy rezistence lze klasifikovat do dvou kategorií: cílové a necílové. Mechanismus rezistence spojený s cílovým místem léčiva je způsobený primárně mutací v DNA, která mění strukturu tohoto místa. Naopak necílový mechanismus rezistence je způsobený hlavně zvýšenou detoxikací a eliminací léčiva prostřednictvím zvýšené exprese a aktivity enzymů metabolizujících xenobiotika, nebo transportérů xenobiotik (Rychlá et al. 2024).

Benzimidazoly (BZ)

BZ způsobují u hlístic především inhibici polymerace mikrotubulů (Besier et al. 2016). Hlavní mechanismus rezistence vůči BZ je spojen se změnami v cílové molekule léčiva – v β -tubulinu (Lacey, Prichard 1986). U hlístic rezistentních k BZ byly zjištěny tři jednonukleotidové polymorfismy (SNP – *single nucleotide polymorphism*) v genu pro β tubulinu. Nejrozšířenějším SNP je substituce fenylalaninu za tyrosin na kodonu 200 (F200Y). U dalších mutací spojených s rezistencí na BZ dochází k substituci fenylalaninu za tyrosin v pozici 167 (F167Y), nebo k substituci kyseliny glutamové za alanin v pozici 198 (E198A). Následkem genetických změn, které se projeví odlišnou aminokyselinovou sekvencí v proteinu, dochází u rezistentních hlístic k neschopnosti benzimidazolu vázat se na β -tubulin (Fissiha, Kinde 2021).

Imidazothiazoly

Imidazothiazoly působí jako agonisté nikotinu v cholinergních receptorech (nAChR) (Besier et al. 2016). Aktivace nAChR imidazothiazoly vede k trvalé neuromuskulární depolarizaci a spastické paralýze. Rezistence na imidazothiazoly u *H. contortus* může být způsobena mutacemi v genech *Hco-unc-63* a *Hco-acr-8* kódující podjednotku nAChR. Tyto geny byly detekovány u imidazothiazol-rezistentních *Haemonchus* spp. a exprimují protein, který se váže na nAChR. Vazba tohoto proteinu na nAChR zabraňuje vazbě levimazolu (Boulin et al. 2011; Arsenopoulos et al. 2021) Byl detekován také významný pokles transkripce genů kódujících nAChR (*Hco-unc-63a*, *-63b*, *-29,2*; *-29,4*; *-acr-8a*) (Sarai et al. 2014; Arsenopoulos et al. 2021).

Makrocyklické laktony (ML)

Cílovou strukturou ML jsou glutamátové receptory chloridových iontových kanálů (GluClRs) exprimované v neuronech a svalových buňkách hlístic. ML ireversibilně aktivují GluClRs, čímž inhibují aktivitu neuronů současně s kontraktilitou svalů a vyvolávají tak paralýzu a smrt (Kotze et al. 2014). S rezistencí na ML je spojena mutace v genu pro α -podjednotku GluClRs (Blackhall et al. 1998). S rezistencí na ML se také pojí P-glykoproteiny, které fungují jako efluxní transportéry (transportují léčivo z intracelulárního prostoru buňky). Expozice ML rezistentním parazitům *H. contortus* vede k nadměrné expresi P-glykoproteinů (Lloberas et al. 2013)

Deriváty aminoacetonitrilu

Cílovými strukturami derivátů aminoacetonitrilu jsou nikotinové acetylcholinové receptory (nAChR). S rezistencí vůči monepantelu jsou spojeny mutace v genech kódujících nAChR: *Hco-des-2H* a *Hco-acr-23H* nebo *Hco-mptl-1* (Kaminsky et al. 2008; Arsenopoulos et al. 2021)

2.3 Metabolismus xenobiotik a *H. contortus*

Xenobiotika jsou cizorodé látky, které po vstupu do organismu neplní žádnou fyziologickou funkci. Xenobiotika mohou být přírodního původu, častěji se však jedná o syntetické látky. Do skupiny xenobiotik se řadí léčiva, návykové látky, kosmetické přípravky, potravinová aditiva, pesticidy, průmyslové zplodiny a toxiny. Xenobiotika

jsou distribuovány v organismu na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností, metabolizovány a následně eliminovány (Skálová et al. 2017).

Xenobiotikum dokáže interagovat s endogenními látkami, a proto představuje potencionální riziko pro organismus. Proti těmto potencionálně nebezpečným látkám využívá organismus své obranné mechanismy. V obranné strategii organismu jsou klíčové enzymy metabolizující xenobiotika (transportní proteiny a biotransformační enzymy). Biotransformační enzymy mění chemickou strukturu původní cizorodé látky a její přeměnou vzniká nová a více hydrofilní sloučenina, tzv. metabolit, který má odlišné vlastnosti a chování v organismu (Skálová et al. 2017).

Biotransformační reakce lze rozdělit na dvě fáze. V první (konverzní) fázi může docházet k oxidaci, redukci, hydrolýze, hydrataci, nebo izomeraci. V druhé fázi biotransformace probíhají konjugační reakce, jakými mohou být glukuronidace, sulfonace, methylace, acetylace, konjugace s glutathionem a konjugace s aminokyselinami. Transportní procesy xenobiotik a vzniklých metabolitů se označují jako třetí fáze metabolismu xenobiotik (Skálová et al. 2017).

Na základě zjištěných informací o *Caenorhabditis elegans* (volně žijícího homologa *H. contortus*) probíhá metabolismus xenobiotik ve třech fázích zahrnující a) modifikaci dehydrogenasami/reduktasami s krátkým řetězcem (SDR) a cytochromy P450 b) konjugaci glutathion-S-transferasou (GST) a UDP-glykosyltransferasou (UGT) c) vyloučení z buňky effluxními ABC transportéry – P-glykoproteiny (Gasser et al. 2016)

2.3.1 Enzymy 1. fáze biotransformace

V rámci první fáze biotransformace jsou do struktury xenobiotika zavedeny, nebo odkryty funkční skupiny. Na této fázi se významně podílí cytochromy P450 (CYP), flavinové monooxygenasy (FMO), peroxidasy, aldo-ketoreduktasy (AKR), dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR), dehydrogenasy/reduktasy se středně dlouhým řetězcem, esterasy a mnoho dalších (Skálová et al. 2017). Enzymům SDR je věnována samostatná kapitola 2.4.

2.3.1.1 Cytochromy P450 (CYP)

CYP jsou početnou nadrodinou enzymů vyskytujících se téměř ve všech živých organismech (Nelson et al. 1993). CYP katalyzují širokou škálu reakcí s endogenními i exogenními substráty, obvykle prostřednictvím monooxygenasové aktivity, ale mají i peroxidasovou či reduktasovou aktivitu. CYP se podílejí na biosyntéze a katabolismu steroidů, retinoidů, prostaglandinů a mastných kyselin. CYP se také účastní detoxikace léků a insekticidů. Lidský genom kóduje 57 CYP, z nichž nejvýznamnější je isoforma CYP3A4 z hlediska metabolismu klinicky používaných léčiv (Laing et al. 2015). Příkladem oxidativního metabolismu anthelmintik u *H. contortus* je oxidace albendazolu (ABZ) na albendazol sulfoxid (ABZSO) (Matoušková et al. 2016; Cvilink et al. 2008).

U *H. contortus* bylo objeveno 42 genů kódujících CYP (Matoušková et al. 2016). Byla zaznamenána dynamika v expresi genů v průběhu životního cyklu *H. contortus*, kde většina genů pro CYP je vysoce exprimovaná v larválních stádiích hlístic. Prokázalo se, že exprese genů pro CYP u dospělých samců je vyšší než u samic. Hlavní lokalitou exprese genů pro CYP je střevo. Expresní profily genů kódujících CYP u *H. contortus* a orthologního organismu *Caenorhabditis elegans* vykazují vysokou podobnost (Laing et al. 2015). Výzkum provedený (Yilmaz et al. 2017) identifikoval zvýšenou konstitutivní expresi genu kódujícího CYP34/35 u vysoce rezistentního izolátu *H. contortus* v porovnání s citlivými izoláty. Tento gen by se mohl podílet na anthelmintické rezistenci.

2.3.2 Enzymy 2. fáze biotransformace

Druhé fáze biotransformace se účastní konjugační enzymy, které katalyzují reakci xenobiotika či vzniklého metabolitu s endogenní sloučeninou. Jelikož konjugační reakce vyžadují dodání energie, je často nutné aktivovat endogenní látku připojením makroergního kofaktoru. Katalyzátory konjugačních reakcí jsou různé transferasy umožňující vznik konjugátu, který má většinou hydrofilnější charakter než původní látka. Cílem konjugace je snížení biologické aktivity, snížení toxicity a snadnější eliminace xenobiotika (Skálová et al. 2017).

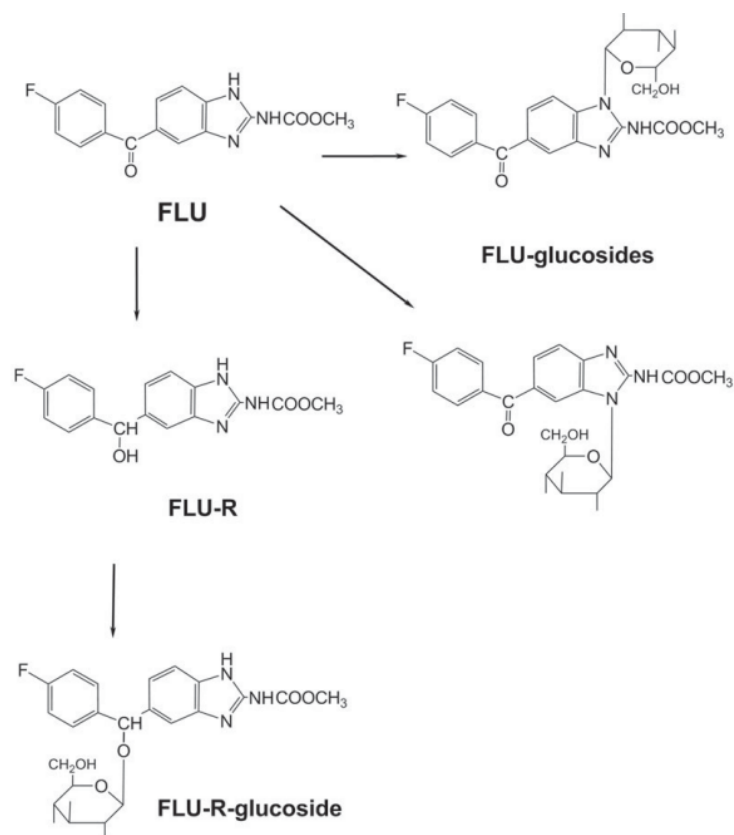
2.3.2.1 UDP-glykosyltransferasy (UGT)

UGT katalyzují kovalentní připojení hexosové skupiny k lipofilním látkám. Reakce využívá donorů aktivovaných cukrů ve formě obsahující uridinofosfát (UDP) např. kyselina UDP-glukuronová, UDP-glukóza, UDP-xylóza, UDP N-acetylglukosamin, které jsou konjugovány pomocí UGT na funkční skupiny různých látek. Ačkoli je glykosidace neobvyklou konjugační reakcí u obratlovců, převládá u rostlin a bakterií (Matoušková et al. 2016). Genom *H. contortus* obsahuje 34 genů pro UGT (Laing et al. 2013).

U helmintů byla pozorována detoxikace benzimidazolových anthelmintik prostřednictvím glykosidace. Tato biotransformační reakce byla účinnější u rezistentních kmenů *H. contortus* než u citlivých kmenů, což naznačuje zapojení UGT do možného vývoje rezistence na benzimidazolová anthelmintika u této hlístce (Vokřál et al. 2012) Přispívat k lékové rezistenci by mohla konkrétně UGT368B2, která měla zvýšenou expresi v rezistentních kmenech (Matoušková et al. 2018).

2.3.2.2 Gutathion-S-transferasy (GST)

Významnou detoxikační reakcí je konjugace elektrofilních center sloučenin (např. epoxidů, ketonů, izokyanátů) s glutathionem (Skálová et al. 2017). U helmintů se GST podílejí na detoxikaci lipidových hydroperoxidů a karbonylových sloučenin produkované oxidačním stresem. GST u helmintů mohou také konjugovat xenobiotika s glutathionem (GSH), nebo se vázat na anthelmintika. U helmintů nebyly dosud identifikované žádné konjugáty anthelmintik s GSH. U *H. contortus* bylo detekováno 28 genů kódujících GST (Matoušková et al. 2016). Dle studie (Kandil et al. 2017) by mohl purifikovaný antigen GST sloužit jako biomarker pro diagnostiku ovčí hemonchózy.



Obrázek 2 Biotransformační dráha flubendazolu (FLU) u *H. contortus*

FLU-R (redukovaný flubendazol), FLU-R-glucoside (glukosid redukovaného flubendazolu)
zdroj: převzato z (Vokrál et al. 2012)

2.3.3 Přenašeče (transportéry) xenobiotik

Přenašeče neboli transportéry xenobiotik, jsou proteiny často umístěné v cytoplazmatické membráně, jejichž hlavní úlohou je transport látek přes lipidovou dvojvrstvu. Transportéry se mohou diferencovat do třech skupin v závislosti na formě využívané energie k transportu. Primární transportéry přijímají energii hydrolýzou ATP, sekundární a terciární transportéry získávají energii z kotransportu nebo antiportu látek, které vytvářejí na membráně jeden (v případě sekundárních) nebo dva (v případě terciárních) gradienty. Transportéry lze rozdělit podle směru transportu látek na tzv. „*uptake*“ transportéry přenášející substráty do buňky, a „*efflux*“ transportéry přenášející substráty z buňky. Podle lokalizace transportérů v buňkách epitelu se dělí na apikální a basolaterální transportéry (Skálová et al. 2017).

2.3.3.1 P-glykoprotein (P-gp)

P-glykoprotein (ABCB1) je primární transportér, který pro svou činnost využívá energii z hydrolýzy ATP. P-gp je významným zástupcem rodiny tzv. ABC transportérů

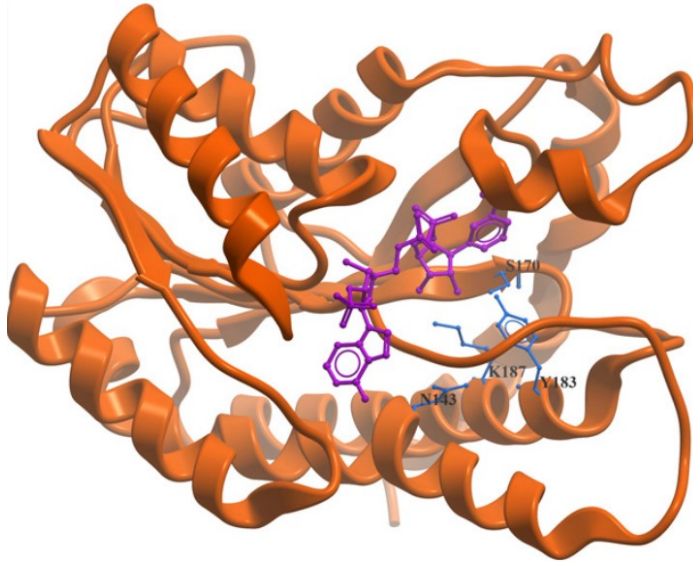
(*ATP Binding Cassette transporter*) (Wilkens 2015). Nachází se převážně na apikální straně epitelálních buněk, kde má klíčový vliv na efflux lipofilních substrátů z cytoplazmatického do extracelulárního prostoru. Strukturálně se skládá z šesti transmembránových domén a dvou domén hydrolyzujících ATP (Skálová et al. 2017).

Funkční ABC transportér byl u helmintů poprvé popsán u *C. elegans* (Lincke et al. 1992). Několik studií prokázalo zapojení ABC transportéru do rezistence hlístic vůči makrocyclickým laktonům, převážně vůči ivermektinu (Lespine et al. 2012; Godoy et al. 2015; Ardelli, Prichard 2013; Bygarski, Prichard, Ardelli 2014).

