

UNIVERZITA KARLOVA
FARMCEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**KLONOVÁNÍ A PŘÍPRAVA PLASMIDU PRO EXPRESI REDUKTÁZY
Z VLASOVKY SLEZOVÉ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Petra Matoušková, PhD.

Hradec Králové 2024

David Klouček

Prohlášení

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

Tímto děkuji doc. Ing. Petře Matouškové, PhD. za vedení mé diplomové práce, za její ochotu, trpělivost a především cenné rady a informace. Také bych chtěl poděkovat Mgr. Nikole Rychlé za poskytnuté materiály a rady při plnění experimentální části práce. A také děkuji katedře biochemických věd, v čele s prof. Ing. Vladimírem Wsólem, Ph.D., za možnost vykonat u nich diplomovou práci. Diplomová práce vznikla za finanční podpory GAČR 20-14581Y.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: David Klouček

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

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

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je nejvýznamnější patogenní hlístice malých přežvýkavců, zejména ovcí a koz. Způsobuje haemonchózu, v důsledku čehož dochází k masivnímu úhynu nakažených zvířat. Hlavním řešením nákazy je farmakoterapie schválenými anthelmintiky. V současnosti je stále se zvětšujícím problémem narůstající rezistence vlasovky vůči dostupným anthelmintikům, což vede k dopadům ekologickým, tak ekonomickým.

Příčin rezistence vlasovky je několik. Mezi mechanismy rezistence, jiné než v cílové molekule anthelmintika, lze zařadit zvýšenou aktivitu enzymů 1. fáze biotransformace zprostředkovanou karbonyl-redukujícími enzymy. Konkrétně aldoketoreduktázy a dehydrogenázy/reduktázy. Zvýšená aktivita těchto enzymů vede k rychlejšímu metabolismu léčiv, vzniku neúčinných metabolitů a selhání léčby.

Cílem diplomové práce byla příprava plasmidu pro expresi vybrané reduktázy, který může být využit pro další studování aktivity a případně tvorbu nových cílených léčiv. Metody použité v experimentální části byly izolace RNA, reverzní transkripce, PCR, štěpení, ligace, colony PCR, kontrola sekvencí a transfekce buněk pro expresi proteinu.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: David Klouček

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

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

Haemonchus contortus is the most important pathogenic nematode of small ruminants, mostly sheep and goats. It causes haemonchosis leading to massive deaths of infected animals. Pharmacotherapy by approved anthelmintics is the main solution to the disease. Currently, the growing resistance to available anthelmintics is still bigger and bigger problem, leading to economical and ecological issues.

There are many causes of resistance. Among the non-target site mechanisms of resistance belongs the increased activity of enzymes from the first biotransformation phase mediating carbonyl-reduction; specifically aldo/ketoreductases and dehydrogenases/reductases. Increased activity of these enzymes leads to faster drug metabolism, formation of inactive metabolites and therapy failure.

The aim of the thesis was to prepare a plasmid for the expression of selected reductase, which can be used for further study of the activity and possibly design of new targeted drugs. Method, which were used during my experimental work, involved isolation of RNA, reverse transcription, PCR, restriction digest, ligation, colony PCR, plasmid isolation and sequence verification and cell transfection for protein expression.

1 Úvod	9
2 Teoretická část.....	10
2.1. <i>Haemonchus contortus</i> – vlasovka slezová	10
2. 2. Haemonchóza a léčba.....	12
2. 2. 1. Obecná charakteristika nemoci	12
2. 2. 2. Subtypy haemonchózy a jejich projevy	13
2. 2. 3. Diagnóza.....	14
2. 2. 4. Léčba	15
2. 2. 4. 1. Benzimidazoly.....	15
2. 2. 4. 2. Imidazothiazoly/tetrahydropyrimidiny.....	15
2. 2. 4. 3. Organofosfáty	16
2. 2. 4. 4. Makrocyclické laktony (MLs)	16
2. 2. 4. 5. Salicylanilidy a substituované fenoly.....	16
2. 2. 4. 6. Aminoacetonitrilové deriváty.....	17
2. 2. 4. 7. Spiroindoly.....	17
2. 2. 5. Rezistence a její mechanismy	17
2. 2. 5. 1. Benzimidazoly.....	18
2. 2. 5. 2. Imidazothiazoly.....	18
2. 2. 5. 3. Makrocyclické laktony	19
2. 3. Metabolismus xenobiotik	19
2. 3. 1. Karbonyl-redukující enzymy.....	20
2. 3. 2. Aldo-ketoreduktázy (AKRs)	21
2. 3. 2. 1. AKR1A1	23
2. 3. 2. 2. AKR1B10	23
2. 3. 2. 3. AKR1C3	24
2. 3. 2. 4. AKR7A3	25
2. 3. 3. Dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem (SDRs)	26
2. 3. 3. 1. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza (3 β -HSD)	27
2. 3. 3. 2. Retinoldehydrogenáza (RDH)	28
2. 3. 3. 3. Dihydropteridinreduktáza (DHPR).....	28
2. 3. 3. 4. UDP-galaktose-4-epimeráza (GalE)	29
2. 4. SDRs a jiné enzymy u <i>H. contortus</i>	29
2. 4. 1. Fylogeneze a rozložení genů SDR.....	29
2. 4. 2. Exprese SDR v jednotlivých životních stádiích	30
2. 4. 3. SDR a jejich role v lékové rezistenci	30

4 Experimentální část	33
4. 1. Použité chemikálie, vybavení.....	33
4. 1. 1. Chemikálie, reagensie, kity	33
4. 1. 2. Použité vybavení	33
4. 2. Metodika.....	34
4. 2. 1. Amplifikace SDR	34
4. 2. 2. Agarosová elektroforéza (ELFO).....	35
4. 2. 3. Přečištění produktu PCR	36
4. 2. 4. Měření koncentrace DNA.....	36
4. 2. 5. Štěpení	37
4. 2. 6. Ligace a <i>colony</i> PCR	38
4. 2. 7. Sekvenace	40
4. 2. 8. PCR amplifikace, gelová elektroforéza, přečištění a měření koncentrace (2. pokus)	41
4. 2. 9. Ligace do blunt vektoru.....	41
4. 2. 10. Colony PCR (2. pokus)	42
4. 2. 11. Izolace plasmidu a měření koncentrace.....	43
4. 2. 12. Sekvenace vektoru s dsDNA.....	44
4. 2. 13. Štěpení zero-blunt vektoru a pET-22b(+) plasmidu	44
4. 2. 13. Gelová elektroforéza, extrakce z gelu a přečištění	45
4. 2. 14. Ligace SDR3 do pET-22b(+) a colony PCR.....	46
4. 2. 15. MIDIPREP	46
4. 2. 15. 1. Obecný protokol	47
4. 2. 15. 2. Centrifugační protokol.....	47
4. 2. 16. Exprese proteinu	48
4. 2.16. 1. Transformace tepelným šokem	48
4. 2. 16. 2. Měření optické density a indukce exprese.....	49
4. 2. 16. 3. Extrakce proteinu a měření koncentrace	49
4. 2. 16. 4. DotBlot	51
5. Výsledková část	52
5. 1. Amplifikace SDR3 a SDR18.....	52
5. 2. Restrikční štěpení enzymy XhoI a NdeI.....	52
5. 3. Výsledky colony PCR po ligaci	54
5. 4. Výsledky sekvenace PCR.....	54
5. 4. Výsledky amplifikace SDR3 (2. pokus)	56
5. 5. Výsledky colony PCR a měření koncentrace dsDNA v Zero-blunt vektoru	57

5. 6. Výsledky sekvenace Zero-blunt plasmidu s SDR3 dsDNA.....	58
5. 7. Překlonování SDR3 ze sekvenačního do expresního vektoru	59
5. 8. Koncentrace pET-22b(+) a SDR3 po štěpení XhoI a NdeI.....	60
5. 9. Výsledky colony PCR po ligaci dsDNA SDR3 do pET-22b(+)	60
5. 10. Výsledky stanovení proteinu metodou BCA	61
5. 11. Výsledky transfekce metodou DotBlot	62
6 Diskuse	63
7 Závěr	66
8 Seznam použitých zkratk.....	67
9 Seznam použité literatury	69
10 Seznam použitých obrázků.....	76
11 Seznam použitých tabulek	79

1 Úvod

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*, nematoda) je jedním z nejvýznamnějších patogenních červů. Nejčastěji parazituje v gastrointestinálním traktu ovcí a koz. Důsledkem jsou veliké krevní ztráty přežvýkavců a jejich následný úhyn, což má významný ekonomický dopad pro jejich chovatele. Včasná a efektivní léčba je tedy pro zvládnutí nákazy esenciální. Bohužel stále častějším problémem v terapii haemonchózy je masivní rozvoj rezistence k používaným léčivům. Některé mechanismy rezistence jsou společné pro všechny používané skupiny léčiv, některé jsou specifické pouze pro určitou skupinu [1].

K léčbě haemonchózy se používá řada léčiv s různým mechanismem účinku, jednou z nejpoužívanějších skupin jsou benzimidazoly (albendazol, flubendazol). Dále se využívají například makrocyclické laktony, imidazothiazoly či spiroindoly. Karbonyl-redukující enzymy, mezi které patří aldoketoreduktázy a dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem, se studují kvůli jejich možnému zapojení do rezistence *H. contortus* k benzimidazolům, konkrétně k flubendazolu [1].

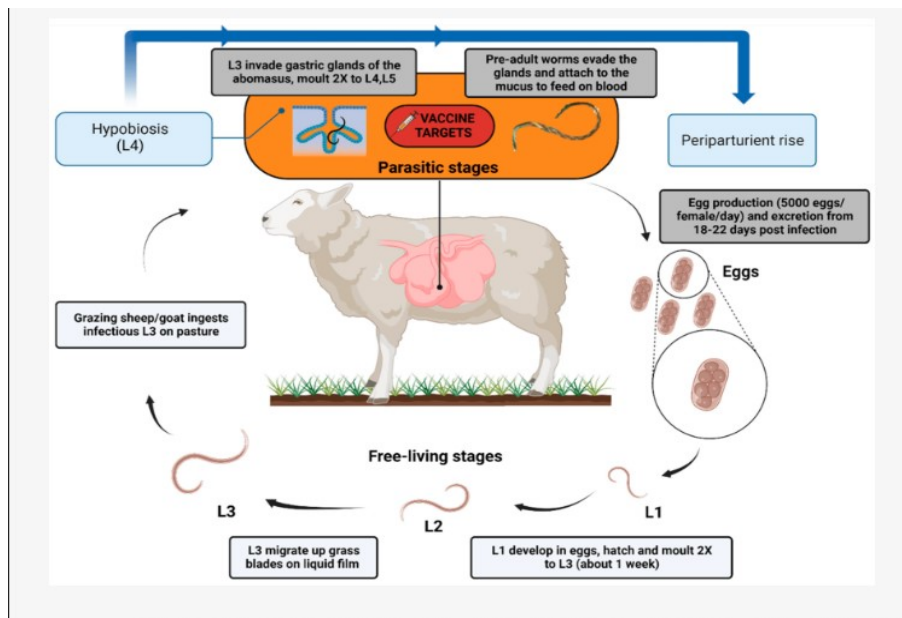
2 Teoretická část

2.1. *Haemonchus contortus* – vlasovka slezová

Haemonchus contortus (vlasovka slezová) je nejčastějším gastrointestinálním parazitem malých přežvýkavců, zejména ovcí a koz. Přičemž dochází k napadení žaludeční mukózy, konkrétně části žaludku zvané slez. Kromě *H. contortus* jsou dalšími častými parazity ovcí *Teladorsagia* a *Trichostrongylus axei* [1; 2].

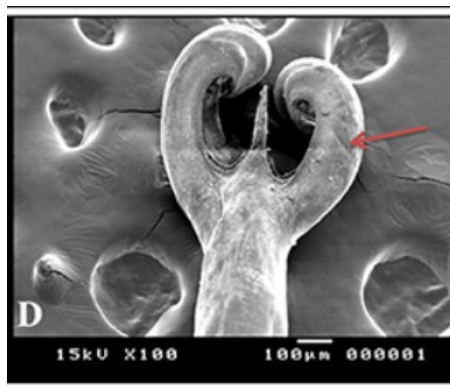
Výskyt *H. contortus* je významně ovlivněn počasím a teplotními podmínkami. Vývoj vajíček a larev probíhá na pastvinách a je limitován na oblasti s vysokou vlhkostí v průběhu teplých měsíců. Obecně lze říci, že prevalence *H. contortus* je vysoká v tropických klimatických zónách na obou hemisférách. Ovšem larvy, v případě nevyhovujících podmínek, mohou přežít mimo tělo hostitele i delší dobu a způsobit tak nákazu mimo běžné, očekávané období. Za to vděčí svému rozmanitému genetickému polymorfismu a specifickým adaptačním mechanismům (hypobioza ve 4. larválním stádiu)[3; 4].