2.4 Dehydrogenasy/Reduktasy s krátkým řetězcem (SDR)

2.4.1 Charakteristika SDR

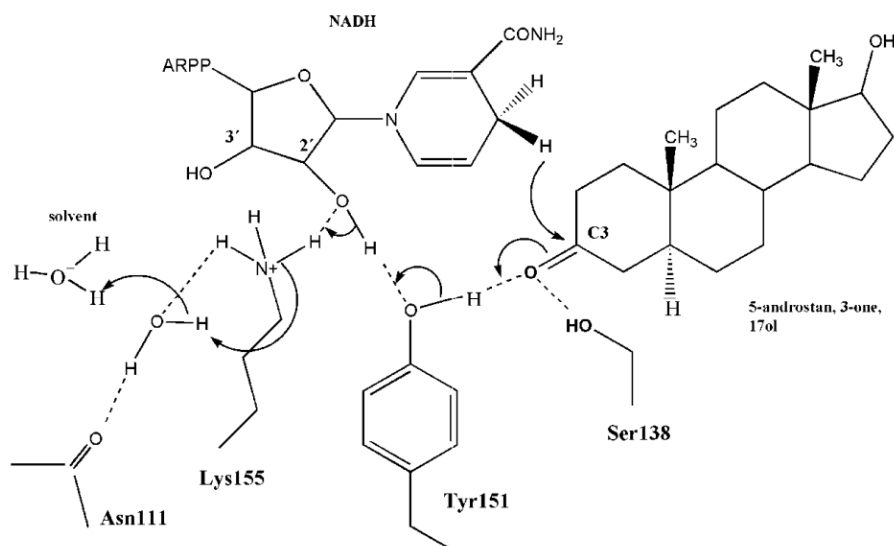
SDR představují jednu z největších nadrodin enzymů a jsou součástí všech živých organismů (Skálová et al. 2017). V roce 2012 bylo v databázi Uniprot přes 160 000 členů nadrodiny SDR (Persson, Kallberg 2013). V roce 2024 je v Uniprot databázi zaznamenáno přes půl milionu členů nadrodiny SDR. Enzymy SDR jsou především NAD(P)(H) -dependentní oxidoreduktasy. SDR se významně podílí na redukci aldehydů a ketonů společně také s aldo-ketoreduktasami (AKR) a dehydrogenasami/reduktasami se středně dlouhým řetězcem (Skálová et al. 2017). Nicméně lze v rámci SDR nadrodiny nalézt i enzymy jako jsou epimerasy či dehydratasy (Persson, Kallberg 2013). Enzymy SDR jsou v organismu zodpovědné za důležité fyziologické procesy, ale současně se podílejí i na metabolizaci určitých xenobiotik např. *o*-chinony, menadion, doxorubicin, daunorubicin, oracin, metyrapon, haloperidol, warfarin a další (Skálová et al. 2017). Eobitockými substráty SDR mohou být např. retinoidy, steroidy, polyoly a mastné kyseliny (Bray, Marsden, Oppermann 2009). Členové nadrodiny SDR ve fylogenetických porovnáních vykazují nízkou párovou sekvenční identitu kolem 20-30 % (Persson, Kallberg 2013)



Obrázek 3 Struktura SDR – lidská kortikosteroidní 11 beta-dehydrogenasa 1

Typická struktura SDR sestávající z beta-skládaného listu vloženého mezi tři alfa šroubovice na každé straně. Purpurovou barvou je označený koenzym a modrou barvou zbytky aktivního místa Asn143, Ser170, Tyr183 a Lys187. Zdroj: převzato z (Persson, Kallberg 2013)

Struktura SDR (viz obr. 3) vykazuje jednodoménový charakter s Rossmannovým motivem, kde centrální β -skládaný list, tvořený 6-7 vlákny, je obklopen třemi α šroubovicemi na každé straně. SDR může tvořit monomery, dimery, nebo tetramery. Sekvence SDR má typicky kolem 250 aminokyselinových zbytků, přičemž některé formy mohou mít až 350 zbytků. Aktivní místo těchto enzymů je často formováno katalytickou tetradou obsahující asparagin (Asn-N), serin (Ser-S), tyrosin (Tyr-Y) a lysin (Lys-K) (N-S-Y-K). Enzymy SDR využívají koenzymu NAD(P)(H), jehož vazebné místo je lokalizováno v N-koncové oblasti (Persson, Kallberg 2013). Na druhé straně strukturně variabilní C-konec zajišťuje vazbu substrátu (Bray, Marsden, Oppermann 2009). Mechanismus SDR enzymů je znázorněn na obr. 4.



Obrázek 4 Reakční mechanismus enzymů SDR ($3\beta/17\beta$ -HSD)

Solvent = rozpouštědlo; NADH = koenzym; 5-androstan, 3-one, 17ol = substrát; Reakce je zahájena přenosem protonu z hydroxylové skupiny tyrosinu na karbonylovou skupinu substrátu. Následuje přenos hybridového aniontu z koenzymu na C3 substrátu. Úlohou serinu v reakci je stabilizace substrátu. Lysin se podílí na tvorbě vodíkové vazby s koenzymem a snižuje pKa tyrosinu za účelem podpory přenosu protonu. Stabilizaci lysinu má za úkol asparagin. Koenzym se váže jako první a jako poslední opouští reakci.; zdroj: převzato z (Filling et al. 2002)

2.4.2 Nomenklatura SDR

V lidském genomu bylo popsáno 48 SDR rodin, které odpovídají 82 genům (Skálová et al. 2017). SDR enzymy byly klasifikovány do několika typů: „Classical“ (C), „Extended“ (E), „Intermediate“ (I), „Divergent“ (D), „Complex“ (X), „Atypical“ (A), všechny ostatní jsou označovány typem „Unassigned“ (U). Nejčastější typy jsou C a E. Každý z těchto typů je charakterizován typově specifickými sekvenčními vzory v místě vázajícím koenzym nebo v aktivním místě (Persson, Kallberg 2013; Persson et al. 2009).

Tabulka 2 Sekvenční motivy kofaktoru a aktivního místa vybraných typů SDR

Typ SDR	Sekvence vazby kofaktoru	Sekvence aktivního místa
„Classical“ (C)	TGxxx[AG]xG	YxxxK
„Extended“ (E)	[ST]GxxGxxG	YxxxK
„Intermediate“ (I)	[GA]xxGxx[GA]	YxxxK
„Divergent“ (D)	GxxxxxSxA	YxxMxxxK
„Complex“ (X)	GGxGxxG	YxxxN

X= jakýkoli aminokyselinový zbytek; Závorky označují alternativy, které mohou být v dané pozici; zdroj (Kavanagh et al. 2008)

V nomenklaturním schématu je každé rodině SDR přiděleno jedinečné číslo. V lidském genomu bylo identifikováno 48 SDR rodin, kterým byla přidělena čísla od 1 do 48, přičemž nejnižší číslo dostávají nejběžnější rodiny. Za číslem rodiny následuje jedno písmeno označující typ SDR, např. SDR1E představuje SDR typ *Extended*. Nomenklaturní schéma je rozšířeno přidáním čísla za typové písmeno s cílem individuálně označit jednotlivé členy každé rodiny SDR, např. SDR1E1. Každá varianta sestříhu, která je odvozená od stejného genu, je odlišena číslem odděleného pomlčkou, např. SDR15C1-1, SDR15C1-2 (Persson et al. 2009).

2.4.3 Zástupci lidských SDR

2.4.3.1 Karbonylreduktasy

Karbonylreduktasa 1 (CBR1, SDR21C1) a karbonylreduktasa 3 (CBR3, SDR21C2) jsou cytosolické enzymy, které katalyzují reakce několika endogenních a exogenních substrátů. Isatin, daunorubicin, doxorubicin, 1,2 naftochinon, fenantrendion, jsou příklady substrátů, které jsou metabolizovány enzymy CBR1 i CBR3. CBR1 dále katalyzuje redukci prostaglandinů (PGE1 a PGE2), menadionu a 1,4 naftochinonu. Tyto enzymy vykazují vysokou sekvenční identitu okolo 70 %. Exprese CBR1 se ve vysokých koncentracích nachází v játrech a ledvinách, ale i v dalších tkáních. Naopak CBR3 se hojně exprimuje např. v pankreatu a ovariích. Byla popsána možná asociace enzymů s kancerogenezí. Je možné, že CBR1 a CBR3 mají proapoptickou aktivitu a

jejich exprese se zvyšuje, nebo naopak snižuje při porovnání exprese v normální a nádorové tkáni (Malatkova, Maser, Wsol 2010).

2.4.3.2 11 β -hydroxysteroiddehydrogenasy (11 β -HSD)

Zástupci enzymů 11 β -hydroxysteroid-dehydrogenas jsou 11 β -HSD1 (SDR26C1) a 11 β -HSD2 (SDR9C3). Enzym 11 β -HSD1 aktivuje inaktivní glukokortikoid kortizon a mění ho na kortizol. Reverzní reakci katalyzuje 11 β -HSD2. Oba tyto enzymy se odlišují v jejich tkáňové distribuci. 11 β -HSD1 je exprimován v játrech, tukové tkáni, plicích a kosterním svalstvu. Naopak 11 β -HSD2 se exprimuje v cílových tkáních aldosteronu např. v ledvinách a tlustém střevě. Oba enzymy se na buněčné úrovni nachází v endoplazmatickém retikulu. 11 β -HSD1 se na rozdíl od 11 β -HSD2 významně podílí na první fázi biotransformace xenobiotik (metyrapon, ketoprofen, 4-nitrobenzaldehyd a 4-nitroacetofenon a dalších). Enzym 11 β -HSD1 je spojen s rozvojem některých onemocnění. Například mutace v genu pro 11 β -HSD1 může způsobovat tzv. kortizon reduktasový deficit (CRD). Syndrom polycystických ovarií, hirsutismus a neplodnost, mohou být symptomy u žen postižených CRD způsobené velmi nízkou koncentrací kortizolu (Škarydová, Wsól 2012).

2.4.3.3 Retinoldehydrogenasy (RDH)

RDH se podílí na syntéze retinových kyselin metabolizací retinolu a retinalu. U člověka bylo identifikováno 11 členů RDH. Reakce retinoidů byly nejvíce studovány v sítnici v rámci zrakového cyklu. RDH5 (SDR9C5) byl první identifikovaný enzym katalyzující syntézu chromoforu 11-*cis*-retinalu. RDH jsou exprimované např. v oku, játrech, nebo ledvinách. Na buněčné úrovni jsou téměř všechny RDH lokalizovány v hladkém endoplazmatickém retikulu. Mutace v genu pro RDH5 může být spojována s onemocněním fundus albipunctatus, vzácnou formou noční slepoty. Narušení metabolismu retinových kyselin v důsledku změn v expresi RDH může být spojováno s kancerogenezí. S ohledem na schopnost RDH metabolizovat látky obsahující karbonylové skupiny lze předpokládat, že by tyto enzymy mohly hrát roli v metabolismu xenobiotik (Škarydová, Wsól 2012).

2.4.4 SDR u *H. contortus*

Původní odhad počtu genů kódujících SDR byl 70 (Matoušková et al. 2016; Laing et al. 2013). Nicméně v plně anotovaném genomu bylo identifikováno 46 genů

kódujících SDR (Štěrbová et al. 2023). Distribuce genů napříč chromozomy *H. contortus* je relativně rovnoměrná, s výjimkou chromozomů 3 a X, které obsahují pouze dvě *sdr* sekvence. Nejvíce *sdr* sekvencí (15) je lokalizováno na chromozomu 4, který je počtem sekvencí následován chromozomy 2 a 5 (10 a 9 sekvencí). Téměř ve všech čtyřiceti šesti *sdr* sekvencích zkoumaných v rámci genomu *H. contortus* byl nalezen klasický motiv (C) TGxxxGxG vazebného místa pro kofaktor, kromě šesti sekvencí se záměnami v aminokyselinovém složení tohoto motivu. Naopak vazebné místo pro kofaktor *sdr7* (*HCON_00097820*) koresponduje s motivem E (TGADGTIG) viz tab. č.2 (Štěrbová et al. 2023).

Studie (Štěrbová et al. 2023) se dále zabývala expresí *sdr* v různých vývojových stádiích kmenů *H. contortus* citlivých a rezistentních k benzimidazolovým preparátům. Výzkum identifikoval různou míru exprese *sdr* v závislosti na vývojovém stádiu v rámci jednoho kmene, ale i mezi kmeny. U vajíček, larev a dospělých jedinců se výrazně odlišuje relativní exprese jednotlivých *sdr*. Nejvíce se ve vajíčkách transkribují *sdr6* (*HCON_00131840*), *sdr14* (*HCON_00023910*), a *sdr18* (*HCON_00108480*), v larválním stádiu dominují *sdr1* (*HCON_00081410*), *sdr3* (*HCON_00119730*), *sdr18* (*HCON_00108480*) a dospělí jedinci vykazují nejvyšší expresi *sdr3* (*HCON_00119730*), *sdr5* (*HCON_00163110*) a *sdr18* (*HCON_00108480*). V expresi *sdr* hraje také roli pohlaví dospělců. *Sdr5* se exprimuje více u samců a *sdr18* u samic. Celkově dochází k nejvyšší expresi *sdr* u volně žijících larev.

Srovnání exprese *sdr* mezi citlivými a rezistentními kmeny *H. contortus* vůči benzimidazolovým preparátům odhalilo několik *sdr* se změněnou expresí u rezistentního kmene. Konkrétně *sdr1*, *sdr12* (*HCON_00049110*), *sdr13* (*HCON_00015620*), *sdr16* (*HCON_00062110*) by mohly souviset s lékovou rezistencí, protože exprese těchto *sdr* je konzistentně zvýšena u rezistentních kmenů *H. contortus* (Štěrbová et al. 2023).

3 Cíl práce

Cílem teoretické části této diplomové práce je provést literární rešerši, popsat problematiku rezistence na léčbu onemocnění způsobené parazitickou hlísticí *Haemonchus contortus* a popsat enzymy dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) podílející se na biotransformaci anthelmintických léčiv.

Cílem experimentální části této práce je naklonovat plasmid obsahující kódující úsek genu vybrané dehydrogenasy/reduktasy (*sdr12*) a izolovat rekombinantní protein, který je kódovaný tímto genem. Práce vyžaduje amplifikaci genu metodou PCR, ligaci genu do klonovacího a expresního vektoru, transformaci buněk *E. coli* zaligovanými plasmidy, izolaci plasmidů, kontrolu ligace restrikcí štěpením, sekvenování zaligovaných plasmidů, ověřování produktů reakcí agarosovou elektroforézou, izolaci exprimovaného proteinu a detekci purifikovaného proteinu metodou western blot.

4 Experimentální část

4.1 Použitý materiál a technické vybavení

4.1.1 Biologický materiál, chemikálie a reagensie

- Akrylamid (AA) a Bis AA – Sigma-Aldrich
- Agarosa – Serva
- Ampicilin – Duchefa
- APS – Lachema N.P. Brno
- cDNA – získaná z izolované RNA dospělců *H. contortus* reverzní transkripcí
- dNTP – Eurogentec
- DTT – Sigma-Aldrich
- ECL Prime Western Blotting detection reagent – Amersham
- *E.coli* BL21 – Novagen®
- *E.coli* JM109 – Promega
- EZBlue™ gel staining reagent
- IPTG – Promega
- Isobutanol – Sigma-Aldrich
- Lihometanol – Sigma-Aldrich
- Milli-Q® ultračistá voda/redestilovaná voda
- Pracovní roztok C (BCA metoda): Roztok A (NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1 M NaOH + roztok B (4% CuSO₄·6 H₂O) v poměru 50:1
- Primární protilátka (králíčí) – Anti-6xHis tag (1:1000) – Abcam
- Primery pro *sdr12* navržené doc. Ing. Petrou Matouškovou, Ph.D. - Generi Biotech
- Primery pro sekvenaci pUC/M13 – Promega
- Primery pro sekvenaci T7 – Addgene
- SDS – BDH chemicals, Lth.
- Sekundární protilátka (kozí) – Anti-Rabbit (1:10 000) – Abcam
- Skim Milk Powder – Sigma-Aldrich
- TEMED – Sigma-Aldrich

- Vektor pGEM[®]-T Easy – Promega
- Vektor pET 22b(+) – Novagen[®]
- X-Gal – Promega

4.1.2 Markery, média a a pufr

- Blotovací pufr – 25mM Tris, 192 mM glycin, redestilovaná voda, methanol
- Elektrodotový pufr – glycin, Tris, SDS, redestilovaná voda, pH 8,3
- Draselno-fosfátový pufr (pH 7,4)
- LB médium (*Luria-Bertani*) – VWR Biochemicals
- Lyzační pufr – 50 mM Tris/HCl pH7,4, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 40 mM β-glycerolfosfát, 50 mM fluorid sodný, 10 mM pyrofosfát sodný, 2 mM dithiotreitol, 200 μM vanadičnan sodný, H₂O, směs inhibitorů (Sigma-Aldrich), 100 mM fenylmethansulfonylfluorid
- Nanášecí barva – Loading dye (6x) – New England Biolabs
- SOC medium – Invitrogen
- SYBR Safe DNA Gel Stain – Thermo Fisher Scientific
- TAE pufr – 40 mM Tris, 20 mM kyselina octová, 1 mM EDTA, dH₂O
- TBST pufr – 150 mM NaCl, redestilovaná H₂O, Tween 20, 0,1 M Tris pufr pH 8,0
- Tris-HCl pufr – 0,5 M (pH 6,8) a 1,5 M (pH 8,8)
- Velikostní marker – DNA ladder 1 kb – New England Biolabs
- 4x SDS vzorkový pufr – 200mM Tris/HCl pH 6,8; 40% glycerol; 6% SDS; 0,2M DTT, 0,1g bromfenolová modř, redestilovaná H₂O
- Marker pro SDS-PAGE – Sigma-Aldrich

4.1.3 Enzymy

- OneTaq[®] quick-load DNA polymerasa – New England Biolabs
- Restrikční endonukleasy *Xho*I, *Nde*I – New England Biolabs
- T4 DNA ligasa – Jena Bioscience

4.1.4 Kity

- Amicon[®] Ultra-4 Centrifugal Filter Devices

- BugBuster[®] Protein Extraction Reagent.
- Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit – PCR Clean Up Protocol
- HisPur[™] Ni-NTA Spin Columns
- NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-Up
- NucleoSpin[®] Plasmid/Plasmid (NoLid)
- Pierce[™] BCA Protein Assay Kits
- ZymoPURE[™] II Plasmid Midiprep

4.1.5 Technické vybavení a přístroje

- Automatické pipety – Research Plus, Eppendorf
- Blotovací zařízení – BioRad Trans Blot Turbo
- Centrifuga – Biofuge stratus Heraeus, Thermo scientific
- Centrifuga – 5415 D, Eppendorf
- Centrifuga – 5810 R, Eppendorf
- Elektroforetický systém Owl[™] EasyCast[™] B1A – Thermo Scientific[™]
- Hlubokomrazící boxy – Vxe Series Jouan, Thermo Fisher Scientific
- Minicentrifuga – Sprout, Heathrow Scientific
- Mini-PROTEAN[®] Tetra Handcast System – BioRad
- Mikrovlnná trouba, Zanussi
- Laboratorní váha – M-Prove, Sartorius
- PCR termocyklér –Biometra TAdvanced, Analytik Jena
- Spektrofotometr – Biochrom Ltd. Libra S6
- Spektrofotometr – NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific
- Tecan Spark[®] - Multimode Microplate Reader
- Termoblok – Thermomixer comfort, Eppendorf
- Třepačka – Duomax 1030, Heidolph
- Třepavý inkubátor – NB-205, N-Biotek
- Zobrazovací systém – Uvitec Alliance Q9 Advanced – Baria
- Vortex – Vortex V-1, BioSan

- Vodní lázeň s termostatem – Memmer
- Zdroj napětí – PowerPac Basic, BioRad

4.2 Metodické postupy

4.2.1 Příprava DNA insertu

Před klonováním DNA je nezbytné amplifikovat gen zájmu, ověřit a přečistit vzniklý produkt. K amplifikaci byla použita metoda PCR. Vzniklý PCR produkt, který byl později použit jako insert do vektoru, se ověřil agarosovou elektroforézou. Následně se PCR produkt přečistil komerčním kitem.