Životní cyklus *H. contortus* (Obr.1) trvá přibližně 17-21 dnů. Infekce začíná, když přežvýkavec pozře larvu v infekčním stádiu L3 – filiariform. L3 forma larev je chráněna ochrannou kutikulou, která zvyšuje šance na přežití v suchých, horkých podmínkách. Následně larvy putují do žaludku a zde se usídlí v slezu. Po odstranění kutikuly dojde k zanoření do vnitřní vrstvy a přeměně do L4, většinou do 48 hodin. V případě nevhodných podmínek, typicky se jedná o zimní období, dochází k jevu zvaný hypobióza. Hypobióza je stav, který umožňuje larvám přežít po určitou dobu a vyčkávat na vhodné podmínky pro opětovný vývoj a přenos. Poté následuje poslední přeměna v dospělého jedince, který přežívá v žaludku sáním krve infikovaného hostitele. Samička *H. contortus* produkuje 5000-15000 vajíček za den. Vajíčka jsou vylučována s trusem. Na pastvinách dochází k vývoji v larvu za přijatelných podmínek, tudíž vysoká vlhkost a teplo. První larvální stádium (rhabditiiform) trvá 4-6 dnů, druhé stádium po odstranění kutikuly přechází v třetí, infekční stádium [5; 6; 7].

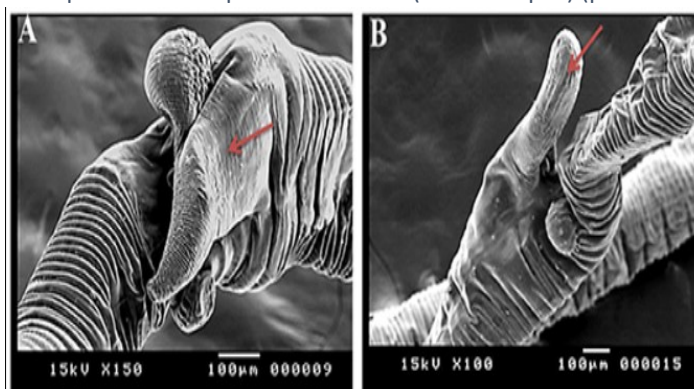


Obr. 1 – Vývojový cyklus *Haemonchus contortus* (převzato z: [5])

Tvar *H. contortus* je cylindrický, samičky dosahují délky 18 až 30mm, samečci jsou kratší, v průměru dosahují 10-20 mm. Díky své schopnosti živit se hostitelovou krví mají mírně načervenalé zbarvení. Sameček je charakteristický asymetrickým zadním lalokem a ocasní částí ve tvaru písmene Y s kopulatoční bursou (Obr. 2). Vulva samiček je pokryta pro ně důležitým krytím, které může být redukováno v malý útvar, podobný kouli (Obr. 3). Obě pohlaví mají na svém povrchu ochrannou kutikulu, jenž je složena z 3 rozdílných vrstev, primárně skládající se z kolagenu [8; 9].



Obr. 2 – Morfologie *Haemonchus spp.* pod elektronovým mikroskopem (sameček)
Samčí ocasní část ve tvaru písmene Y s kopulativní burzou (červená šipka) (převzato z: [8])



Obr. 3 – Morfologie *Haemonchus spp.* pod elektronovým mikroskopem (samička)
Polymorfismus vulvárního krytí u samiče; A – široký, velký plát; B – útvar podobný kouli (převzato z: [8])

2. 2. Haemonchóza a léčba

2. 2. 1. Obecná charakteristika nemoci

H. contortus je nejvíce patogenním parazitem ovcí, důvodem, proč tomu tak je, jsou její schopnosti velmi rychle se množit a také nutnost žít se krví hostitele. Odtud také vyplývá hlavní klinický projev haemonchózy, kterým je anémie. Jejím typickým projevem je palor mukózních membrán. Ten lze pozorovat zejména na spojivkách, které mohou mít barvu od červenorůžové až po bílou v terminálním stádiu nemoci. V průměru dospělý jedinec zapříčiní ztrátu 30 až 50 mikrolitrů krve za den, celkem se krevní ztráty pohybují kolem 30ml krve denně, anémii lze detekovat po 10-12 dnech od nakažení. Závažnost onemocnění tedy závisí na počtu larev, jež jsou požití a vyvinou se v dospěléce a také na individuálním stavu jedince. Nejčastěji se vyskytuje u jedinců, kteří nezískali

přirozenou imunitu, u kojících samic a také u ovcí, kteří se s dosud s *H. contortus* neseťkali (endemické nákazy) [4; 10, 11, 12].

2. 2. 2. Subtypy haemonchózy a jejich projevy

Na základě intenzity lze haemonchózu rozdělit do tří subtypů: hyperakutní, akutní a chronická. Hyperakutní se vyznačuje masivními ztrátami krve (nákaza přes 30 000 jedinců *H. contortus*). Ty ústí v chronickou gastritidu a úmrtí jedince bez předchozích, typických symptomů. Přeživší kusy následně jeví symptomy velmi podobné formě akutní [4; 10; 11; 12; 13].

U akutní formy se anémie rozvíjí delší dobu. K úmrtí jedince zpravidla dochází po 4-6 týdnech od nakažení, záleží na velikosti nákazy. Akutní formu způsobuje 2 000-20 000 jedinců *H. contortus*. Nakažené zvíře jeví známky vyšší únavy, polehává a odmítá pohyb. Při progresi onemocnění se rozvíjí hypoproteinémie kvůli ztrátám krve. Ta vede k rozvoji ventrálního edému a otoku dolní čelisti, tzv. bottlejaw (Obr. 4). Bolest ani průjem nejsou typické. Onemocnění je doprovázeno ložiskovými ztrátami vlny a charakteristickým bílým zbarvením spojivek (Obr. 5) [4; 10; 11; 12; 13].



Obr. 4 – Bílé zbarvení spojivek (převzato z: [13])

Za chronickou haemonchózou označujeme stav, kdy je jedinec nakažen menším, ale perzistentním množstvím parazitů. Běžně se charakteristickými symptomy nevyznačuje, ty se objevují pouze pokud se přijem larev *H. contortus*

zvýší, nebo jsou nastoleny nevyhovující nutriční podmínky pro přežvýkavce. Často jsou doprovázeny jinými parazitárními onemocněními. Typickým projevem je celkové neprospívání jedince. Únava, ztráta hmotnosti. Také můžeme pozorovat sníženou tvorbu mateřského mléka a nižší hmotnost mláďat. Předpokládá se, že velké množství takovýchto nákaz proběhne bez povšimnutí [4; 10; 11; 12; 13].

2. 2. 3. Diagnóza

Včasná diagnóza je klíčovým parametrem zvládnutí haemonchózy, protože jen díky ní lze zahájit léčbu včas. V dnešní době se využívá několik metod založených na různých principech detekce, jež jsou součástí tzv. IPM (integrated parasite management). Cílem je předcházet šíření nemoci a současně minimalizovat chemickou léčbu [4; 14].

V dnešní době je zlatým standardem systém FAMACHA. Vyhodnocuje intenzitu anémie na základě pozorování zbarvení spojivek. Od červenorůžové až po bílou, značí fatální stav. Cílem při zavádění FAMACHA systému bylo získat metodu, která je lehce proveditelná, rychlá, levná a lze díky ní vyšetřit velký počet zvířat. Na základě výsledků vyšetření je pak umožněno podání anthelmintik jen těm jedincům, kteří nákazu nezvládají a hrozí u nich fatální průběh. Díky tomu se jednak zachrání větší počet jedinců ve stádě, na druhé straně se snižuje riziko rozvoje rezistence [4; 14; 15].

Mezi laboratorní metody diagnostiky řadíme FWECs a laboratorní identifikace vajíček a larev v vzorku trusu. FWECs (faecal worm egg counts) se využívají pro měření relativního rizika. Též FWECs nachází uplatnění při diagnóze, pokud nebyla provedena nekropsie, nebo příznaky haemonchózy jsou atypické. Identifikace vajíček a larev je rutinním krokem při diagnostice. V dnešní době je na vzestupu užití molekulární biologie při diagnostice. Nedílnou součástí diagnostické kaskády *H. contortus* je nekropsie. Postmortem nález vede k rychlému a jasnému potvrzení nákazy. Uplatnění nachází zejména při náhlém propuknutí nákazy a úhynu většího počtu jedinců [4; 14; 16].

2. 2. 4. Léčba

Včasně zahájení léčby je v managementu haemonchózy zcela esenciální. Cílem je vyléčení nakažené zvěře a současně prevenovat šíření nemoci a zamezit rozvoji rezistence. Vždy by měla být kombinována chemická léčba s nefarmakologickými postupy. Minimálně 6 jednotlivých skupin účinných látek se využívá proti *H. contortus* a některé se využívají v kombinacích. Nutnost masivního použití anthelmintik vedla k rozvoji rezistence, která dnes velmi komplikuje léčbu. Ovšem účinnost jedné látky se může lišit i na základě regionu, kde je látka použita [4].

2. 2. 4. 1. Benzimidazoly

Thiabendazol byl prvním, masivně používaným širokospektrým anthelmintikem. Jeho výhodou byla bezpečnost, snadné podání a vysoká účinnost. Místem účinku je inhibice polymerizace mikrotubulů vedoucí k smrti parazita. Od 70. let se stále používají další deriváty benzimidazolu, těmi jsou albendazol, fenbendazol, kambendazol a oxibendazol, v některých zemích se využívají i thiofanát a netobimin (pozn. febantel a netobimin jsou tzv. pro-benzimidazoly, čili proléčiva, která jsou až po aplikaci metabolizována v aktivní účinnou látku). Dnes nejvíce používanými jsou právě albendazol, fenbendazol a jejich sulfoxidové deriváty. Bohužel jejich samostatné použití nepřináší kýžený efekt z důvodu vyvinuté rezistence. Používány jsou zejména v kombinacích s jinými skupinami anthelmintik [4; 17].

2. 2. 4. 2. Imidazothiazoly/tetrahydropyrimidiny

Skupina širokospektrých léků, která byla zavedena do terapie jako druhá v pořadí po benzimidazolech. Jedná se o agonisty nikotinových a antagonisty acetylcholinových receptorů. Nejvíce používaným je levamisol, v určitých oblastech je stále užíván morantel pro léčbu ovcí. Stejně jako u benzimidazolů je problémem novodobé terapie rostoucí rezistence [4; 18].

2. 2. 4. 3. Organofosfáty

Organofosfáty zastávaly specifickou roli v terapii parazitárních onemocnění. *H. contortus* jeví vyšší citlivost vůči této skupině než jiný helminti. Tudiž uplatnění nacházely v případech, kdy nešlo použít jiná anthelmintika z důvodu rezistence. Používanými léčivy byly naftalafos, triclofon a pyraclyfos. Nevýhodou je jejich vyšší toxicita pro infikované zvíře, působí totiž jako inhibitory acetylcholin esterázy, z tohoto důvodu se dnes již nepoužívají. Uvádím je pouze kvůli jejich postavení v terapii z historického hlediska [4].

2. 2. 4. 4. Makrocyclické laktony (MLs)

Makrocyclické laktony jevíly při zavedení vysokou účinnost proti hlístům a dokonce ektoparazitům. Dnes, stejně jako u předešlých skupin, jejich účinnost klesá. Narušují nervový přenos parazitů potenciací glutamátém otevíraných chloridových kanálků. Tento proces vede k nadměrné excitaci a paralýze jedince. V závislosti na jejich farmakokinetice a farmakodynamice může kombinace více MLs vyústit v synergismus, či antagonismus. Výhodou je jejich bezpečnost. Ze zástupců jsou používány avermektin, milbemycin, ivermektin a moxidectin [4; 18; 19].

2. 2. 4. 5. Salicylanilidy a substituované fenoly

Skupina čítající velký počet molekul. U haemonchózy nachází největší uplatnění klosantel, rafoxanid a disfenol a nitroxynil, poslední dva musí být aplikovány injekčně. Tyto 4 molekuly jeví úzké spektrum, cílené zcela na helminty živící se krví. Inhibují energetický metabolismus, narušují oxidativní fosforylaci helmintů [4; 18].

2. 2. 4. 6. Aminoacetonitrilové deriváty

Monepantel byl zaveden v roce 2009. Díky specifickému účinku na nikotin-acetylcholinových receptorech (váže se na podjednotku Hco-MPTL-1) a mechanismům podobným ML bylo dosaženo nové efektivní terapie. Důsledkem je nadměrná kontrakce svaloviny hlístic a jejich úmrtí. Účinný je proti larvám i dospělým jedincům *H. contortus*. Výhodou je dosavadní nízká, avšak narůstající rezistence [4; 20; 21].

2. 2. 4. 7. Spiroindoly

Derquantel je používán pouze v kombinaci s abamektinem. Jedná se anatagonistu B-typu nikotinových cholinergních receptorů. Díky účinku na B-subtypu receptoru je účinný i proti hlístům jinak rezistentním vůči jiným anthelmintikům. Nejvyšší účinnost dosahuje proti dospělcům a L4 stádiu *H. contortus*. Tato kombinace je stále předmětem intenzivního výzkumu [4; 20].