4.2.1.1 Amplifikace genu kódujícího vybranou SDR

Amplifikace genu *sdr12* (*HCON_00049110*) byla provedena metodou PCR. Templátem DNA polymerasy byla již připravená komplementární DNA (cDNA), která byla získaná z RNA dospělců citlivého kmene (ISE) *H. contortus* metodou reverzní transkripce. RNA byla extrahována fenol-chloroformovou metodou a ošetřena DNAsou. Primery pro amplifikaci byly navrženy doc. Ing. Petrou Matouškovou, Ph.D. Primery obsahují místa pro štěpení restrikcími endonukleasami (RE) *NdeI* a *XhoI*. Sekvence reverzního primeru byla navíc prodloužena o místo tzv. „*TEV site*“. Na C-konci exprimovaného proteinu vznikne histidinová značka tzv. „*His tag*“, která bude odštěpitelná TEV proteasou (ENLYFQ|G). Na začátku každého primeru se nachází tři náhodné nukleotidy.

Tabulka 3 Použité primery pro amplifikaci genu *sdr12* (*HCON_00049110*)

Primer: RE	Nukleotidová sekvence primeru
F: <i>NdeI</i>	TTG CA T ATG TTT AAT ACA GGG AAG TTC
R: <i>XhoI</i>	TAT C TC GAG <i>GCC TTG GAA GTA CAG GTT CTC CAA TTT ACT CTT GTT C</i>

F: přední „*forward*“ primer, R: zadní „*reverse*“ primer, RE: restrikcí endonukleasa. V sekvenci primeru je podtržením a symbolem „|“ vyznačeno místo štěpení příslušnými restrikcími endonukleasami. Kurzívou je vyznačeno „*TEV site*“. Tučně je značena sekvence *sdr12*.

K provedení PCR byla připravena reakční směs dle tab. 4 do 0,2 ml zkumavek určených pro tuto metodu. Směs se promíchala vortexováním a stočila na minicentrifuze bez enzymu DNA polymerasy. Enzym se pipetoval do reakční směsi jako poslední. Po přidání DNA polymerasy se směs jemně promíchala pipetovací špičkou. Připravený vzorek se umístil do termocykléru, kde probíhala PCR reakce za podmínek uvedených v tab. 5.

Tabulka 4 PCR směs

Komponenta	Objem (μ l)	Výsledná koncentrace
5x pufr pro OneTaq quick-load DNA polymerasu	5	1x
10 mM dNTPs	0,5	200 μ M
10 μM F primer	0,5	0,2 μ M
10 μM R primer	0,5	0,2 μ M
Templát – cDNA	1	<1,000 ng/ μ l
OneTaq quick-load DNA polymerasa	0,125	1,25 U
PCR grade H₂O	Doplnit do objemu 25	-

Tabulka 5 Podmínky PCR reakce pro OneTaq quick-load DNA polymerasu

Fáze	Teplota ($^{\circ}$ C)	Čas (s)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	30	1
Denaturace	94	15	30
Annealing	55	20	
Elongace	68	60	
Závěrečná elongace	68	300	1
Chlazení	16	∞	∞

4.2.1.2 Agarosová elektroforéza

K identifikaci amplifikovaných úseků DNA byla použita agarosová elektroforéza v horizontálním uspořádání. Nejprve byl připraven 1% agarosový gel v Erlenmeyerově baňce smícháním 0,4 g agarosy s 40 ml 1x TAE pufru. Množství agarosy a pufru bylo upraveno dle použité aparatury. Vytvořená směs se převarila v mikrovlnné troubě. Zchladlá směs se nalila do připravené aparatury s vloženým hřebínkem. Gel se nechal ztuhnout při laboratorní teplotě. Poté se elektroforetická vana doplnila 1x TAE pufrem tak, aby byl gel zcela ponořený. Vyndáním hřebínku z gelu vznikla místa pro aplikaci vzorků a velikostního markeru (*DNA ladder*). Do jedné jamky se nanesly 3 μ l 1 kbp velikostního markeru. Jednotlivé vzorky se v objemu 5 μ l smíchaly s nanášecí barvou (*loading dye*) na parafilmu a aplikovaly se do jamek gelu. Nanášecí barva obsahovala nanášecí pufr a *DNA stain*. Nanášecí barva zajistila usazení jednotlivých vzorků do jamek v gelu a zároveň jejich následnou vizualizaci. Separace probíhala 30 minut při napětí 90 V. Po elektroforéze se pořídila fotografie gelu zobrazovacím systémem Uvitec.

4.2.1.3 Přečištění PCR produktu a měření koncentrace

K přečištění produktu PCR byl použit komerční kit Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (PCR Clean Up Protocol) od firmy Geneaid Biotech Ltd., který obsahuje potřebné reagenty, kolony a zkumavky. Bylo postupováno dle přiloženého návodu.

V 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavce se v poměru 1:5 smíchal PCR produkt s DF pufrem, který obsahoval chaotropní soli guanidinu umožňující adsorbci DNA na silikátový povrch kolony. Směs se promíchala vortexováním. Připravená směs se napipetovala do kolony umístěné ve sběrné zkumavce. Následně se provedla centrifugace po dobu 30 s. Všechny centrifugační kroky v tomto postupu se prováděly při 14 000 x g. Ze sběrné zkumavky se odstranil pufr, a pak se do ní umístila kolona zpět. V této fázi se DNA navázala na kolonu. V dalším kroku se kolona promyla pufrem s přidáním ethanolu o objemu 600 μ l. Kolona se inkubovala s promývacím pufrem 1 minutu. Všechny inkubační doby v tomto postupu probíhaly při laboratorní teplotě. Následně se provedla centrifugace po dobu 30 s. Ze sběrné zkumavky se odstranil pufr, a pak se do ní umístila kolona zpět. Matrix kolony se vysušil centrifugací po dobu 3 min. Kolona se vložila do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a do středu matrixu kolony se aplikovalo 20 μ l elučního pufru. Kompletní absorbce elučního pufru

se zajistila inkubací kolony s naneseným pufrem po dobu 2 min. Po poslední 2 min centrifugaci se v 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavce nacházela eluovaná DNA.

U přečištěné DNA byla změřena koncentrace a zjištěna čistota na spektrofotometru NanoDrop. Nejdříve se změřil blank (destilovaná voda) o objemu 2 μ l a poté vzorek o stejném objemu při třech vlnových délkách: 260 nm, 280 nm a 230 nm. Výsledkem měření přístrojem byla koncentrace DNA v jednotkách ng/ μ l, absorbance při uvedených vlnových délkách a poměry absorbancí: 260/280 nm a 260/230 nm. Poměry absorbancí informovaly o čistotě DNA a možné přítomnosti kontaminujících látek (proteinů, fenolů) ve vzorku, které absorbují při vlnových délkách 280 nm a 230 nm. Čistá DNA má absorpční maximum při 260 nm.

4.2.2 Klonování

V první fázi bylo provedeno TA klonování za účasti klonovacího vektoru pGEM[®]-T Easy. Tento vektor obsahuje převisy tyminů, které se na základě komplementarity bází vážou na adeniny 3' konce insertu nasyntetizované OneTaq quick-load DNA polymerasou v rámci PCR reakce. Insert byl z klonovacího vektoru vyštěpen a naklonován tradiční metodou (známou též jako subklonování) za účasti vektoru pET 22b(+), který umožnil expresi proteinu.

4.2.2.1 Ligace insertu do klonovacího vektoru

K ligaci insertu byl použit klonovací vektor (plasmid) pGEM[®]-T Easy o velikosti 3015 bp. Ligační směs se připravila dle tab. 6. do 0,5 ml zkumavky v poměru 3:1 (insert:vektor). Jednotlivé komponenty se před použitím promíchaly. Vektor s kontrolním insertem se před použitím krátce centrifugovaly a ligační pufr se vortexoval. Připravená ligační směs se promíchala jemným pipetováním a inkubovala se 1 hodinu při laboratorní teplotě.

Tabulka 6 Ligační směs pro vektor pGEM®-T Easy

Komponenta	Standardní reakce (μl)	Pozitivní kontrola (μl)	Negativní kontrola (μl)
2x rapid ligační pufr pro T4 DNA ligasu	5	5	5
pGEM®-T Easy vektor (50 ng)	1	1	1
PCR produkt (insert)	X	-	-
Kontrolní insert	-	2	-
T4 DNA ligasa	1	1	1
Deionizovaná voda doplněná do celkového objemu:	10	10	10

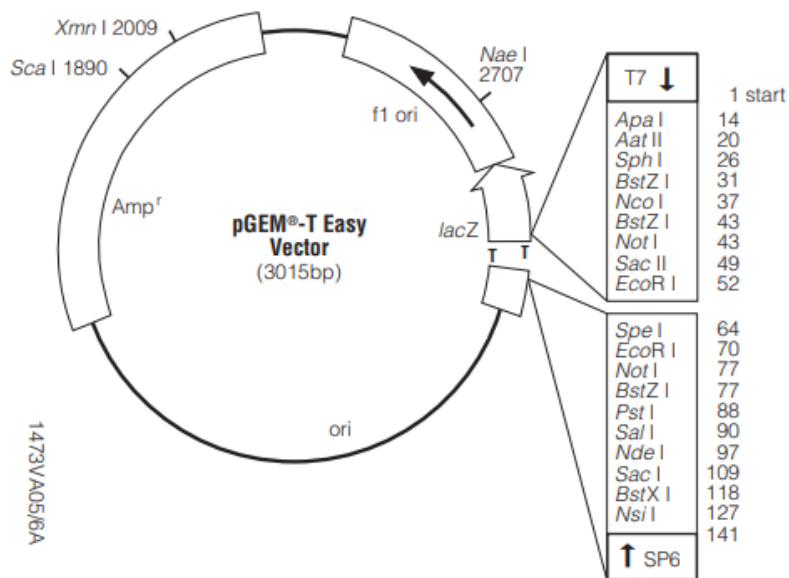
X= objem PCR produktu (insertu) vypočítaný na základě jeho změřené koncentrace a použitého poměru

Množství insertu se vypočítalo na dostupném kalkulátoru na webové stránce <https://labguide.cz/vypocty/ligace-inzertu-do-vektoru/>.

$$\text{Množství insertu (ng)} = \frac{\text{množství vektoru (ng)} \times \text{velikost insertu (kb)}}{\text{velikost vektoru (kb)}}$$

Rovnice 1 Výpočet množství insertu k ligaci do vektoru

Zdroj: LabGuide [online] [cit. 2024-03-26]



Obrázek 5 Klonovací vektor pGEM[®]-T Easy

Zdroj: Promega [online] [cit. 2024-03-26]

4.2.2.2 Transformace kompetentních buněk *E.coli* JM109

Připravené ligační reakce se krátce promíchaly centrifugací. Do třech 1,5 ml sterilních zkumavek umístěných na ledu se napipetovaly 2 µl příslušné ligační reakce. Do další zkumavky se připravila kontrolní transformační reakce s 0,1 ng neštěpeného plasmidu (jiného než pGEM[®]-T Easy). Kompetentní buňky JM109 se umístily do ledové lázně na 5 min a promíchaly se krouživými pohyby pipetovací špičkou. K ligačním reakcím se přidalo 50 µl buněk a k neštěpenému plasmidu 100 µl buněk. Vzniklé směsi se promíchaly krouživými pohyby pipetovací špičkou a inkubovaly se 20 min na ledu. Následně se provedl teplotní šok ve vodní lázni o teplotě 42 °C trvající 45-50 s. Teplotní šok narušil cytoplazmatickou membránu, a umožnil tak DNA prostoupit do buněk. Ihned po vyndání z lázně se vzorek umístil zpět na led na 2 min. Ke směsím obsahující ligační reakce se přidalo 950 µl tekutého SOC média (*super optimal broth with catabolite repression medium*) a do zkumavky s kontrolou transformace se přidalo 900 µl SOC média. Zkumavky se nechaly inkubovat při 37 °C za intenzivního třepání (150 rpm) po dobu 1,5 h. V této fázi docházelo k regeneraci cytoplazmatické membrány a k množení buněk.

Na Petriho misky obsahující pevné LB médium (*Luria-Bertani medium*), ampicilin (100µg/ml), IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalaktopyranosid - 0,5 mM) a X-Gal

(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid - 80 $\mu\text{g/ml}$) se naněly vzorky v duplikátu tak, aby byl každý naněsěn ve dvou rozdílných množstvích (25 a 50 μl) z důvodu různé účinnosti ligace a transformace. Vzorky se naočkovaly na plotnu plastovou zahnutou tyčinkou za přítomnosti zažehnutého kahanu. Takto připravené plotny se inkubovaly při 37 °C přes noc. Jelikož vektor pGEM[®]-T Easy obsahuje gen pro rezistenci vůči ampicilinu obsaženém v kultivačním médiu, bylo tak možné vyselektovat buňky *E. coli*, které tento vektor přijaly. Bez selekčního tlaku mají buňky tendenci ztrácet plasmid během buněčného dělení.

Za ideálních podmínek na plotně s pozitivní kontrolou narostly bílé kolonie a na plotně s negativní kontrolou narostly modré kolonie. Byla také vyhodnocena kontrola účinnosti transformace na příslušných plotnách s kontrolní reakcí. Buňky s deklarovanou účinností $\geq 1 \times 10^8$ cfu/ μg DNA poskytovaly kolem 100 kolonií. Poté byla provedena identifikace bílých kolonií na plotnách se standardní ligační reakcí.

Modro-bílý screening kolonií je založen na schopnosti enzymu β -galaktosidasy přeměnit substrát X-Gal, který je obsažen v kultivační půdě, na modrý produkt. Dojde-li k úspěšné ligaci insertu do vektoru, inaktivuje se oblast vektoru *lacZ* kódující α -peptid β -galaktosidasy a nedojde k metabolizaci substrátu (vznik bílých kolonií). β -galaktosidasa je enzymaticky aktivní pouze v případě, že je kompletní a obsahuje oba své peptidy (α -peptid a ω -peptid). V transformovaných buňkách dochází k procesu α -komplementace a obnovení enzymatické aktivity spojením α -peptidu exprimovaným vektorem s ω -peptidem exprimovaným *E. coli* (vznik modrých kolonií). IPTG indukuje transkripci genu pro β -galaktosidasu, inaktivací *lac* represoru v regulační oblasti *lac* operonu. (Juers, Matthews, Huber 2012; Gomes, Monteiro, Mergulhão 2020) (Promega [online] [cit. 2024-03-26], Martin [online] [cit. 2024-03-26])

4.2.2.3 Identifikace klonů – PCR kolonií (colony PCR)

PCR kolonií (colony PCR) je nezbytná provést v rámci ověření úspěšné ligace insertu do vektoru. Tato metoda využívá jako templát přímo kolonie *E. coli*. Dle počtu vzorků se připravil mastermix dle tab. 7. Narostlé kolonie se na plastovém krytu plotny označily číslem, aby nedošlo k jejich záměně. Podle počtu označených kolonií se připravil stejný počet 0,2 ml zkumavek, do kterých se napipetovalo 10 μl ddH₂O. Pipetovací špičkou se naněslo malé množství kolonie do připravených a označených zkumavek s ddH₂O, tudíž každé zkumavce odpovídala 1 kolonie. Suspenze se vložila do

termocykléru na příslušný colony PCR program. Templát se zde denaturuje při 95 °C po dobu 10 min. Do každé zkumavky s templátem se přidalo 10 µl připraveného mastermixu. Směs se promíchala a vložila opět do termocykléru. Použité F a R primery umožňují amplifikaci oblasti plasmidu včetně zaklonovaného insertu.

Tabulka 7 Směs pro PCR kolonií

Komponenta	Objem (µl)
5x reakční pufr s obsahem nanášecího pufru	4
dNTPs	0,5
Primer F+R	0,5 + 0,5
OneTaq quick-load DNA polymerasa	0,1
H₂O	4,4
Templát (kolonie v ddH₂O)	10
Celkový objem	20

V dalším kroku se ověřil PCR produkt agarosovou elektroforézou viz kapitola 4.2.1.2. V případě agarosové elektroforézy po PCR kolonií se jednotlivé vzorky nemusely mísit s nanášecí barvou (*loading dye*) před aplikací do jamek gelu, protože mastermix již obsahoval nanášecí a reakční pufr. SYBR Safe, barvivo sloužící k vizualizaci DNA, bylo přidáno v rámci přípravy gelu do směsi s agarosou a TAE pufrem.

4.2.2.4 Izolace plasmidu

K izolaci zaligovaného plasmidu *pGEM[®]-T Easy* byl použit komerční kit NucleoSpin[®] Plasmid/Plasmid (NoLid) - miniprep od firmy MACHEREY-NAGEL, který obsahuje potřebné reagenty, kolony a zkumavky. Bylo postupováno dle přiloženého návodu.

Vybraná kolonie k izolaci plasmidu se zaočkovala do 3 ml tekutého, kultivačního LB média s ampicilinem (100µg/ml). Médium se zaočkovanou kolonií se inkubovalo při 37 °C za konstantního třepání (200-250 rpm) přes noc.