2. 2. 5. Rezistence a její mechanismy

Rezistenci lze definovat jako stav, kdy daný organismus je schopný odolat definované dávce léčiva, která by pro jiné, nerezistentní jedince byla smrtelná. Zjednodušeně lze říci, že účinnost používané účinné látky (API) se snižuje v porovnání s účinností při jejím zavedení do terapie. Existují dva typy rezistence – nespecifická a specifická. Hlavním zprostředkovatelem nespecifické imunity jsou efluxní transportéry. Ty svým fungováním limitují a snižují koncentraci léčiva v buňce bez ohledu na jejich strukturu, místo účinku. Druhým typem je rezistence specifická, která je vázaná na jednotlivé skupiny léčiv. Zprostředkována je řadou různých mechanismů. V praxi hlavní roli hraje právě rezistence specifická. To je také důvodem, proč je racionální použití kombinace léčiv různých lékových skupin, rozšiřuje se tak spektrum účinku. Bohužel dnes pozorujeme případy extenzivní rezistence u *H. contortus*. V Queenslandu, Austrálii, byly pozorovány

multirezistentní druhy vůči třem hlavním lékovým skupinám (benzimidazoly, imidazothiazoly a MLs.)[22; 23; 24].

Výzkum rezistence tak jde ruku v ruce s vývojem nových APIs. Dva aspekty komplikují zkoumání rozvoje rezistence. Prvním aspektem je, že rezistence se může vyvinout bez ohledu na výsledky laboratorního zkoumání. Druhým je genetická predispozice a vnější podmínky působící v dané lokalitě (farma, chov), jež mohou vést k rozvoji místně specifické rezistence a jejího mechanismu odlišného od obecně známých jevů [22; 23; 24].

2. 2. 5. 1. Benzimidazoly

Místem účinku benzimidazolů je zastavení polymerizace mikrotubulů vazbou na β -tubulin. Odtud také vyplývá základní mechanismus rezistence, kdy u rezistentních kmenů se snižuje počet vazeb mezi léčivem a cílovou strukturou, kterou je konkrétně isotyp -1- β -tubulin. Primárním důvodem zisku rezistence je záměna rezidua Tyr za Phe na 200. místě v proteinovém řetězci (Obr. 6), označován jako F200Y SNP. Dalšími dvěma mutacemi na isotypu-1, které byly popsány, jsou F167Y a E198A, jejich výskyt ale není tak signifikantní jako F200Y [22; 25; 26].

```
5'ATAACGTATTAGACGTTGTCCGCAAAGAAGCTGAAGGTTGTGATTGCCTTCAGGGCTTCCA
ATTGACGCATTCACCTTGGAGGAGGCACTGGATCTGGAATGGAAATTCGTGAAGAGTACCCT
GATAGAATTATGGCTTCGTTCTCCGTTGTCCATCACCCAAGGTATCCGACACTGTCGTAGA
      167
      TAC
ACCCTACAATGCTACCCTTTAGAACACCGATGAAACATTCTGTATTGACAACGAAGCTCT
      198      200
      GCA      TAC
GTATGATATCTGCTTCCGCACTTTGAACTCACAAATCCAACCTATGGAGA 3'
```

Obr. 5 – Část DNA kódující β -tubulin s vyznačenými mutacemi zodpovědnými za rozvoj rezistence (převzato z: [25])

2. 2. 5. 2. Imidazothiazoly

Nejpravděpodobnější příčinou rezistence k imidazothiazolovým derivátům se jeví změny na cholinergních nikotinových receptorech (nAChR).

Levamisol se váže na dvou aktivních místech na nAChR a u levamisol-rezistentních jedinců bylo zjištěno, že na vazebném místě s nižší afinitou se levamisol váže výrazněji méně než u nerezistentních jedinců na témže místě. Na molekulární úrovni lze popsat tři hlavní příčiny. První je zkrácení podjednotek genů pro nAChR (Hco-unc-63 a Hco-acr-8). Druhým důvodem je snížená transkripce podjednotek genů pro nAChR, konkrétně podjednotky Hco-unc-29.3 a Hco-unc-63. Dále bylo u rezistentních kmenů *H. contortus* zaznamenáno snížení exprese genů (Hco-unc-74,-unc-50,-ric-3.1 and-ric-3.2) potřebných pro správnou konformaci a funkčnost nAChR. Nejedná se ale o univerzální zdroje rezistence, což naznačuje, že důvodem rezistence levamisolu mohou být jiné, různé mechanismy [22; 27].

2. 2. 5. 3. Makrocyclické laktony

Příčin rezistencí k MLs je zdokumentováno několik, avšak stále se přesně neví, co je hlavním důvodem sníženého účinku těchto látek. Zde zmíním několik příkladů možné insenzitivity *H. contortus*. Zvýšená četnost alel pro α -podjednotku GluCl, změny na GABA receptorech, snížený transkripce genů pro GluCl (glc-3 a glc-5) a také zvýšená exprese P-gp. Ivermektin jeví specifické postavení, protože právě *H. contortus* je výrazně více citlivý vůči ivermektinu. Příčinou je přítomnost zbytku Gly na třetí doméně GluCl, méně senzitivní druhy mají na tomto místě zbytek větší. Tudiž mutace Gly zbytku vedla k nárustu rezistence [22; 28; 29].

V roce 2014 byl nalezen další možný důvod rezistence, jedná se o anatomickou a funkční změnu, defekt amfid. Polymorfismus genu Hco-dyf-7 je příčinou této rezistence a jeho přítomnost byla zpozorována u řady rezistentních vzorků z celého světa [22; 28; 29].

2. 3. Metabolismus xenobiotik

Metabolismus léčiv je klíčový faktor ovlivňující účinnost léčiv. Podstatou metabolismu je tvorba hydrofilnějších derivátů léčiva za účelem jejich zvýšené exkrece. Při metabolismu látky může dojít k řadě možným jevům, avšak nejčastěji

chemickou reakcí vzniká látka s výrazně redukovanou aktivitou. Nebo může vznikat látka se zachovalou aktivitou, příkladem je přeměna kodeinu na morfin. Ve specifických případech vznikne látka s aktivitou výrazně vyšší, toho lze využít při přípravě proléčiv, např. mykofenolát-mofetil, klopidogrel. Nebo metabolizací může vzniknout produkt s významně toxickým účinkem pro organismus, jako je tomu u přeměny paracetamolu na N-acetyl-p-benzochinon-imin (NAPQI) [30; 31; 32].

Metabolismus léčiv probíhá ve dvou fázích. V I. fázi biotransformace dochází k zavedení či obnažení polární funkční skupiny (-OH, -SH, -NH₂, COOH, -O) do struktury léčiva. Polarita molekuly se zvyšuje pouze mírně, ale funkční skupina následně slouží v druhé fázi metabolismu pro konjugaci. I. fáze zahrnuje reakce oxidační, redukční a hydrolytické. Pro člověka má nejvyšší význam oxidační reakce, katalyzována cytochromem P450. Sem řadíme hydroxylaci, o-dealkylaci, N-oxidaci a oxidaci alkoholové skupiny na karboxylové kyseliny. Základními reakcemi reduktivního charakteru jsou azo-, nitro- a keto-redukce. Posledním typem reakcí jsou hydrolytické, při kterých dochází k hydrolýze esterů či amidů za uvolnění příslušných funkčních skupin (-OH či -NH₂) [30; 31; 32].

II. fáze je nazývána fází konjugační. Principem je konjugace vzniklého produktu z I. fáze s endogenním substrátem. Vzniká tak produkt výrazně hydrofilní s minimalizovanou farmakologickou aktivitou. Nejčastějším typem konjugačních reakcí je glukuronidace, kdy probíhá navázání kyseliny glukuronové s -OH, NH₂, nebo -COOH skupinou. Dále se můžeme setkat se sulfatací, při které do reakce vstupuje PAPS (fosfoadenosin-fosfosulfát). Minoritními reakcemi jsou pak N-acetylace, methylace či konjugace např. s AMK, glutathionem [30; 31; 32].

2. 3. 1. Karbonyl-redukující enzymy

S ohledem na téma své práce nyní více rozvedu karbonyl-redukující enzymy (CBRs), neboli karbonylreduktázy. Jedná se skupinu enzymů patřící do skupiny oxidoreduktáz, zahrnující dvě nadrodiny – aldo-ketoreduktázy (AKRs) a small chain dehydrogenases/reductases (SDRs), neboli dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem [33; 34].

Podílejí se na celé řadě reakcí, jak endogenních procesů, tak metabolismu xenobiotik. Lze je charakterizovat jako nízkomolekulární, monomerické a v cytosolu se nacházející NADPH-dependentní enzymy (Obr. 7). Principem reakce je redukce karbonylové skupiny substrátu za současně oxidace NADPH, který vystupuje jako katalyzátor reakce. Reakci lze schematicky vyjádřit jako $R-CO-R' + NADPH + H^+ \rightarrow R-CHOH-R' + NADP^+$. Ve většině případů se jedná o reakci ireverzibilní. CBRs byly nalezeny ve tkáni savců, rostlin, hub, kvasinek, bakterií, ryb. U savců se nacházejí v různých tkáních, například v mozku, játrech, nadledvinkách [33; 34; 35].



Obr. 6 – Krystalická struktura lidské CBR1 v komplexu s hydroxy-PP (převzato z PDB)

2. 3. 2. Aldo-ketoreduktázy (AKRs)

Jedná se o nadrodinu karboonylreduktáz. Jsou zodpovědné za metabolismus prostaglandinů, steroidů, biogenních aminů či chinonových derivátů. Aktivací polycyklických aromatických trans-dihydrodiolů vedou k vzniku reaktivních o-chinonů účastnících se kancerogenních pochodů při kouření tabáku. Na straně druhé neutralizují nitrosaminketony odvozené od nikotinu či aflatoxiny. Aktivita CBRs je také úzce spjatá s rezistencí k chemoterapeutikům při léčbě onkologických onemocnění [36; 37; 38].

Celkově existuje 16 rodin AKRs, přičemž 15 z nich je přítomno v lidském organismu. Aby se předešlo chybám při zařazování, pojmenovávání, tak byla zavedena jednotná nomenklatura. Název vždy začíná jako AKR následující arabskou číslicí určující konkrétní rodinu (s >40% shodou v AMK řetězci). Dále písmeno označující podrodinu a číslice jí specifikující (shoda s AMK 60% a více)[36; 37; 38].

Gene	Protein Names (Aliases)	Chromosomal Localization
AKR1A1	Aldehyde reductase; dihydrodiol dehydrogenase 1	1p33–p32
AKR1B1	Aldose reductase	7q35
AKR1B10	Small intestine–like aldose reductase; 9-cis-retinal reductase	7q33
AKR1B15	3-Keto-acyl CoA reductase	7q33
AKR1C1	3 α (20 α)-Hydroxysteroid dehydrogenase; dihydrodiol dehydrogenase 1	10p15–10p14
AKR1C2	3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase type 3; dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid–binding protein	10p15–10p14
AKR1C3	3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2; 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5; prostaglandin F synthase; dihydrodiol dehydrogenase X	10p15–10p14
AKR1C4	3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1; dihydrodiol dehydrogenase 4; chlordecone reductase	10p15–10p14
AKR1D1	Steroid 5 β -reductase	7q32–7q33
AKR1E2	1,5-Anhydro-D-fructose reductase	10p15
AKR6A3	Potassium voltage gated channel β -subunit-1	3q26.1
AKR6A5	Potassium voltage gated channel β -subunit-2	1p36.3
AKR6A9	Potassium voltage gated channel β -subunit-3	17p13.1
AKR7A2	Aflatoxin aldehyde reductase	1p35.1–p36.23
AKR7A3	Aflatoxin aldehyde reductase	1p35.1–p36.23

Obr. 7 – Přehled lidských AKRs a jejich lokalizace na konkrétním chromozomu (převzato z [37])

K dnešku je v PDB zařazeno 84 struktur AKRs, které sdílí společné rysy. Základem je typické složení proteinů, které formují (α/β)-barel. V něm 8 α -helixů se střídá s 8 β -řetězci. β -řetězce splývají v jádře barelu a vytvářejí jeho oporu. Ze zadní strany struktury se nachází 3 neuspořádané smyčky, které podstupují konformační změnu po navázání kofaktoru a karbonylové funkční skupiny substrátu. Místo vážící kofaktor si zachovává striktní prostorovou konformaci. Nikotinamidová funkční skupina je v anti-konformaci vůči ribose a vodík, který redukuje karbonylovou f. skupinu je vždy 4-pro-R. Na spodu barelu se nachází specifická katalytická tetráda, která také nemění svůj tvar. Díky flexibilitě zmiňovaných tří smyček je zajištěna široká substrátová specifita [36; 37; 39].

Avšak pro lidské AKRs existuje i několik výjimek. AKR6 rodina nejsou enzymem, nýbrž kontrolují transport K^+ iontů. Ne všechny AKRs jsou oxidoreduktázami, AKR1D1 mají pozměněnou katalytickou tetradu (His zaměněn za Glu), v důsledku toho redukují dvojnou vazbu v steroidním skeletu. Také neplatí, že všechny AKRs jsou monomerní struktury, β -řetězce AKR6 rodiny existují jako tetramery, také se objevují teorie, že AKR7 rodina je dimerní [36; 37; 39].