Připravená LB kultura *E. coli* se centrifugovala po dobu 30 s a vzniklý supernatant se odstranil. Všechny centrifugační kroky tohoto postupu byly prováděny při 11 000 x g a při laboratorní teplotě. Přidáním resuspenzního pufru A1 o objemu 250

μl a vortexováním došlo k rozpuštění pelety buněk. Dále byl do směsi přidán lyzační pufr A2 o objemu 250 μl. Směs se promíchala pouhým převrácením zkumavky (6–8x) a inkubovala se po dobu 5 min. Všechny inkubace v tomto postupu probíhaly při laboratorní teplotě. Po inkubaci se ke směsi napipetovalo 300 μl neutralizačního pufru A3 a opět byla směs promíchána několikanásobným převrácením zkumavky, dokud nedošlo k úplnému odbarvení vzorků. Vzorky se centrifugovaly po dobu cca 5-10 min do doby, než byl supernatant zcela čistý. Supernatant byl napipetován v maximálním objemu 700 μl do silikátové kolony, která byla umístěná ve sběrné zkumavce. Byla provedena další centrifugace po dobu 1 min a vzniklá kapalina ve sběrné zkumavce byla odstraněna. Tento krok byl opakován, dokud nebyl na kolonu aplikován veškerý zbývající lyzát.

Na kolonu se dále aplikovalo 600 μl promývacího pufru A4 s etanolem. Kolona se centrifugovala po dobu 1 min a vzniklá kapalina byla odstraněna ze sběrné zkumavky. Vysušení matrixu kolony se provedlo centrifugací po dobu 2 min. Suchá kolona byla umístěna do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a na střed matrixu kolony se aplikovalo 50 μl elučního pufru AE. Eluční pufr se absorboval na kolonu během inkubace, která trvala 1 min. DNA se eluovala do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky poslední centrifugací trvající 1 min.

Po izolaci byla provedena agarosová elektroforéza a změřena koncentrace a zjištěna čistota plasmidu na spektrofotometru NanoDrop viz kapitola 4.2.1.3.

4.2.2.5 *Ověření úspěšnosti ligace vektoru sekvenací*

Úspěšné zaligování insertu do vektoru se ověřilo sekvenováním Sangerovou metodou. Za tímto účelem byly vzorky odesílány do firmy Eurofins Genomics. Na zkumavky, do kterých se pipetovaly vzorky, se nalepily štítky s identifikačním číslem a čárovým kódem, aby nedošlo k jejich záměně. Pro jeden vzorek se připravily 2 zkumavky. V první byl smíchán plasmid s F primerem a v druhé plasmid s R primerem. Vzorky se připravily smícháním 5 μl ředěného plasmidu s 5 μl příslušného F a R primeru. Plasmid byl ředěný dle změřené koncentrace tak, aby výsledná koncentrace zasláná k sekvenaci dosahovala maximálně 100 ng/μl. K ověření pGEM[®]-T Easy se použil pUC/M13 přední a zadní primer.

TA klonování bylo provedeno za účelem ověření vloženého insertu ve vektoru sekvenační metodou, kterou byla zkontrolována potenciálně chybná syntéza insertu

zapříčiněná nedostatečnou hybridizací primeru k templátu. Použitím sekvenačních primerů, nasedajících na molekulu vektoru, bylo možné zkontrolovat koncové úseky insertu určené k nasedání amplifikačních primerů. Vektor pGEM[®]-T Easy také umožnil efektivní přípravu insertu restričním vyštěpením nutným pro ligaci do expresního vektoru.

4.2.2.6 Vyštěpení insertu z klonovacího vektoru

Izolovaný plasmid byl štěpen restričními endonukleasami *XhoI* a *NdeI* dle navržených primerů. Restriční směs byla vytvořena dle tab. 8. a inkubována 2 h při 37 °C, 20 min při 65 °C a 3 min při 80 °C. Připravený vzorek se separoval agarosovou elektroforézou viz kapitola 4.2.1.2.

Tabulka 8 Restriční směs

Komponenta	Objem (μl)
<i>XhoI</i>	2
<i>NdeI</i>	2
Cutsmart pufr	10
Templát (izolovaný plasmid)	10
ddH ₂ O	26
Celkový objem	50

4.2.2.7 Extrakce a přečištění insertu z agarosového gelu

K extrakci a přečištění insertu byl použit komerční kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-Up od firmy MACHEREY-NAGEL, který obsahuje potřebné reagenty, kolony a zkumavky. Bylo postupováno dle přiloženého návodu.

Pod UV lampou se skalpelem vyřízl band z gelu, který obsahuje vyštěpený insert z plasmidu, a umístil se do čisté zkumavky. Dle odhadované váhy gelu se přidalo požadované množství pufru (200 μl NTI pufru na 100 mg agarosového gelu). Gel se rozpustil v pufru inkubací při 50 °C po dobu 5-10 min a průběžným vortexováním. Následovalo navázání DNA na silikátovou kolonu. Připravená směs se napipetovala o maximálním objemu 700 μl do kolony umístěné ve sběrné zkumavce. Kolona se nechala centrifugovat 30 s a vzniklá tekutina ve sběrné zkumavce se odstranila.

Všechny centrifugační kroky v tomto postupu byly provedeny při 11 000 x g. Na kolonu se aplikovalo 700 µl promývacího NT3 pufru. Kolona se centrifugovala 30 s a ze sběrné zkumavky byla odstraněna vzniklá tekutina. Promývací krok byl ještě jednou zopakován. Vysušení matrixu kolony se provedlo centrifugací po dobu 1 min. Suchá kolona byla umístěna do nové 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky a do středu matrixu se aplikovalo 15-30 µl elučního NE pufru. Eluční pufr se absorboval na kolonu během inkubace 1 min při laboratorní teplotě. DNA se eluovala do 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky poslední centrifugací trvající 1 min.

U přečištěné DNA byla změřena její koncentrace a zjištěna čistota na spektrofotometru NanoDrop viz kapitola 4.2.1.3.

4.2.2.8 Ligace insertu do expresního vektoru

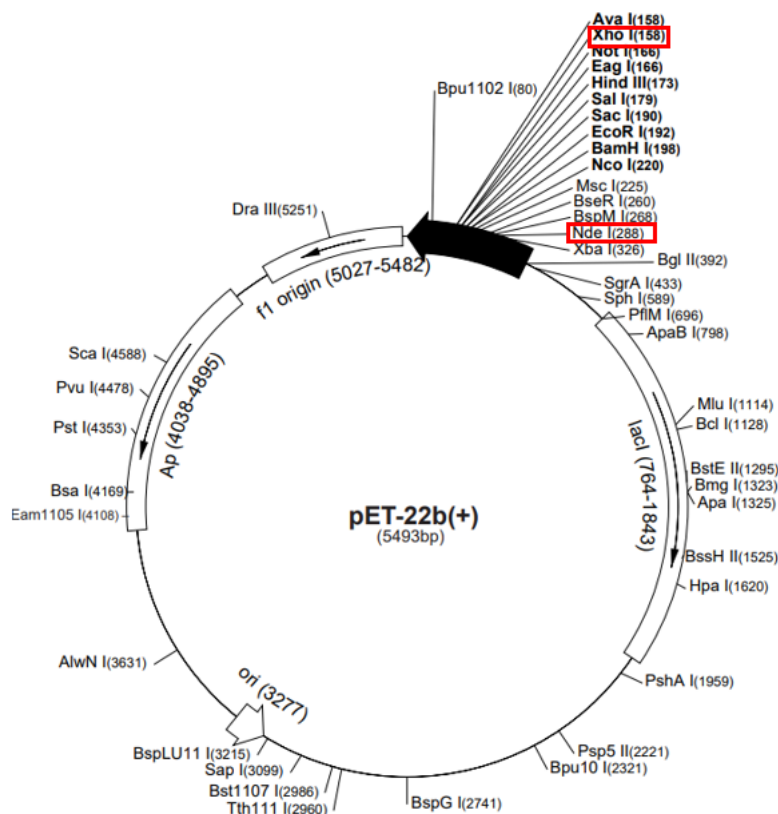
K ligaci insertu byl použit expresní vektor (plasmid) pET-22b(+) o velikosti 5493 bp. Vektor byl před ligací upraven restričním štěpením stejnými endonukleasami jako v případě insertu. Byla vytvořena restriční směs dle tab. 8, kde templátem byl pET-22b(+). Množství insertu potřebného do ligační směsi bylo vypočítáno dle rovnice 1 viz kapitola 4.2.2.1.

Ligační směs se připravila dle tab. 9 do 1,5 ml zkumavek v poměru 3:1 (insert:vektor). DNA ligasa se do směsi přidala jako poslední. Připravená směs se jemně promíchala pipetovací špičkou a nechala se inkubovat při teplotě 16 °C po dobu 2 h až přes noc.

Tabulka 9 Ligační směs pro vektor pET-22b(+)

Komponenta	Standardní reakce (µl)	Kontrola (µl)
10 x ligační pufr	2	2
100 mM DTT	2	2
10 mM ATP	1	1
Štěpený pET-22b(+) (50 ng/µl)	2	2
Štěpený insert (107 ng/µl)	X	-
T4 DNA ligasa	1	1
H₂O bez nukleas doplnit do celkového objemu:	20	20

X= objem insertu vypočítaný na základě jeho změřené koncentrace (107 ng/µl) a použitého poměru viz kapitola 4.2.2.1.



Obrázek 6 Expresní vektor pET-22b(+)

Na obrázku jsou červeným obdélníkem vyznačeny restriční endonukleasy (RE) použité ke štěpení vektoru; Zdroj: Novagen [online] [cit. 2024-03-26]

4.2.2.9 Transformace kompetentních buněk *E. coli* BL21

K transformaci byly použity kompetentní buňky BL21. Do dvou zkumavek se napipetovalo 50 μ l těchto buněk. Do jedné zkumavky se přidaly 2 μ l zaligovaného plasmidu (100 ng) a do druhé zkumavky se přidal stejný objem kontrolního vzorku neobsahující insert pouze štěpený plasmid. Vzorky se nechaly inkubovat na ledu po dobu 30 min. Po inkubaci se provedl teplotní šok ve vodní lázni při teplotě 42 $^{\circ}$ C trvající 10 s. Ihned po vyndání z lázně se vzorky opět umístily na led a nechaly se inkubovat 5 min. Poté se ke vzorkům přidalo 950 μ l SOC média. Vzorky se nechaly inkubovat při teplotě 37 $^{\circ}$ C za intenzivního třepání (200rpm) po dobu 60 min. Následně se vzorky naočkaly na pevné LB médium s ampicilinem (100 μ g/ml) v duplikátu tak,

aby byl každý vzorek nanesen ve dvou rozdílných množstvích (25 a 50 μ l) z důvodu různé účinnosti ligace a transformace. Jelikož vektor pET-22b(+) obsahuje gen pro rezistenci vůči ampicilinu, bylo tak možné vyselektovat buňky *E. coli*, které tento vektor přijaly. Připravené plotny se nechaly inkubovat přes noc při 37 °C.

Pokud na kontrolní plotně nenarostly žádné kolonie, provedlo se v následujících dnech ověření přítomnosti plasmidu v narostlých koloniích na plotně se vzorkem plasmidu pomocí colony PCR s T7 promotorovým a T7 terminačním primerem viz kapitola 4.2.2.3.

4.2.2.10 Izolace a purifikace plasmidu

K izolaci zaligovaného plasmidu pET-22b(+) ve vysoké koncentraci byl použit komerční kit ZymoPURE™ II Plasmid Midiprep od firmy Zymo Research. Bylo postupováno dle přiloženého návodu.

Kultura v tekutém LB médiu, připravená v kapitole 4.2.2.9, byla druhý den centrifugována při 2 000 x g po dobu 5 min. Vzniklý supernatant byl odstraněn. Kultura se resuspendovala v 8 ml P1 pufru vortexováním. Poté byl přidán lyzační P2 pufr o objemu taktéž 8 ml. Směs se promíchala pouhým převrácením zkumavky (5–6x) a nechala se inkubovat při laboratorní teplotě 2-3 min. Následně byl přidán lyzační P3 pufr a opět se směs promíchala několikanásobným převrácením zkumavky. Lyzovaná směs se nanasla na filtr stříkačky a nechala se 5-8 min odstát. Do stříkačky se umístil píst, jehož stlačením se lyzát přefiltroval do zkumavky typu Falcon o objemu 50 ml. Ke vzniklému filtrátu se přidal pufr vázající DNA o objemu 8 ml a vzniklá směs se promíchala převrácením zkumavky (cca 8x).

Do nové 50 ml zkumavky typu Falcon byla vložena kolona. Na kolonu se nanaslo 10 ml filtrátu a centrifugovala se při 500 x g po dobu 2 min. Centrifugační postup se opakoval, dokud nebylo nanaseno na kolonu kompletní množství vzorku. Ze zkumavky se po každém stočení odstranila vzniklá tekutina. Na kolonu se aplikoval promývací pufr č. 1 o objemu 2 ml. Provedla se centrifugace při 500 x g po dobu 5 min. Promývací proces se opakoval ještě 2x s pufrem č. 2. Promytá kolona se umístila do mikrozukavky, která se centrifugovala při 11 000 x g po dobu 2 min za účelem kompletního odstranění promývacího pufru. Následně se na střed matrixu kolony, umístěné v nové 1,5 ml zkumavce, napipetoval eluční pufr o objemu 200 μ l. Kolona se

nechala 2 min inkubovat při laboratorní teplotě a poté se centrifugovala 1 min při 11 000 x g.

Po izolaci byla změřena koncentrace a zjištěna čistota plasmidu na spektrofotometru NanoDrop. Úspěšnost ligace byla ověřena restričním štěpením izolovaného plasmidu a agarosovou elektroforézou viz kapitola 4.2.2.6. Úspěšnost ligace vektoru pET-22b(+) se ověřila také sekvenací viz kapitola 4.2.2.5 za použití T7 promotorového a T7 terminačního primeru.

4.2.3 Izolace rekombinantního proteinu

Rekombinantní protein se exprimoval v transformovaných buňkách BL21 viz kapitola 4.2.2.9. Kolonie se zaligovaným plasmidem se naočkovala do tekutého LB média s ampicilinem (100µg/ml) o objemu 50 ml. Buněčná suspenze se umístila do třepavého inkubátoru na 180 rpm a nechala se inkubovat při 37 °C. Inkubace byla průběžně kontrolována. V době, kdy optická hustota vzorku měřeného při vlnové délce 600 nm (OD600) dosáhla rozmezí hodnot 0,4-0,8 se z buněčné kultury odebral kontrolní vzorek do nové zkumavky. Do původní buněčné kultury se přidalo IPTG (0,4 mM) a pokračovalo se v inkubaci při teplotě 37 °C, 180 rpm po dobu 3-5 h.

Z takto připravených buněčných kultur byl izolován rekombinantní protein kitem BugBuster[®] Protein Extraction Reagent. Bylo postupováno dle přiloženého návodu.

Tekuté médium s buněčnou kulturou se centrifugovalo 10 min při 10 000 x g. Vzniklý supernatant se odstranil a vytvořený pelet na dně zkumavky se rozpustil v lyzačním BugBuster HT reagentu o objemu 2,5 ml na 50 ml buněčné kultury. Buněčná suspenze se inkubovala 10-20 min při laboratorní teplotě na třepačce. Poté byla provedena centrifugace při 4 °C a 16 000 x g po dobu 20 min za účelem odstranění nerozpustných buněčných zbytků. Supernatant, ve kterém se nacházel izolovaný protein, se přepipetoval do nové zkumavky. Ze supernatantu se odebralo 25-50 µl do nové zkumavky, do které byl přidán 4x SDS (dodecylsírán sodný) sample pufr o stejném objemu. Vzorek proteinů s pufrům se nechal 3 min denaturovat při 85 °C. Denaturovaný vzorek a nativní proteinový izolát se uskladnily při teplotě -20 °C.

Denaturovaný vzorek proteinů byl v následujícím postupu použit k separaci elektroforézou na polyakrylamidovém gelu (SDS-PAGE). U nativního proteinového extraktu bylo provedeno přečistění – purifikace a odsolení.

4.2.4 Purifikace a odsolení rekombinantního proteinu

K purifikaci (čištění) proteinu, připraveného v kapitole 4.2.3, byl použit komerční kit HisPur™ Ni-NTA Spin Columns. Kolony obsažené v kitu umožňují purifikaci proteinů značených histidinovou značkou pomocí afinitní chromatografie s imobilizovaným kovem (IMAC). Bylo postupováno dle přiloženého návodu.

Proteinový extrakt se smíchal se stejným objemem ekvilibračního pufru (20 mM Na₃PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol). Vzorek se připravil tak, aby výsledný objem byl ≥ 2 objemům obsažené pryskyřice v koloně a zároveň se nepřekročila její vazebná kapacita. Z kolony, vytemperované na laboratorní teplotu, bylo odstraněno spodní poutko a poté se umístila do centrifugační zkumavky. Centrifugací kolony se odstranil skladovací pufr. Všechny centrifugační kroky v tomto postupu probíhaly při 700 x g po dobu 2 min.

Na kolonu, umístěnou v centrifugační zkumavce, se aplikoval ekvilibrační pufr o dvojnásobném objemu obsažené pryskyřice. Následně se kolona centrifugovala a byla na ní umístěna spodní zátka. Na kolonu, umístěnou v čisté centrifugační zkumavce, se aplikoval připravený vzorek a poté se umístila na 30 min na třepačku. Spodní zátka se odstranila, kolona se nechala centrifugovat a vzniklá frakce se uchovala.

Na kolonu, umístěnou v nové centrifugační zkumavce, se aplikoval promývací pufr (20 mM Na₃PO₄, 300 mM NaCl, 25 mM imidazol) o dvojnásobném objemu obsažené pryskyřice a nechala se centrifugovat. Promývací krok se provedl 5x, přičemž promytá frakce se sbírala v každém kroku do jiné centrifugační zkumavky. Na kolonu, umístěnou v nové centrifugační zkumavce, se poté aplikoval eluční pufr s vysokou koncentrací imidazolu (20 mM Na₃PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol) o stejném objemu obsažené pryskyřice. Centrifugací došlo vlivem imidazolu k eluci proteinu s histidinovou značkou. Eluční krok se provedl celkem 3x, přičemž jednotlivé frakce se sbíraly v každém kroku do jiné centrifugační zkumavky.