2. 3. 2. 1. AKR1A1

AKR1A1 je složen z 325 aminokyselin. Katalyzují redukci alifatických i cyklických aldehydů, jeví zvýšenou aktivitu k negativně nabitým substrátům, například glukoronát, sukcinát-semialdehyd. Hlavní místo výskytu v těle jsou játra, zde katalyzují reakci vedoucí k vzniku mevalonátu (meziprodukt při syntéze cholesterolu) a ledviny, dále také v mozkové kůře či tenkém střevě. V menší míře je exprimován také v plicích, slezině. Nenachází se v srdeční a kosterní svalovině. Existují důkazy, že aktivita AKR1A1 přímo ovlivňuje buněčnou signalizaci pomocí NO. Dochází k tomu přes redukci GSNO, tudíž AKR1A1 zde vystupuje jako S-nitrosoglutathion reductáza. Také je prokázána souvislost mezi aktivitou enzymu a vznikem rakoviny plic. Předpokládaným mechanismem je aktivace polycyklických aromatických uhlovodíků PAH vedoucí k vzniku reaktivních forem kyslíku ROS. Aktuální studie také poukazují na souvislost mezi deplecí AKR1A1 a schizofrenií rezistentní k léčbě. AKR1A1 redukuje glukoronát (GlucA), který zvyšuje sekreci řady léčiv. Předpokládá se tedy, že nižší aktivita AKR1A1 vede k zvýšené hladině GlucA a tím k zvýšené depleci psychofarmak podávaných u schizofrenních pacientů [40; 41; 42; 43].

2. 3. 2. 2. AKR1B10

AKR1B10 se primárně vyskytuje v žaludku, tenkém a tlustém střevě, specificky v rychle se obnovujících epitelálních buňkách. Redukuje řadu endogenních sloučenin, například retinoidy, isoprenylové aldehydy či peroxolipidy poškozující lidské buňky. Kromě toho metabolizují řadu xenobiotik (primárně

dolasteron a nabumeton, dále také daunorubicin, doxorubicin a kyselinu tiaprofenovou), jako jsou léky nebo PAH. AKR1B10 katalyzuje redukci retinalu za vzniku retinolu, což je první krok při syntéze kyseliny retinové. Kyselina retinová hraje stěžejní roli při buněčné proliferaci, diferenciaci a morfogenezi řady buněk. AKR1B10 tak zajišťuje homeostázu retinoidů v GIT tkáních, mimo GIT je metabolismus retinoidů zajištěn jinými enzymy. Dále jsou popsány tři základní funkce AKR1B10, které jsou nezávislé na enzymatické aktivitě. Těmi jsou ovlivnění syntézy lipidů/mastných kyselin v nádorových buňkách RAO-3 u karcinomu prsu, kde interagují s acetyl-CoA karboxylázou a tím zamezují proteolýze a zvyšují syntézu lipidů. Také interagují s shock proteinem 90 α . Také je prokázána interakce s glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázou, což vede k snížené aktivitě autofágů [44; 45].

Jak jsem zmiňoval výše, největší aktivita enzymu je měřena v GIT. Naopak snížená aktivita AKR1B10 je prokázána v rakovinových lézích tlustého střeva, žaludku a u pacientů s ulcerózní kolitidou a Crohnovou nemocí. AKR1B10 je esenciální při ochraně jaderné DNA. Dalšími nemocemi, které jsou naopak spojené s vyšší aktivitou AKR1B10 jsou například hepatocelulární karcinom, nealkoholické ztukovatění jater, rakovina plic, prsu či pankreatu. Do budoucna se uvažuje nad využitím AKR1B10 inhibitorů při terapii těchto nemocí, nebo nádorů rezistentních k léčbě [44; 45].

2. 3. 2. 3. AKR1C3

AKR1C izoformy katalyzují redukci na pozici C3, C5, C17 a C20 steroidního jádra. AKR1C3 navíc katalyzuje přeměnu prostaglandinů H2 a D2 na jejich aktivní formu, proto bývá označován i jako PGF syntáza. AKR1C3 vykazuje nejvyšší katalytickou aktivitu z rodiny AKR1C při přeměně testosteronu na androsten-3,17-dion, reversibilně redukuje 5 α -DHT, estrogen a progesteron[46; 47].

Místy s nejvyšší koncentrací enzymu jsou játra a prostata. Zvýšené hodnoty AKR1C3 jsou spojovány s rozvojem kastračně rezistentním karcinomem prostaty (CRPC) a též slouží jako biomarker progresu karcinomu prostaty. Existují i popsané případy adenokarcinomu a spinocelulárního karcinomu vycházejícího z plic a

z gastroezofageální spojky, u kterých byla prokázána vyšší aktivita zmiňovaného enzymu. Kvůli přeměně prekurzorů progesteronů na jeho aktivní metabolit je enzym spojován s nejčastějším ženským nádorovým onemocněním, karcinomem prsu. AKR1C3 je ve velmi vysoké míře exprimován v nádorových buňkách a jeho zvýšené hodnoty souvisí s horší prognózou pacientek[46; 47].

Pro tyto důvody se enzym AKR1C3 jeví jako potencionální cíl chemoterapeutik u pacientů s CRPC a estrogen-pozitivním karcinomem prsu. Inhibitory tohoto enzymu jsou například nesteroidní antiflogistika (NSAIDs), analoga steroidních hormonů, flavonoidy a deriváty sulfonylurey (DSU). Většina inhibitorů jsou karboxylové kyseliny, jež musí být aktivním transportem přenášeny do buněk, proto je cílem syntetizovat inhibitory bez -COOH funkční skupiny. Protože jsou enzymy AKR1C1 a C3 velmi podobné, je žádoucí, aby připravovaná léčiva nevykazovala zkříženou substrátovou specifitu[46; 47].