U vzorků eluovaných proteinů, frakce po ekvilibraci a frakcí po promývání byla zjištěna koncentrace metodou BCA viz kapitola 4.2.5. Všechny vzorky a frakce byly dále analyzovány metodou western blot viz kapitola 4.2.6. U vzorků s eluovaným proteinem bylo provedeno odsolení z důvodu odstranění imidazolu, který byl ve vysoké koncentraci obsažen v elučním pufru.

K odsolení vzorku byl použit komerční kit Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter 10K Device - 10,000 MWCO (*molecular weight cut-off*). V kitu je obsaženo filtrační zařízení, centrifugační zkumavka a víčko. Bylo postupováno dle přiloženého návodu. Do filtračního zařízení, umístěného v centrifugační zkumavce, se aplikovaly 4 ml vzorku. Zavičkové filtrační zařízení bylo centrifugováno při 3 200 x g po dobu 10 min. Zfiltrované balastní látky byly odstraněny z centrifugační zkumavky a k proteinům, zachyceným na filtru, byly přidány 3 ml 0,1M draselno-fosfátového pufru (pH 7,4). Filtrační zařízení umístěné v centrifugační zkumavce bylo opět centrifugováno při 3 200 x g po dobu 10 min. Tento postup se opakoval 6x z důvodu důkladného promytí proteinů od soli. Zadržovaný ultrafiltrát se z filtračního zařízení přepipetoval do nové zkumavky.

4.2.5 BCA stanovení proteinů

Ke stanovení proteinů metodou BCA byl využit kit Pierce™ BCA Protein Assay, který obsahoval potřebné reagensy. Bylo postupováno dle přiloženého návodu. Ředěním zásobního roztoku byl připraven 0,1% roztok hovězího sérového albuminu (BSA). Body kalibrační křivky se připravily do 6 mikrozkušavek dle tab. 10. Negativní kontrola a vzorky purifikovaného proteinu byly připraveny do celkového objemu 100 µl a ředěny 25x a 50x. Negativní kontrolou zde byl proteinový lyzát získaný z transformovaných buněk BL21 kultivovaných bez IPTG. Připravil se pracovní roztok C s obsahem bicinchoninové kyseliny (BCA) a Cu²⁺.

V mikrotitrační destičce se provedly 4 paralelní měření všech připravených proteinů. Do jamek mikrotitrační destičky se pipetovalo 10 µl bodů kalibrační křivky, 10 µl jednotlivých vzorků a 10 µl kontroly. Do každé jamky s nanesenými proteiny v mikrotitrační destičce se přidalo 200 µl pracovního roztoku C. Mikrotitrační destička se promíchala a nechala se inkubovat po dobu 30 min při teplotě 37 °C. Poté se mikrotitrační destička lehce protřepala a vložila do přístroje Tecan Spark. Absorbance

vytvořeného komplexu, tvořeného proteinem redukováným Cu^+ s BCA, se měřila při vlnové délce 562 nm.

Tabulka 10 Kalibrační křivka – BCA stanovení proteinů

Kalibrační bod	Koncentrace ($\mu\text{g/ml}$)	0,1% roztok BSA (μl)	Destilovaná H_2O (μl)
1	0	0	50
2	200	10	40
3	400	20	30
4	600	30	20
5	800	40	10
6	1000	50	0

4.2.6 Western blot (imunoblot)

Metoda western blot se skládá ze třech hlavních kroků. Prvním z nich je elektroforetická separace proteinů, která umožňuje jejich rozdělení podle velikosti. Druhým krokem je přenos separovaných proteinů z gelu na membránu, kde dochází k jejich fixaci. Posledním krokem je detekce specifických proteinů na membráně.

4.2.6.1 SDS-PAGE – Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Před samotnou elektroforézou bylo nezbytné připravit polyakrylamidový gel v příslušné aparatuře. Sklo, sklo se spacerem a hřeben se nejprve důkladně omyly jarem vodou, redestilovanou vodou a lihometanolem. Po oschnutí se skla přiložila na sebe, spojily se sponami, postavily na gumovou podložku v nalévacím stojánku a přichytily vrchním kolíkem. Po sestavení aparatury se připravil roztok na separační (spodní) gel v malé kádince viz tab. 11, který se lehce promíchal a ihned se napipetoval mezi skla tak, aby dosahoval výšky 4,5 cm od spodního okraje. Spodní gel se převrstvil cca 200 μl isobutanolem nasyceným vodou a nechal se polymerovat po dobu 30-60 min. Isobutanol se následně slil a soustava se velmi opatrně osušila filtračním papírem, který se nesměl dotknout gelu. Poté se v kádince připravil roztok zaostřovacího (horního)

gelu dle tab. 11. Gel se promíchal a napipetoval mezi skla na spodní gel po horní okraj. Hřeben se zasunul do gelu až po drážky. Gel se nechal polymerovat alespoň 30 min.

Tabulka 11 Přípravu gelů pro SDS-PAGE

Komponenta	Separáční gel 12,5% (spodní)	Zaostřovací gel 4% (horní)
Redestilovaná voda	8,55 ml	6,42 ml
Pufr 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	5 ml	-
Pufr 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	-	2,5 ml
40 % AA + bis AA	6,25 ml	0,98 ml
10 % SDS	0,2 ml	0,1 ml
Iniciace polymerace		
10 % APS	200 μ l	200 μ l
TEMED	16 μ l	16 μ l

Tyto směsi jsou pro přípravu dvou 1,5 mm gelů; AA = akrylamid, bisAA = bis-akrylamid, APS = persíran amonný, SDS = dodecylsíran sodný, TEMED = tetramethylethylendiamin,

Dle naměřené koncentrace proteinu se vzorky připravené v kapitole 4.2.4 naředily 4x SDS vzorkovým a lyzačním pufrům s roztokem inhibitorů tak, aby měly vzorky výslednou koncentraci 1 μ g/ μ l. Naředěné vzorky se umístily na 5 min do předehřátého termobloku na 95 °C. Připravené gely se vyndaly ze stojánku, opláchly se vodou a vyndal se z nich hřebínek. Poté se do stojánku na elektroforézu vložily gely a umístily se do elektroforetické vany. Do vnitřního elektrodového prostoru se nalil elektrodový pufr o objemu cca 125 ml tak, aby byl gel celý ponořený. Do vnějšího elektrodového prostoru se nalil elektrodový pufr o objemu cca 200 ml tak, aby byla hladina nad drátkem. Do vnitřního elektrodového prostoru bylo nezbytné použít vždy nový elektrodový pufr, naopak do vnějšího bylo možné použít pufr opakovaně.

Pomocí nanášecího bloku pipetou s bílými špičkami se nanoslo do každé jamky 25 μ l vzorku. Molekulární standard se nanosil o objemu 1,25 μ l. Aparatura se přiklopila víkem a připojila ke zdroji s konstantním napětím 90 V. Zdroj napětí se vypl po doběhnutí čela na spodní okraj gelu. Gel byl vyjmut ze skla a odřízl se z něj zaostřovací gel.

4.2.6.2 Barvení celkových proteinů

První gel se obarvil na přítomnost celkových proteinů. Gel byl umístěn do plastové krabičky na kývačku a nechal inkubovat s EZBlue™ gel staining reagent cca hodinu při laboratorní teplotě.

4.2.6.3 Přenos proteinů na membránu

Na druhém gelu se provedl přenos separovaných proteinů na membránu. Separační gel se ponořil do blotovacího pufru v plastové krabičce. Do dalších krabiček se ponořila i nitrocelulózová membrána a 2 tlusté filtrační papíry. Gel, membrána i filtrační papíry se nechaly inkubovat v pufru 20 min při laboratorní teplotě. Blotování bylo provedeno v přístroji BioRad Trans Blot Turbo. Do blotovací kazety přístroje se na sebe naskládal filtrační papír, nitrocelulózová membrána, gel a další filtrační papír. Gel se rukama uhladil, aby mezi membránou a gelem nebyly bubliny. Přístroj se zapnul a navolil se vhodný program pro požadovanou tloušťku gelu (pro 1,5 mm gel – 20 min). Po skončení blotovacího programu se na membráně označily nejvýraznější proužky markeru (25, 50, 70 kDa).

4.2.6.4 Imunochemická detekce proteinů

Membrána se pinzetou přenesla do plastové krabičky s víkem. Do krabičky se nalila redestilovaná voda a umístila se na kývačku. Po několika minutách se voda vylila do výlevky. Proplachování v redestilované vodě se opakovalo 3x. Do krabičky s membránou se nalilo 25 ml 5% roztoku mléka v TBST pufru a nechala se 2 hodiny na třepačce. Po uplynulé době se mléko vylilo do výlevky a membrána se opláchla TBST puftrem. Membrána se nechala inkubovat s primární protilátkou přes noc. Druhý den se primární protilátka z krabičky odstranila a následovalo oplachování membrány s TBST puftrem 4x15 minut. Membrána se inkubovala 1 hodinu se sekundární protilátkou značenou enzymem – křenovou peroxidasou, a poté se oplachovala TBST puftrem 4x15 minut.

Přítomnost proteinu se detekovala přidáním vhodného substrátu (ECL Prime Western blotting detection reagent) pro enzym. Roztok A (*luminol solution*) s smíchal s roztokem B (*peroxide solution*) v poměru 1:1. Z krabičky s membránou se odstranil TBST pufr a na membránu se napipetovalo 1,5 ml substrátu po celé její ploše. Membrána se nechala 5 min inkubovat při tlumeném světle. Přítomnost chemiluminiscence na membráně se detekovala zobrazovacím systémem Uvitec.

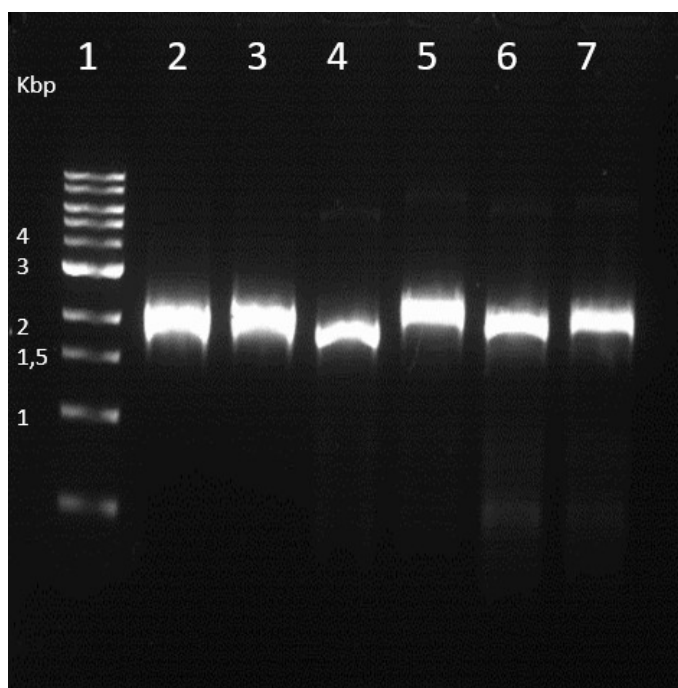
5 Výsledky

5.1 Amplifikace genu *sdr12*

Jako první krok pro přípravu expresního plasmidu, což bylo cílem mé diplomové práce, byla provedena PCR amplifikace genu *sdr12* s použitím specifických primerů. Kontrola velikosti amplifikovaných úseků genu *sdr12* a účinnosti PCR reakce byla provedena agarosovou elektroforézou. Gel se vyhodnotil na základě přítomnosti fragmentu v příslušném místě odpovídajícím délce amplifikovaného úseku.

Na obr. 7 se v první pozici gelu nachází separovaný 1 kbp velikostní marker, který je nezbytný pro odhad velikosti nanesených vzorků. V pozicích 2-7 se nechaly separovat PCR produkty.

Délka kódující sekvence (CDS) *sdr12* je 1248 bp. Délka amplifikovaného úseku byla navíc prodloužena o úseky primerů obsahující štěpné místo pro restriční endonukleasy, *TEV site* a náhodné nukleotidy. Na obr. 7 lze v pozicích gelu 2-7 pozorovat výrazné pruhy (dále bandy). Přestože bandy odpovídají velikosti okolo 2 kbp, předpokládalo se úspěšné amplifikování požadovaných úseků DNA. Pokračovalo se v následujících krocích dle plánu, tedy přečištění, ligace a transformace buněk *E. coli*.



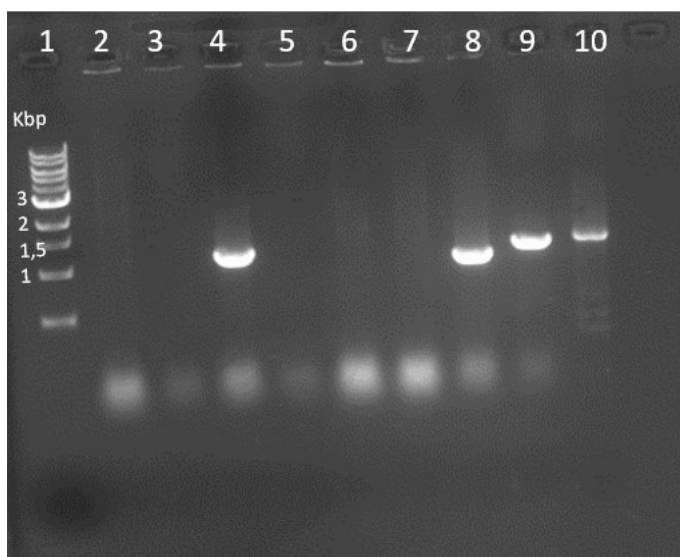
Obrázek 7 Ověření velikosti PCR produktu

5.2 PCR kolonií s klonovacím vektorem pGEM[®]-T Easy

Produkty PCR reakce, kde templátem byly vybrané kolonie *E. coli*, se ověřily agarosovou elektroforézou. Gel se vyhodnotil na základě přítomnosti bandu v příslušném místě odpovídajícím délce amplifikovaného úseku.

Bylo vybráno celkem 8 kolonií ke kontrole úspěšnosti ligace insertu do vektoru a transformace buněk *E. coli*. Na obr. 8 se v první pozici gelu nachází separovaný 1 kbp velikostí marker. V pozicích 2-10 se nechaly separovat PCR produkty.

Na obr. 8 je v pozici 4, 8, 9 a 10 přítomný band o velikosti amplifikovaného úseku *sdr12*. Pozice 4, 8, 9 odpovídají koloniím *E. coli*, které obsahují úspěšně zaligovaný vektor. V pozici 10 byl separován kontrolní PCR produkt. Pozitivní kolonie byla vybrána k následné izolaci vektoru. U zbylých PCR produktů v pozici 2, 3, 5, 6 a 7 nebyl detekován žádný PCR produkt.



Obrázek 8 Ověření ligace vektoru pGEM[®]-T Easy metodou colony PCR

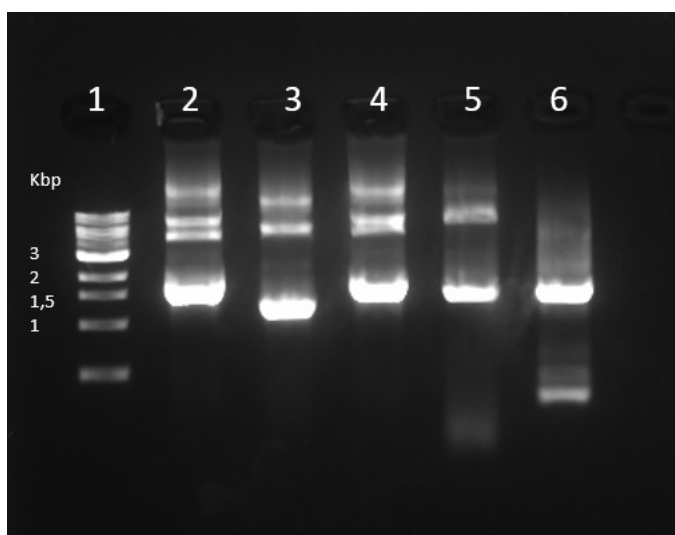
5.3 Izolace zaligovaného klonovacího vektoru pGEM[®]-T Easy

Po ověření přítomnosti insertu ve vektorech byly z příslušných kolonií izolovány vektory, aby mohly být inserty zkontrolovány sekvenací. Izolované vektory byly použity jako templát další kontrolní PCR reakce a zkontrolovány agarosovou elektroforézou. Na obr. 9 se v první pozici gelu nachází separovaný 1 kbp velikostí marker. V pozicích 2-5 se nechaly separovat produkty, kde byly templátem izolované vektory a v pozici 6 se separoval kontrolní PCR produkt (kde byla templátem původní

cDNA). Vzorky na gelu na obr. 9 (2, 3, 4, 5) odpovídají vzorkům na gelu po PCR kolonií na obr. 8 (4, 8, 9), přičemž jeden plasmid byl izolován v duplikátu.

Kromě produktu amplifikace odpovídajícímu velikosti okolo 1-1,5 kbp lze na gelu vidět i separované plasmidy, které byly použité jako templát. Cirkulární molekuly lze na gelu jednoduše odlišit od lineárních molekul. PCR produkt nebo štěpený vektor je lineární úsek DNA, který se projeví v podobě jediného bandu. Naproti tomu cirkulární molekula plasmidu se může vyskytovat ve více konformacích a projevit se na gelu více bandy. Zaligovaný plasmid se může vyskytovat ve dvou základních formách: *covalently closed circle (CCC)* a *open circular (OC)*. Obvykle se izolovaná DNA plasmidu vyskytuje ve formě superhelikálního CCC monomeru, který se díky své kompaktní struktuře pohybuje v gelu nejrychleji. Ostatní formy plasmidu, pohybující se v gelu pomaleji, odpovídají OC monomerům, CCC dimerům, nebo OC dimerům.

V pozici 6 gelu na obr. 9 se nachází band odpovídající velikosti PCR produktu. Slabý band velmi malé molekuly v pozici 6 je pravděpodobně vedlejším produktem PCR reakce. Plasmidy, které byly i touto druhou kontrolou potvrzeny, byly odeslány na sekvenaci (výsledky jsou zpracované v kapitole 5.8 po potvrzení sekvence v cílovém expresním vektoru).

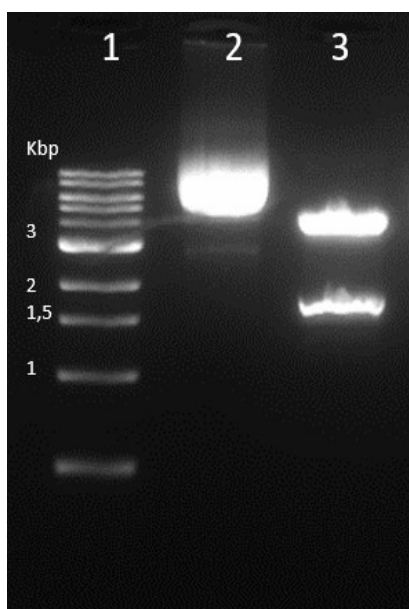


Obrázek 9 PCR kontrola insertu ve vektoru *pGEM[®]-T Easy*

5.4 Restrikční štěpení zaligovaného klonovacího vektoru pGEM[®]-T Easy

Restrikčními endonukleasami *XhoI* a *NdeI*, jejichž štěpná místa jsou obsažena v primerech pro amplifikaci genu *sdr12*, se insert vyštěpil z pGEM[®]-T Easy vektoru. Cílem následné agarosové elektroforézy bylo ověřit úspěšnost štěpení a získat band obsahující vyštěpený insert, který se z gelu extrahoval a použil pro ligaci do expresního vektoru.

V první pozici gelu na obr. 10 se nachází separovaný 1 kbp velikostní marker. V pozici 3 se nachází dva bandy. Protože je molekula insertu kratší než molekula vektoru, migrovala v gelu rychleji a urazila větší vzdálenost. V pozici 2 se pro srovnání nechal separovat zaligovaný, neštěpený plasmid.



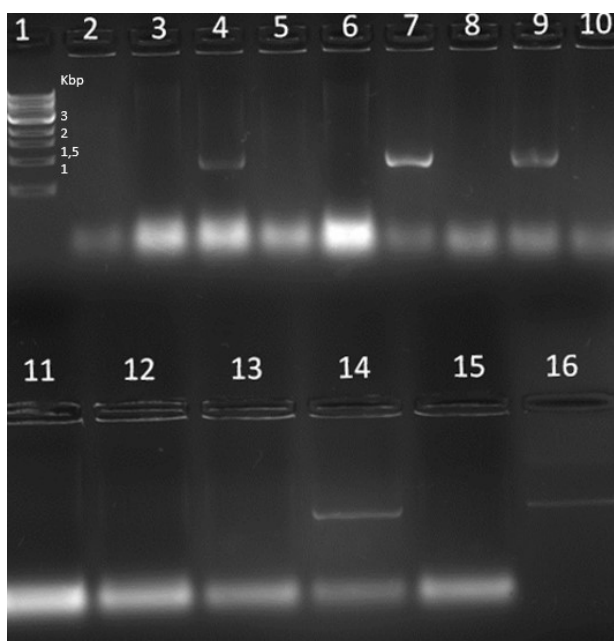
Obrázek 10 Restrikční štěpení zaligovaného vektoru pGEM[®]-T Easy

5.5 PCR kolonií s expresním vektorem pET-22b(+)

Po ligaci přečištěného produktu do expresního vektoru a transformaci byly narostlé kolonie opět kontrolovány, zda obsahují požadovaný insert pomocí PCR. Produkty PCR reakce, kde templátem byly vybrané kolonie *E. coli*, se ověřily agarosovou elektroforézou. Gel se vyhodnotil na základě přítomnosti bandu, v příslušném místě odpovídajícím délce amplifikovaného úseku.

Bylo vybráno celkem 14 kolonií ke kontrole úspěšnosti ligace insertu do vektoru a transformace buněk *E. coli*. Na obr. 11 se v první pozici gelu nachází separovaný 1 kbp velikostí marker. V pozicích 2-16 se nechaly separovat PCR produkty.

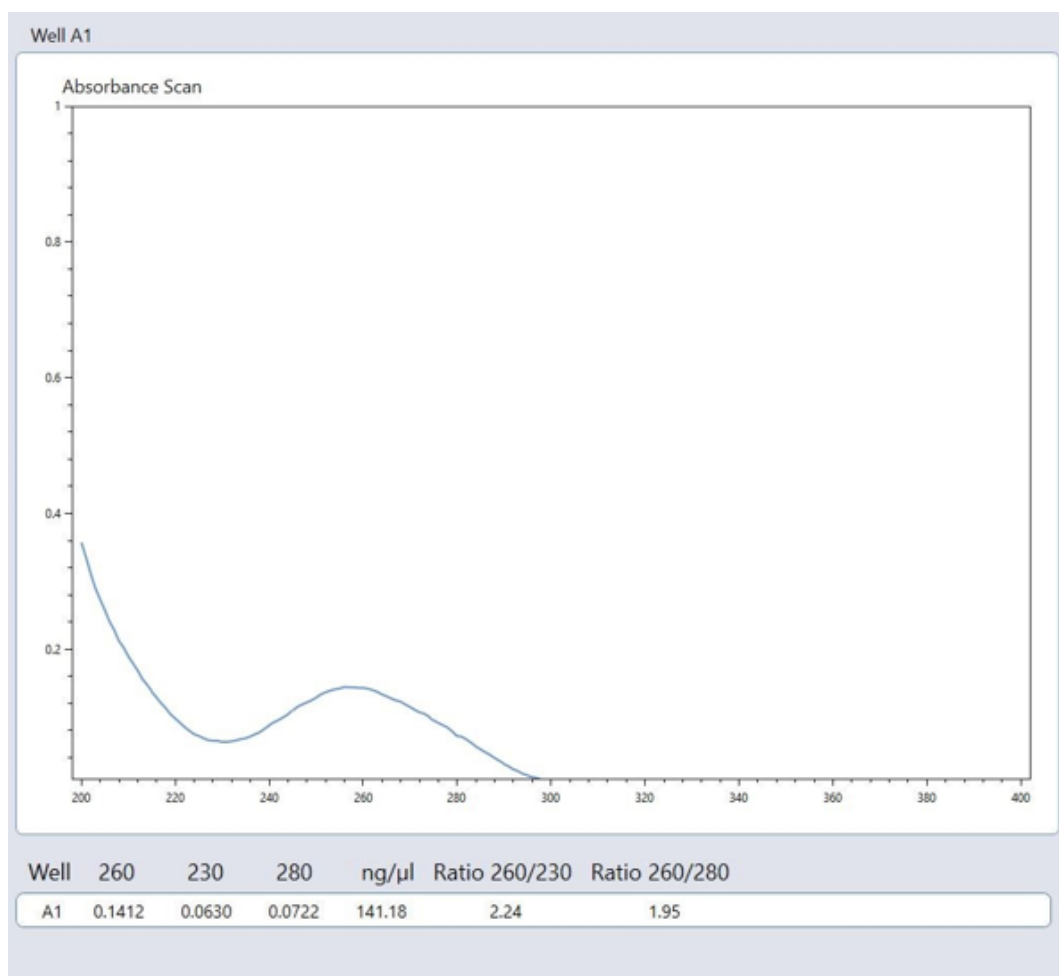
Na obr. 11 je v pozici 4, 7, 9, 14 a 16 přítomný band o velikosti amplifikovaného úseku *sdr12*. Pozice 4, 7, 9 a 14 odpovídají koloniím *E. coli*, které obsahují úspěšně zaligovaný vektor. Pozitivní kolonie byla vybrána k následné izolaci vektoru. V pozici 16 je kontrolní band PCR produktu. U zbylých PCR produktů v pozici 2, 3, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13 a 15 nebyl detekován žádný band. Pozitivní kolonie byla namnožena a z ní izolovaný vektor byl opět zkontrolován agarosovou elektroforézou.



Obrázek 11 Ověření ligace vektoru pET-22b(+) metodou colony PCR

5.6 Koncentrace a čistota vektoru pET-22b(+) se zaligovaným insertem *sdr12*

Poté co se elektroforézou ověřila přítomnost izolovaného vektoru obsahujícího *sdr12* byla změřena jeho výsledná koncentrace spektrofotometrem Nanodrop. Výstupem spektrofotometru viz obr. 12 je absorpční spektrum, které graficky znázorňuje závislost absorbance (A) na vlnové délce (λ). Koncentrace výsledného plasmidu je 141,18 ng/ μ l. Čistota plasmidu, která je vyjádřena poměrem absorbancí 260/280 odpovídá hodnotě vyšší než 1,8 ($260/280 = 1,95$). Čistota plasmidu, která je vyjádřena poměrem absorbancí 260/230 je vyšší než 2 ($260/230 = 2,24$). Všechny hodnoty poměrů absorbancí odpovídají vysoké čistotě plasmidu.



Obrázek 12 Výstup ze spektrofotometru NanoDrop – Koncentrace a čistota pET-22b(+) se zaligovaným insertem sdr12

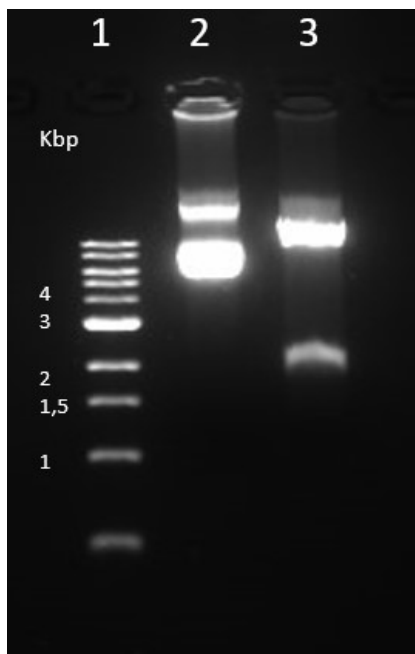
Osa x = vlnová délka (λ) v nm; osa y = absorbance (A)

5.7 Restrikční štěpení zaligovaného expresního vektoru pET-22b(+)

Jako další kontrola bylo opět provedeno restrikční štěpení endonukleasami *Xho*I a *Nde*I, které byly použité při vkládání insertu do vektoru pET-22b(+). Cílem následně provedené agarosové elektroforézy bylo ověřit úspěšnost ligace.

V první pozici gelu na obr. 13 se nachází separovaný 1 kbp velikostní marker. V pozici 3 se nachází bandy odpovídající velikosti insertu a vektoru. Protože je molekula insertu kratší než molekula vektoru, migrovala v gelu rychleji a urazila větší vzdálenost. V pozici 2 se pro srovnání nechal separovat nezaligovaný, neštěpený,

cirkulární plasmid. Po úspěšné ligaci byly vzorky plasmidu odeslány na sekvenaci, která byla provedena z obou směrů pro ověření sekvence celého genu.



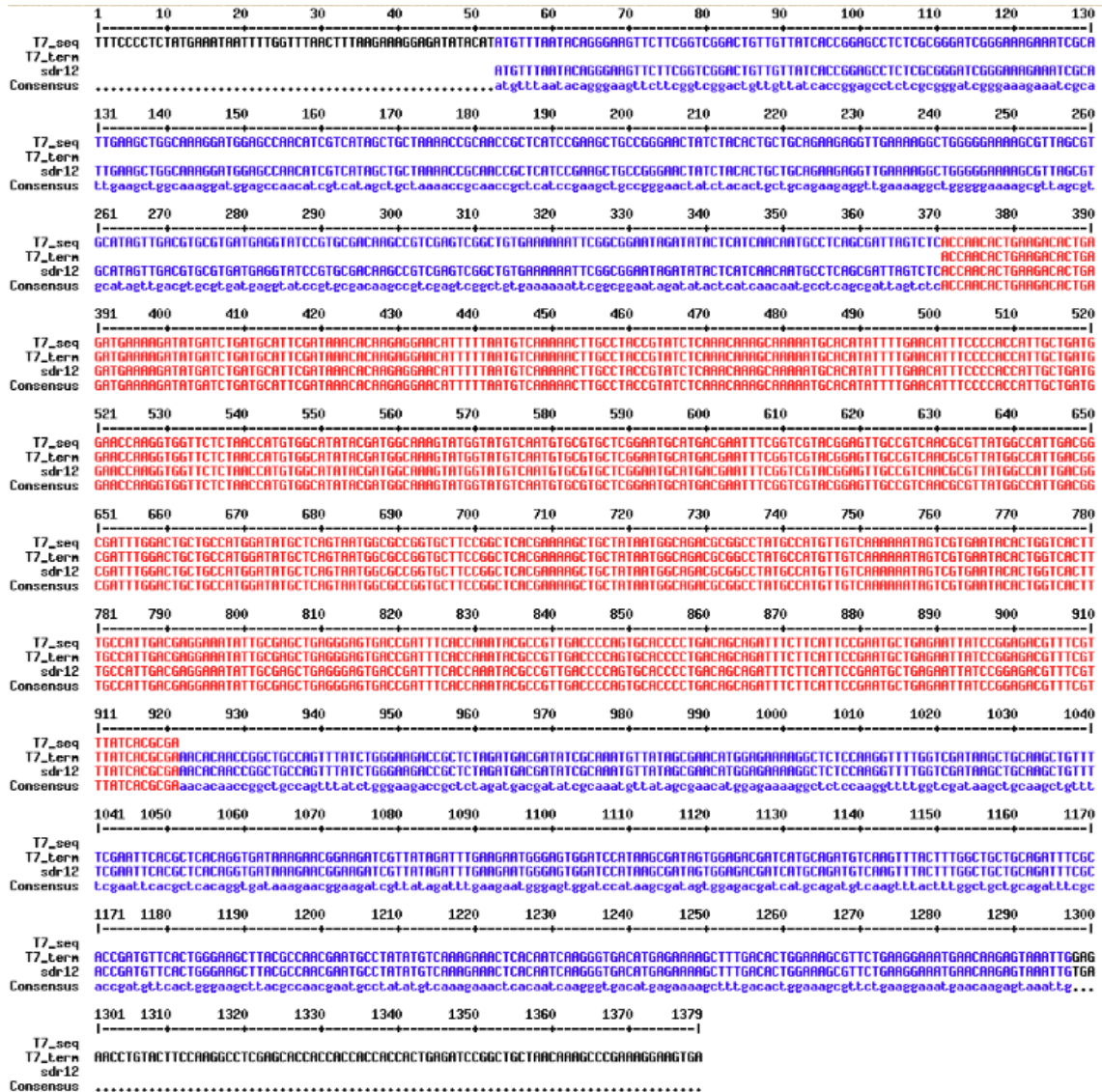
Obrázek 13 Ověření ligace vektoru pET-22b(+) restrikcí štěpením

5.8 Sekvence

Výsledek sekvenace byl exportován do FASTA formátu v programu *Chromas*. Referenční sekvence *sdr12* byla získána z databáze WormBase ParaSite (<https://parasite.wormbase.org/index.html>) a porovnána se sekvencí insertu *sdr12* zaligovaného ve vektoru pET-22b(+). Sekvence získaná využitím reverzního primeru byla převedena na reverzně komplementární řetězec pomocí SMS (*Sequence Manipulation Suite*). Porovnání sekvencí bylo provedeno v programu *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

Na obr. 14 je v prvním řádku výsledek sekvenace insertu *sdr12* v pET-22b(+) s T7 promotorovým primerem, na druhém řádku je výsledek sekvenace insertu *sdr12* v pET-22b(+) s T7 terminačním primerem, na třetím řádku je referenční CDS sekvence *sdr12* a na čtvrtém řádku shoda sekvencí. Červené nukleotidy označují vysokou míru shody, modré nukleotidy jsou odlišné a černé nukleotidy jsou bez shody. Na obr. 14 lze pozorovat úspěšně osekvenované konce insertu. V oblasti 1325 - 1342bp se nachází

histidinová značka – 6x CAC. Sekvenačními primery T7 došlo k syntéze požadovaného insertu, ale zároveň i k části vektorové sekvence (1-49 bp; 1346-1379 bp).



Obrázek 14 Porovnání sekvence insertu sdr12 zaligovaného do vektoru pET-22b(+) s referenční sekvencí sdr12

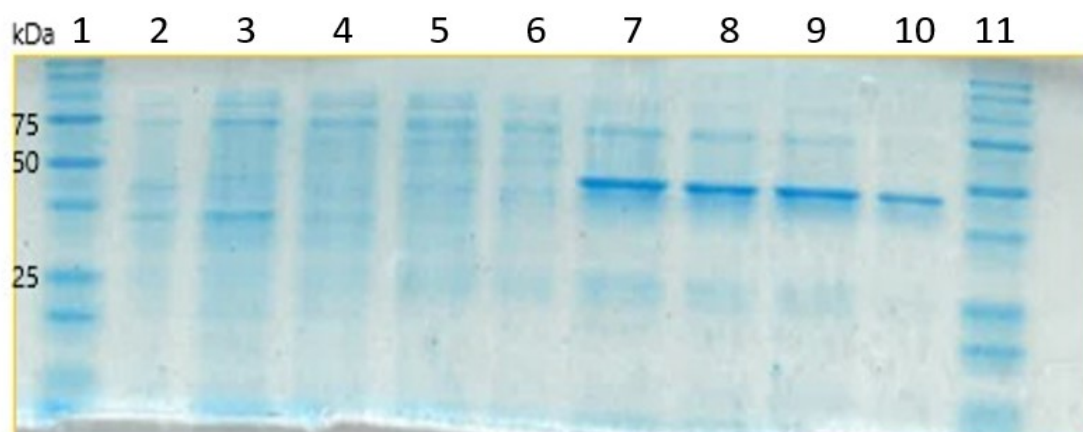
5.9 Izolace celkových proteinů

Po úspěšném ověření sekvence následovala exprese proteinu v transformovaných buňkách s plasmidem. Veškeré proteiny se izolovaly, byla změřena jejich koncentrace metodou BCA a následně pomocí afinitní chromatografie byla SDR12 přečištěna. Vzorky se následně metodou SDS-PAGE separovaly na základě molekulové hmotnosti. Molekulová hmotnost proteinu SDR12 odpovídá 47,37 kDa. Molekulová hmotnost byla spočítána pomocí SMS (*Sequence Manipulation Suite*) na

webové stránce www.bioinformatics.org. Tento protein vznikl po přeložení kódující nukleotidové sekvence (CDS) *sdr12* a připočítání přidaného „TEV site“ a „His tag“ (6 histidinů na C-konci), který byl připojen díky příslušné sekvenci v plasmidu.

V gelu na obr. 15 byl v pozici 1 a 11 separován velikostní marker. V pozici 2 byla separována frakce získaná po ekvilibraci kolony v rámci purifikace proteinu a v pozicích 3-6 byly separovány frakce získané promýváním kolony. V pozici 7, 8, 9 a 10 byly separovány eluované, purifikované vzorky proteinu.

Gel na obr. 15 se vyhodnotil na základě přítomnosti bandu v místě příslušné molekulové hmotnosti rekombinantního proteinu (47,37 kDa). Pozitivní nález v gelu na obr. 15 je v pozici 7, 8, 9 a 10. Přítomnost rekombinantního proteinu se definitivně prokázala imunochemickou detekcí.



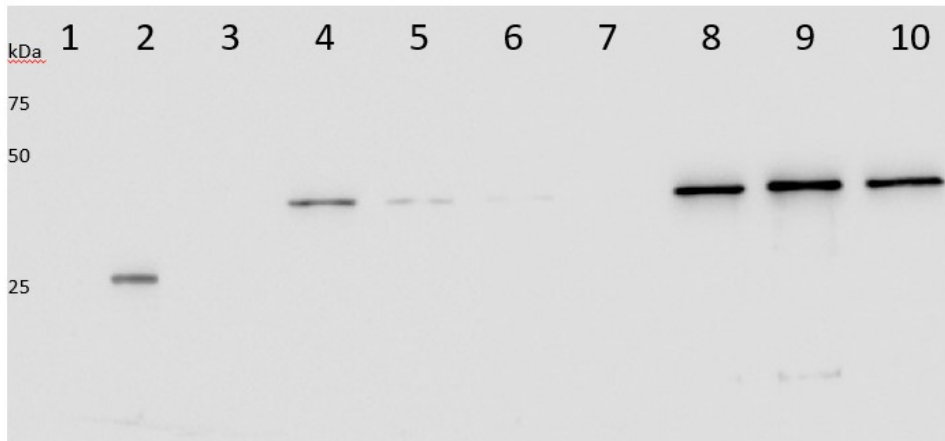
Obrázek 15 SDS-PAGE – barvení celkových proteinů

5.10 Chemiluminiscenční detekce proteinů

Pozice v gelu na obr. 16 odpovídají stejnému pořadí frakcí a vzorků jako v gelu na obr. 15, s tím rozdílem, že vzorky v pozicích 7 a 8 na gelu na obr. 15 byly pro získání vyšší koncentrace proteinu spojeny a naneseny jako jeden vzorek do pozice 8 na gel pro western blot na obr. 16. Velikostní marker na gelu na obr. 16 byl separován pouze v pozici 1.

Gel byl vyhodnocován kvalitativně a semikvantitativně na základě přítomnosti bandů a jejich síly. Na obr. 16 byla detekována slabá chemiluminiscence v pozici 4, 5 a 6 v místě odpovídajícím 47,37 kDa. Silná chemiluminiscence byla detekována v pozici 8, 9 a 10 v místě odpovídajícím 47,37 kDa. Ze síly bandů lze usuzovat, že vzorky

v pozicích 8, 9, 10 obsahují protein o vyšší koncentraci, než frakce v pozici 4, 5 a 6. V pozici 4, 5, a 6 se detekoval protein, který se přenesl do frakce promývacím pufrem s nízkou koncentrací imidazolu. V pozici 8, 9 a 10 se prokázala přítomnost proteinu ve vzorku získaného elucí pufrem o vysoké koncentraci imidazolu. V pozici 2 došlo k nespecifickému navázání primární protilátky, protože se band nenachází v místě odpovídajícím 47,37 kDa.



Obrázek 16 Western blot purifikovaného proteinu

6 Diskuse

Anthelmintická rezistence u hlístice *Haemonchus contortus* představuje globální problém v oblasti zemědělství, ekonomiky a zdraví malých přežvýkavců (ovcí a koz). Anthelmintika jsou doposud klíčovým nástrojem k léčbě parazitární infekce způsobené *H. contortus*. Zkoumání mechanismů rezistence a hledání nových farmakologických přístupů je nezbytné pro řešení této problematiky. Prohloubení biochemických znalostí o *H. contortus* je důležitou součástí boje proti hemonchóze. Studium *H. contortus* na molekulární úrovni umožnila publikace genomu této hlístice (Laing et al. 2013; Schwarz et al. 2013).

Ke vzniku rezistence přispívá nesprávné podávání anthelmintik, což může vést ke změně míry genové exprese biotransformačních enzymů a zároveň ke snížení účinnosti léčby infekce způsobené *H. contortus*.

Nejprve byla výzkumná pozornost zaměřena především na oxidační enzymy, například cytochromy P450 (CYP) (Laing et al. 2015). Genom *H. contortus* kóduje početnou rodinu CYP. Tyto enzymy se významně podílejí na 1. fázi biotransformace xenobiotik a exprimují se hlavně ve střevě parazita. Většina těchto enzymů u *H. contortus* vykazuje vyšší míru konstitutivní exprese v larválních stádiích oproti dospělým jedincům.

Katedra biochemických věd na Farmaceutické fakultě UK se zabývá problematikou rezistence *H. contortus* v souvislosti s anthelmintiky dlouhodobě. Práce výzkumné skupiny zahrnuje široké spektrum *ex vivo* a *in vitro* experimentů, které jsou zaměřené na biotransformační enzymy helmintů. Výzkum se zde nesoustředí jen na expresi genů kódujících enzymy, ale také na stanovení schopnosti biotransformačních enzymů metabolizovat anthelmintika v závislosti na citlivosti kmene *H. contortus* vůči léčivu a pohlaví jedinců. Srovnání konstitutivní a anthelmintiky indukované genové exprese mezi citlivými a rezistentními kmeny by mohlo přispět k identifikaci genů podílejících se na vzniku rezistence.

V rámci výzkumu rezistence na katedře byla nejdříve pozornost zaměřena na UGT, protože neaktivní biotransformační produkty benzimidazolových anthelmintik byly v různých pozicích glykosylované (Stuchlíková et al. 2018). Výzkum (Matoušková et al. 2018) se zabýval porovnáním konstitutivní exprese genů *ugt* v rámci obou pohlaví dospělců *H. contortus* a mezi třemi kmeny – citlivými (ISE) a rezistentními (IRE, WR).

V rámci tohoto výzkumu byla také provedena fylogenetická analýza *ugt* u *H. contortus* a volně žijícího homologního organismu *C. elegans*. Porovnání konstitutivní exprese *ugt* prokázalo vyšší expresi genu kódujícího UGT368B2 u obou rezistentních kmenů i obou pohlaví. Výzkum (Kellerová et al. 2020) se zabýval konstitutivní expesí UGT v juvenilních stádiích (vajíčka, L1, L3) kmenů (ISE, IRE, WR) *H. contortus*. V rámci tohoto výzkumu byl zároveň popsán metabolismus ABZ v juvenilních stádiích. Tento výzkum identifikoval odlišnou míru exprese u několika *ugt* mezi kmeny v průběhu životního cyklu *H. contortus*. Většina UGT vykazovala vyšší míru exprese v juvenilních stádiích v porovnání s dospělými jedinci. Gen kódující UGT368B2, který vykazoval u dospělců rezistentních kmenů vyšší expresi, vykazoval vyšší expresi také v rezistentních kmenech L1 a L3.

Metabolické dráhy xenobiotik v aerobních organismech probíhají častěji pomocí oxidačních procesů než prostřednictvím redukčních procesů. U některých anthelmintik, obsahujících karbonylové sloučeniny, však dominují redukční reakce. Například u FLU je nejvíce zastoupený metabolit redukovaný, přičemž bylo zjištěno, že větší množství redukovaného FLU vzniká u rezistentního kmene *H. contortus* (Stuchlíková et al. 2018). Proto se momentálně více pozornosti věnuje enzymům redukujícím xenobiotika (Rychlá et al. 2024; Štěrbová et al. 2023).

Zvýšenou aktivitu enzymu lze regulovat jeho inhibicí. Z tohoto důvodu byl proveden výzkum (Rychlá et al. 2024) s cílem identifikovat účinné inhibitory enzymů metabolizujících flubendazol (FLU) na redukovanou formu (FLU-R) u rezistentních (IRE) a citlivých (ISE) kmenů *H. contortus*. Tato studie prokázala inhibici redukce FLU naringeninem a menadionem u dospělců IRE i ISE kmenů. Naopak další potenciální inhibitory jako kyselina glycyrrhetinová a mebendazol vykazovaly inhibiční účinek pouze u ISE kmene. Podobně se výzkum (Dimunová et al. 2022) zabýval identifikací potenciálních inhibitorů konjugačních enzymů. Tato studie tří potenciálních inhibitorů – 5-nitrouracilu, 4,6-dihydroxy-5-nitropyrimidinu a sulfinpyrazonu – označila sulfinpyrazon, jako potenciální inhibitor glykosylace ABZ enzymy UGT u *H. contortus*.

Ačkoli SDR jsou enzymy, které se nacházejí ve všech studovaných organismech, dlouho nebyly dostupné žádné detailní informace o této nadrovině u *H. contortus* až do roku 2023. Diplomová práce byla provedena v návaznosti na studii (Štěrbová et al. 2023), která se zabývala konstitutivní expesí genů *sdr*. Tato studie navrhuje vybrané

sdr, včetně *sdr12*, jako možné geny související s anthelmintickou rezistencí. V této studii byla metodou qPCR prokázána zvýšená exprese genu *sdr12* ve většině vývojových stádií IRE kmene *H. contortus*. Zapojení kandidátních genů do mechanismu rezistence však může být potvrzeno pouze funkční analýzou. Na tomto podkladě bylo v rámci experimentální části této diplomové práce provedeno klonování plasmidového vektoru s vloženým genem *sdr12* za účelem exprese příslušného proteinu.

7 Závěr

V teoretické části diplomové práce byla provedena literární rešerše, ve které byla popsána parazitická hlístice vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*), onemocnění způsobené tímto parazitem, problematika rezistence hlístic na anthelmintickou léčbu, metabolismus xenobiotik a enzymy dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem (SDR) podílející se na biotransformaci anthelmintik.

V experimentální části práce byl připraven plasmid s kódující sekvencí genu *sdr12* a příslušný rekombinantní protein. Metodou PCR byl amplifikován kódující úsek genu *sdr12*, který byl zaligován do klonovacího vektoru pGEM[®]-T Easy. Sekvenací zaligovaného vektoru byla ověřena syntéza amplifikovaného úseku genu *sdr12*. Insert byl z vektoru vyštěpen restrikcími endonukleasami a zaligován do expresního vektoru pET22-b(+). Z buněčné kolonie *E. coli*, která obsahovala zaligovaný pET22-b(+), byl po indukci genové exprese izolován rekombinantní protein. Přítomnost histidinové značky (*His Tag*) v sekvenci umožnila přečištění proteinu a jeho detekci metodou western blot. Připravený rekombinantní protein bude možné využít ke zkoumání jeho enzymatické aktivity.

8 Seznam zkratek

- AA – akrylamid
- ABC – *ATP-binding cassette*
- ABZ – albendazol
- ABZSO – albendazol-sulfoxid
- AKR – aldo-ketoreduktasy
- APS – *ammonium persulfate*, persíran amonný
- ATP – *adenosine triphosphate*, adenosintrifosfát
- BCA – *bicinchoninic acid*, kyselina bicinchoninová
- bp – *base pair*, pár bází
- BSA – *bovine serum albumin*, hovězí sérový albumin
- BZ – benzimidazoly
- CBR – *carbonyl reductase*, karbonylreduktasa
- CCC – *covalently closed circle*
- cDNA – *complementary DNA*, komplementární DNA
- CDS – *coding sequence* – kódující sekvence
- *C. elegans* – *Caenorhabditis elegans*
- cfu – *colony forming units*, jednotka tvořící kolonie
- CRD – *cortisone reductase deficiency*, kortizon reduktasový deficit
- CYP – cytochrom P450
- ddH₂O – *double-distilled H₂O*, dvakrát destilovaná H₂O
- ddPCR – *droplet digital PCR*, kapková digitální PCR
- DNA – *deoxyribonucleic acid*, deoxyribonukleová kyselina
- dNTPs – *deoxynucleotide triphosphates*, deoxynukleotid trifosfáty
- DTT – dithiotreitol
- *E. coli* – *Escherichia coli*
- EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*, kyselina ethylendiamintetraoctová
- ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*
- FAMACHA – *Faffa Malan Chart*

- FLU – flubendazol
- FLU-R – redukovaný flubendazol
- FMO – flavinové monooxygenasy
- F primer – *forward primer*, přední primer
- GluClRs – glutamátové receptory chloridových iontových kanálů
- GSH – glutathion
- GST – glutathion-S-transferasy
- Hb – hemoglobin
- *H. contortus* – *Haemonchus contortus*
- HCT – hematokrit
- *His Tag* – značení obsahující 6 histidinů v sekvenci za sebou
- HSD – hydroxysteroid-dehydrogenasy
- IMAC – *immobilized metal affinity chromatography*, afinitní chromatografie s imobilizovaným kovem
- IPTG – isopropyl β -D-1-thiogalaktopyranosid
- IRE – *inbred resistant-Edinburgh strain*, rezistentní kmen *H. contortus*
- ISE – *inbred susceptible-Edinburgh strain*, citlivý kmen *H. contortus*
- ITS2 – *internal transcribed spacer 2*, druhý vnitřní transkribovaný spacer
- L – larvální stádium *H. contortus*
- *lac* – *lactose*
- LB médium – *Luria-Bertani medium*
- MCHC – *mean corpuscular hemoglobin concentration*, střední koncentrace hemoglobinu v erytrocytech
- MCV – *mean corpuscular volume*, střední objem erytrocytu
- ML – makrocyclické laktony
- MWCO – *molecular weight cut-off*
- NADPH – Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
- nAChR – nikotinový acetylcholinový receptor
- *NdeI* – 1. restikční endonukleáza izolovaná z *Neisseria denitrificans*
- OC – *open circular*

- OD600 – *optical density*, optická hustota při vlnové délce 600 nm
- PCR – *polymerase chain reaction*, polymerázová řetězová reakce
- PGE – prostaglandin E
- P-gp – P-glykoprotein
- qPCR – *quantitative PCR*, kvantitativní PCR
- RDH – retinoldehydrogenasy
- RE – restriční endonukleasy
- RNA – *ribonucleic acid*, ribonukleová kyselina
- rpm – *revolutions per minute*, otáčky za minutu
- R primer – *reverse primer*, zadní primer
- SDR – *short-chain dehydrogenase/reductase*, dehydrogenasy/reduktasy s krátkým řetězcem
- *sdr* – gen kódující enzym SDR
- SDS – *sodium dodecyl sulfate*, dodecylsírán sodný
- SDS-PAGE – *SDS-polyacrylamide gel electroforesis*, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
- SMS – *Sequence Manipulation Suite*
- SNP – *single nucleotide polymorphism*, jednonukleotidový polymorfismus
- SOC médium – *super optimal broth with catabolite repression medium*
- TAE – Tris-acetát-EDTA
- *Taq* DNA polymerasa – DNA polymerasa izolovaná z *Thermus aquaticus*
- TBST – *Tris-buffered saline + Tween 20*
- TEMED – tetramethylethylendiamin
- TEV – *tobacco etch virus*
- UDP – *uridine diphosphate*, uridindifosfát
- UGT – UDP-glykosyltransferasa
- *ugt* – gen kódující enzym UGT
- UV – *ultraviolet light*, ultrafialové záření
- WR: *White River multidrug resistant strain*, multirezistentní kmen
- X-Gal - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

• *XhoI* – 1. restikční endonukleáza izolovaná z *Xanthomonas holcicola*

9 Seznam obrázků

Obrázek 1 Schéma životního cyklu <i>H. contortus</i> u koz.....	11
Obrázek 2 Biotransformační dráha flubendazolu (FLU) u <i>H. contortus</i>	20
Obrázek 3 Struktura SDR – lidská kortikosteroidní 11 beta-dehydrogenasa 1 ..	22
Obrázek 4 Reakční mechanismus enzymů SDR (3 β /17 β -HSD).....	23
Obrázek 5 Klonovací vektor pGEM [®] -T Easy	36
Obrázek 6 Expresní vektor pET-22b(+).	42
Obrázek 7 Ověření velikosti PCR produktu	50
Obrázek 8 Ověření ligace vektoru pGEM [®] -T Easy metodou colony PCR.....	51
Obrázek 9 PCR kontrola insertu ve vektoru pGEM [®] -T Easy	52
Obrázek 10 Restrikční štěpení zaligovaného vektoru pGEM [®] -T Easy	53
Obrázek 11 Ověření ligace vektoru pET-22b(+).	54
Obrázek 12 Výstup ze spektrofotometru NanoDrop – Koncentrace a čistota pET-22b(+).	55
Obrázek 13 Ověření ligace vektoru pET-22b(+).	56
Obrázek 14 Porovnání sekvence insertu sdr12 zaligovaného do vektoru pET-22b(+).	57
Obrázek 15 SDS-PAGE – barvení celkových proteinů.....	58
Obrázek 16 Western blot purifikovaného proteinu	59

10 Seznam tabulek

Tabulka 1 Systém FAMACHA [®]	13
Tabulka 2 Sekvenční motivy kofaktoru a aktivního místa vybraných typů SDR24	
Tabulka 3 Použité primery pro amplifikaci genu sdr12 (HCON_00049110)	31
Tabulka 4 PCR směs	32
Tabulka 5 Podmínky PCR reakce pro OneTaq quick-load DNA polymerasu	32
Tabulka 6 Ligační směs pro vektor pGEM [®] -T Easy.....	35
Tabulka 7 Směs pro PCR kolonií	38
Tabulka 8 Restrikční směs	40
Tabulka 9 Ligační směs pro vektor pET-22b(+).	41
Tabulka 10 Kalibrační křivka – BCA stanovení proteinů	47

11 Seznam použité literatury

ADDUCI, I. et al., 2022. Haemonchosis in Sheep and Goats, Control Strategies and Development of Vaccines against *Haemonchus contortus*. *Animals*. Vol. 12, no. 18, p. 2339. DOI 10.3390/ani12182339.

ARDELLI, B. F. and PRICHARD, R. K., 2013. Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. *Veterinary Parasitology*. Vol. 191, no. 3–4, pp. 264–275. DOI 10.1016/j.vetpar.2012.09.021.

ARSENOPOULOS, K. V. et al., 2021. Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats. *Animals*. Vol. 11, no. 2, p. 363. DOI 10.3390/ani11020363.

BESIER, R.B. et al., 2016. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. In : . DOI 10.1016/bs.apar.2016.02.024.

BLACKHALL, W. J. et al., 1998. *Haemonchus contortus*: Selection at a Glutamate-Gated Chloride Channel Gene in Ivermectin- and Moxidectin-Selected Strains. *Experimental Parasitology*. Vol. 90, no. 1, pp. 42–48. DOI 10.1006/expr.1998.4316.

BOULIN, T. et al., 2011. Functional reconstitution of *Haemonchus contortus* acetylcholine receptors in *Xenopus* oocytes provides mechanistic insights into levamisole resistance. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 164, no. 5, pp. 1421–1432. DOI 10.1111/j.1476-5381.2011.01420.x.

BRAY, J. E., MARSDEN, B. D. and OPPERMANN, U., 2009. The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: A bioinformatics summary. *Chemico-Biological Interactions*. Vol. 178, no. 1–3, pp. 99–109. DOI 10.1016/j.cbi.2008.10.058.

BYGARSKI, E. E., PRICHARD, R. K. and ARDELLI, B. F., 2014. Resistance to the macrocyclic lactone moxidectin is mediated in part by membrane transporter P-glycoproteins: Implications for control of drug resistant parasitic nematodes.

International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. Vol. 4, no. 3, pp. 143–151. DOI 10.1016/j.ijpddr.2014.06.002.

CRINGOLI, G. et al., 2010. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols*. Vol. 5, no. 3, pp. 503–515. DOI 10.1038/nprot.2009.235.

CVILINK, V. et al., 2008. LC–MS–MS identification of albendazole and flubendazole metabolites formed ex vivo by *Haemonchus contortus*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 391, no. 1, pp. 337–343. DOI 10.1007/s00216-008-1863-9.

DIMUNOVÁ, D. et al., 2022. The induction and inhibition of UDP-glycosyltransferases in *Haemonchus contortus* and their role in the metabolism of albendazole. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. Vol. 19, pp. 56–64. DOI 10.1016/j.ijpddr.2022.06.001.

EHSAN, M. et al., 2020. Advances in the Development of Anti-*Haemonchus contortus* Vaccines: Challenges, Opportunities, and Perspectives. *Vaccines*. Vol. 8, no. 3, p. 555. DOI 10.3390/vaccines8030555.

ELMAHALAWY, S. T. et al., 2018. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) as a novel method for absolute quantification of major gastrointestinal nematodes in sheep. *Veterinary Parasitology*. Vol. 261, pp. 1–8. DOI 10.1016/j.vetpar.2018.07.008.

FILLING, Ch. et al., 2002. Critical Residues for Structure and Catalysis in Short-chain Dehydrogenases/Reductases. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 277, no. 28, pp. 25677–25684. DOI 10.1074/jbc.M202160200.

FISSIHA, W. and KINDE, M. Z., 2021. Anthelmintic Resistance and Its Mechanism: A Review. *Infection and Drug Resistance*. Vol. Volume 14, pp. 5403–5410. DOI 10.2147/IDR.S332378.

FLAY, K. J., HILL, F. I. and MUGUIRO, D. H., 2022. A Review: *Haemonchus contortus* Infection in Pasture-Based Sheep Production Systems, with a Focus on the Pathogenesis of Anaemia and Changes in Haematological Parameters. *Animals*. Vol. 12, no. 10, p. 1238. DOI 10.3390/ani12101238.

GASSER, R.B. et al., 2016. Understanding *Haemonchus contortus* Better Through Genomics and Transcriptomics. In : . DOI 10.1016/bs.apar.2016.02.015.

GODOY, P. et al., 2015. *Haemonchus contortus* P-glycoprotein-2: in situ localisation and characterisation of macrocyclic lactone transport. *International Journal for Parasitology*. Vol. 45, no. 1, pp. 85–93. DOI 10.1016/j.ijpara.2014.09.008.

GOMES, L., MONTEIRO, G. and MERGULHÃO, F., 2020. The Impact of IPTG Induction on Plasmid Stability and Heterologous Protein Expression by *Escherichia coli* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 21, no. 2, p. 576. DOI 10.3390/ijms21020576.

HASSAN, N. M. F. et al., 2019. Assessment of *Haemonchus contortus* larval and adult somatic antigens in sero-diagnosis of haemonchosis in naturally infected sheep and goats. *Journal of Parasitic Diseases*. Vol. 43, no. 4, pp. 718–725. DOI 10.1007/s12639-019-01152-0.

JUERS, D. H., MATTHEWS, B. W. and HUBER, R. E., 2012. LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein Science*. Vol. 21, no. 12, pp. 1792–1807. DOI 10.1002/pro.2165.

KAMINSKY, R. et al., 2008. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*. Vol. 452, no. 7184, pp. 176–180. DOI 10.1038/nature06722.

KANDIL, O. M. et al., 2017. Efficacy of glutathione-S-transferase purified antigen of the gastro-intestinal nematode *Haemonchus contortus* in diagnosis of sheep haemonchosis. *Journal of Parasitic Diseases*. Vol. 41, no. 4, pp. 968–975. DOI 10.1007/s12639-017-0920-8.

KAVANAGH, K. L. et al., 2008. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. *Cellular and Molecular Life Sciences*. Vol. 65, no. 24, p. 3895. DOI 10.1007/s00018-008-8588-y.

KELLEROVÁ, P. et al., 2020. UDP-Glycosyltransferases and Albendazole Metabolism in the Juvenile Stages of *Haemonchus contortus*. *Frontiers in Physiology*. Vol. 11. DOI 10.3389/fphys.2020.594116.

KOTZE, A. C. et al., 2014. Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. Vol. 4, no. 3, pp. 164–184. DOI 10.1016/j.ijpddr.2014.07.007.

LACEY, E. and PRICHARD, R. K., 1986. Interactions of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. Vol. 19, no. 2, pp. 171–181. DOI 10.1016/0166-6851(86)90122-2.

LAINING, R. et al., 2013. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology*. Vol. 14, no. 8, p. R88. DOI 10.1186/gb-2013-14-8-r88.

LAINING, R. et al., 2015. The cytochrome P450 family in the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. Vol. 45, no. 4, pp. 243–251. DOI 10.1016/j.ijpara.2014.12.001.

LESPINE, A. et al., 2012. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. Vol. 2, pp. 58–75. DOI 10.1016/j.ijpddr.2011.10.001.

LINCKE, C. R. et al., 1992. The P-glycoprotein gene family of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*. Vol. 228, no. 2, pp. 701–711. DOI 10.1016/0022-2836(92)90855-E.

LLOBERAS, M. et al., 2013. Comparative tissue pharmacokinetics and efficacy of moxidectin, abamectin and ivermectin in lambs infected with resistant nematodes: Impact of drug treatments on parasite P-glycoprotein expression. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. Vol. 3, pp. 20–27. DOI 10.1016/j.ijpddr.2012.11.001.

MALATKOVA, P., MASER, E. and WSOL, V., 2010. Human Carbonyl Reductases. *Current Drug Metabolism*. Vol. 11, no. 8, pp. 639–658. DOI 10.2174/138920010794233530.

MATOUŠKOVÁ, P. et al., 2016. The Role of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends in Parasitology*. Vol. 32, no. 6, pp. 481–491. DOI 10.1016/j.pt.2016.02.004.

MATOUŠKOVÁ, P. et al., 2018. UDP-glycosyltransferase family in *Haemonchus contortus*: Phylogenetic analysis, constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. Vol. 8, no. 3, pp. 420–429. DOI 10.1016/j.ijpddr.2018.09.005.

NAEEM, M., IQBAL, Z. and ROOHI, N., 2021. Ovine haemonchosis: a review. *Tropical Animal Health and Production*. Vol. 53, no. 1, p. 19. DOI 10.1007/s11250-020-02439-8.

NELSON, D. R. et al., 1993. The P450 Superfamily: Update on New Sequences, Gene Mapping, Accession Numbers, Early Trivial Names of Enzymes, and Nomenclature. *DNA and Cell Biology*. Vol. 12, no. 1, pp. 1–51. DOI 10.1089/dna.1993.12.1.

PERSSON, B. and KALLBERG, Y., 2013. Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chemico-Biological Interactions*. Vol. 202, no. 1–3, pp. 111–115. DOI 10.1016/j.cbi.2012.11.009.

PERSSON, B. et al., 2009. The SDR (short-chain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chemico-Biological Interactions*. Vol. 178, no. 1–3, pp. 94–98. DOI 10.1016/j.cbi.2008.10.040.

ROEPSTORFF, A. and NANSEN, P., 1998. *Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine*. ISBN ISBN 92-5-104220-9.

RYCHLÁ, N. et al., 2024. Flubendazole carbonyl reduction in drug-susceptible and drug-resistant strains of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*: changes during the life cycle and possible inhibition. *Veterinary Research*. Vol. 55, no. 1, p. 7. DOI 10.1186/s13567-023-01264-9.

SARAI, R. S. et al., 2014. Drug-efflux and target-site gene expression patterns in *Haemonchus contortus* larvae able to survive increasing concentrations of levamisole in vitro. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. Vol. 4, no. 2, pp. 77–84. DOI 10.1016/j.ijpddr.2014.02.001.

SCHWARZ, E. M. et al., 2013. The genome and developmental transcriptome of the strongylid nematode *Haemonchus contortus*. *Genome Biology*. Vol. 14, no. 8, p. R89. DOI 10.1186/gb-2013-14-8-r89.

SHALABY, H. A., 2013. Anthelmintics Resistance; How to Overcome it? *Iranian journal of parasitology*. Vol. 8, no. 1, pp. 18–32.

SILVERMAN, P. H. and PATTERSON, J. E., 1960. Histotrophic (Parasitic) Stages of *Hæmonchus contortus*. *Nature*. Vol. 185, no. 4705, pp. 54–55. DOI 10.1038/185054a0.

SKÁLOVÁ, L. et al., 2017. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. ISBN 978-80-246-3733-4.

ŠKARYDOVÁ, L. and WSÓL, V., 2012. Human microsomal carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics: well-known and promising members of the SDR superfamily. *Drug Metabolism Reviews*. Vol. 44, no. 2, pp. 173–191. DOI 10.3109/03602532.2011.638304.

ŠTĚRBOVÁ, K. et al., 2023. Short-chain dehydrogenases in *Haemonchus contortus*: changes during life cycle and in relation to drug-resistance. *Veterinary Research*. Vol. 54, no. 1, p. 19. DOI 10.1186/s13567-023-01148-y.

STUHLÍKOVÁ, L. R. et al., 2018. Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. Vol. 8, no. 1, pp. 50–58. DOI 10.1016/j.ijpddr.2018.01.005.

VATTA, A.F. et al., 2001. Testing for clinical anaemia caused by *Haemonchus* spp. in goats farmed under resource-poor conditions in South Africa using an eye colour chart developed for sheep. *Veterinary Parasitology*. Vol. 99, no. 1, pp. 1–14. DOI 10.1016/S0304-4017(01)00446-0.

VOKŘÁL, I. et al., 2012. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology*. Vol. 139, no. 10, pp. 1309–1316. DOI 10.1017/S0031182012000595.

VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, G., HARDER, A. and SCHNIEDER, T., 2002. Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. *International Journal for Parasitology*. Vol. 32, no. 12, pp. 1529–1535. DOI 10.1016/S0020-7519(02)00163-7.

WILKENS, S., 2015. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports*. Vol. 7. DOI 10.12703/P7-14.

YILMAZ, E. et al., 2017. Comparison of constitutive and thiabendazole-induced expression of five cytochrome P450 genes in fourth-stage larvae of *Haemonchus contortus* isolates with different drug susceptibility identifies one gene with high constitutive expression in a multi-resistant isolate. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. Vol. 7, no. 3, pp. 362–369. DOI 10.1016/j.ijpddr.2017.10.001.

ZAJÍČKOVÁ, M. et al., 2021. Sertraline as a new potential anthelmintic against *Haemonchus contortus*: toxicity, efficacy, and biotransformation. *Veterinary Research*. Vol. 52, no. 1, p. 143. DOI 10.1186/s13567-021-01012-x.

ZARLENGA, D.S., HOBERG, E.P. and TUO, W., 2016. The Identification of *Haemonchus* Species and Diagnosis of Haemonchosis. In : . DOI 10.1016/bs.apar.2016.02.023.

12 Elektronické zdroje

LABGUIDE. Výpočet množství inzertu ligovaného do vektoru. *LabGuide* [online]. [cit. 2024-03-26]. Dostupné z:

<https://labguide.cz/vypocty/ligace-inzertu-do-vektoru/>

MARTIN, K., Gold Biotechnology. Explain Alpha-Complementation and Blue-White Screening To Me Like I'm 10. *GoldBio* [online]. [cit. 2024-03-26]. Dostupné z:

<https://goldbio.com/articles/article/explain-alpha-complementation-and-blue-white-screening-like-im-10>

NOVAGEN. *pET System Manual 11th Edition* [online]. [cit. 2024-03-26]. Dostupné z:

https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/pET-22b-DNA-Novagen,EMD_BIO-69744#documentation

PROMEGA. *Technical manual – pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems* [online]. [cit. 2024-03-26]. Dostupné z:

<https://worldwide.promega.com/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>

13 Přílohy

Nukleotidová kódující sekvence (CDS) – *HCON_00049110 (sdr12)*

ATG**TTTAATACAGGGAAGTTC**TTCGGTCGGACTGTTGTTATCACCGGAGCCTCTCGCGG
GATCGGGAAAGAAATCGCATTGAAGCTGGCAAAGGATGGAGCCAACATCGTCATAGCTG
CTAAAACCGCAACCGCTCATCCGAAGCTGCCGGAACTATCTACACTGCTGCAGAAGAG
GTTGAAAAGGCTGGGGGAAAAGCGTTAGCGTGCATAGTTGACGTGCGTGATGAGGTATC
CGTGCGACAAGCCGTCGAGTCGGCTGTGAAAAAATTCGGCGGAATAGATATACTCATCA
ACAATGCCTCAGCGATTAGTCTCACCAACACTGAAGACACTGAGATGAAAAGATATGAT
CTGATGCATTCGATAAACACAAGAGGAACATTTTTTAATGTCAAAAACCTTGCCTACCGTA
TCTCAAACAAAGCAAAAATGCACATATTTTGAACATTTCCCCACCATTGCTGATGGAAC
CAAGGTGGTTCTCTAACCATGTGGCATATACGATGGCAAAGTATGGTATGTCAATGTGC
GTGCTCGGAATGCATGACGAATTCGGTCGTACGGAGTTGCCGTCAACGCGTTATGGCC
ATTGACGGCGATTTGGACTGCTGCCATGGATATGCTCAGTAATGGCGCCGGTCTTCCG
GCTCACGAAAAGCTGCTATAATGGCAGACGCGGCCTATGCCATGTTGTCAAAAAATAGT
CGTGAATACACTGGTCACTTTGCCATTGACGAGGAAATATTGCGAGCTGAGGGAGTGAC
CGATTTACCAAATACGCCGTTGACCCAGTGCACCCCTGACAGCAGATTTCTTCATTC
CGAATGCTGAGAATTATCCGGAGACGTTTCGTTTATCACGCGAAACACAACCGGCTGCC
AGTTTATCTGGGAAGACCGCTCTAGATGACGATATCGCAAATGTTATAGCGAACATGGA
GAAAAGGCTCTCCAAGGTTTTGGTCGATAAGCTGCAAGCTGTTTTCGAATTCACGCTCA
CAGGTGATAAAGAACGGAAGATCGTTATAGATTTGAAGAATGGGAGTGGATCCATAAGC
GATAGTGGAGACGATCATGCAGATGTCAAGTTTACTTTGGCTGCTGCAGATTTCGCACC
GATGTTCACTGGGAAGCTTACGCCAACGAATGCCTATATGTCAAAGAACTCACAATCA
AGGGTGACATGAGAAAAGCTTTGACACTGGAAAGCGTTCTGAAGGAAAT**GAACAAGAGT**
AAATTGTGA

Červeně je označený start kodon ATG – počátek translace. Modře je označený stop kodon TGA. Zeleně jsou označené sekvence CDS, dle kterých byly navrženy F a R primery pro amplifikaci.