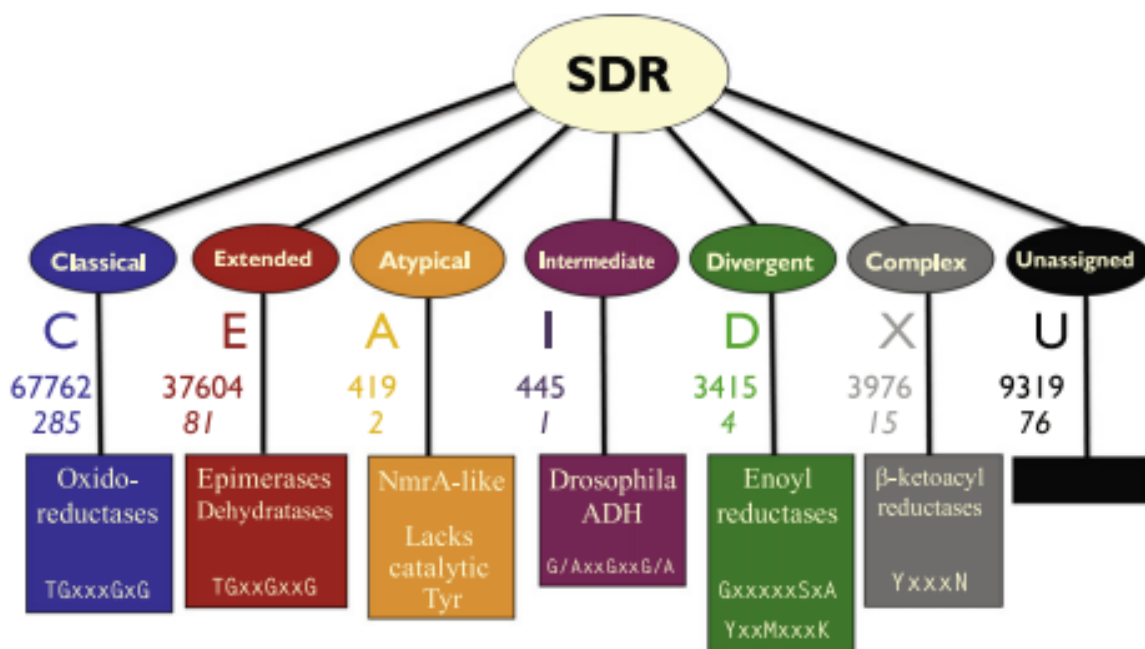
2. 3. 2. 4. AKR7A3

AKR7A3 je relativně neprobádaný enzym, většina studií o jeho funkci jsou z posledních deseti let. Stejně jako u předchozích enzymů se předpokládá jeho role v nádorovém bujení. AKR7A3 je v lidském těle zodpovědný za detoxifikaci aflatoxinu B1, silného hepatokarcinogenu. Gen pro tento enzym se nachází na chromosomu 1p36, hypermetylace promotoru genu a zkrácení chromosomu jsou faktory, které jsou spojovány s downregulací AKR7A3. AKR7A3 inhibuje aktivaci ERK, c-Jun a NF-kappaB faktorů, vystupuje tedy jako tumor-supresorový faktor. Zvýšená hladina enzymu. Nízká hladina AKR7A3 je spjata s zvýšenou hladinou alfa-1-fetoproteinem, nízkou úrovní diferenciací nádorových buněk a tudíž i horší prognózou pacientů s HCC, existují i důkazy pro jeho protektivní faktor u pacientek s nádorem prsu. Snížená hladina AKR7A3 koreluje s horší prognózou a sníženou dobou dožití u pacientů s nádorem štítné žlázy, přesný mechanismus zde není znám, ale předpokládá se ovlivnění autofágie a zpomalení metastatického šíření nádorových buněk [48; 49].

2. 3. 3. Dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem (SDRs)

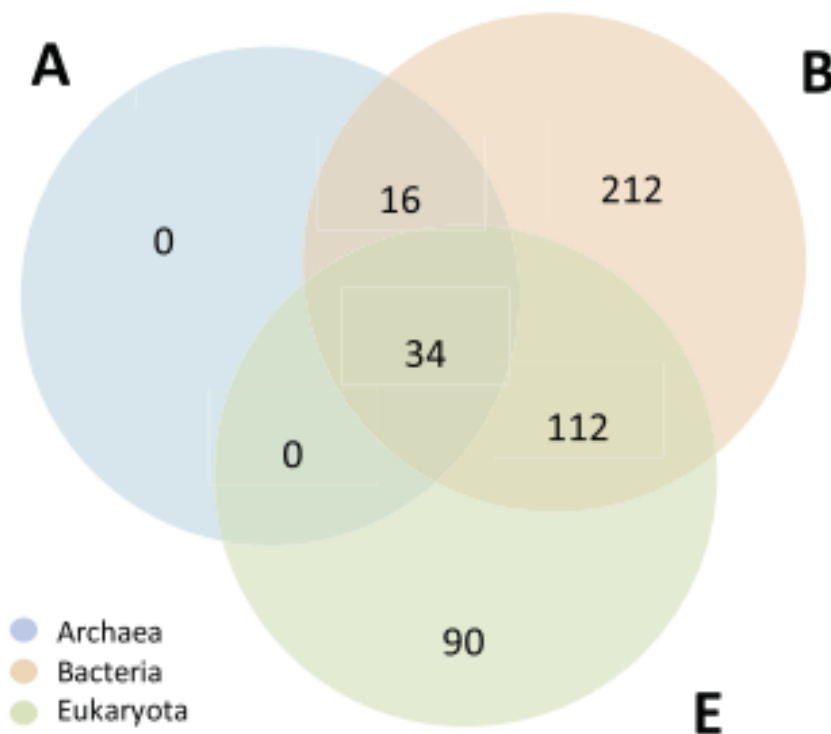
SDRs představují jednu z největších nadrodin enzymů vůbec. Napříč všemi druhy sdílí podobnost aminokyselinové sekvence 20 až 30%. Základem struktury je jednodoménový Rossmanův záhyb s centrálními β -listy složenými mezi třemi α -helixy na každé straně. Mohou být monomerní, dimerní, nebo tetramerní struktury. Běžně jsou tvořeny 250 aminokyselinovými zbytky, výjimečně lze nalézt zástupce s prodlouženým C-koncem, jež mohou být tvořeny až 350 rezidui aminokyselin. Aktivní místo enzymu je tvořeno katalytickou tetrádou – Tyr, Lys, Ser a Asn. Na rozdíl od jiných dehydrogenáz nevyžadují vazbu kovového prvku v aktivním místě enzymu pro průběh reakce. Koenzym vážící místo se nachází na N-konci řetězce a SDRs vykazují značnou substrátovou specifitu [50].

SDRs dělíme do 7 základních skupin (Obr. 9). Největší množství zástupců spadá mezi klasické SDRs – cca 68000 zástupců. Druhou nejpočetnější jsou prodloužené SDRs s více než 37000 enzymy [50].



Obr. 8 – 7 druhů SDRs. Horní číslo specifikuje počet zástupců, spodní číslo počet rodin. Pod nimi je specifikována aktivita jednotlivých skupin (převzato z: [50])

Většina SDRs rodin je přítomna v bakteriích, dále potom v eukaryotních organismech. Pouze minimum rodin lze nalézt v archeobakteriích – Archea. 212 rodin je specifických pouze pro prokaryota, pro eukaryota pouze rodin 90 (Obr. 10). V lidském organismu existuje a je zdokumentováno 47 SDR rodin [50].



Obr. 9 – Rozložení SDR rodin mezi Archea (A), prokaryota (B) a eukaryota (E). 34 rodin se nachází napříč všemi druhy, naopak neexistuje typický zástupce pro Archea (převzato z: [50])

2. 3. 3. 1. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza (3 β -HSD)

3 β -hydroxysteroid dehydrogenáza je enzym z SDR rodiny, který je vázaný na membráně endoplazmatického retikula a mitochondrií. V lidském těle se nachází v řadě tkání v závislosti na konkrétní izoformě. HSD1 lze najít v mléčných žlázách, placentě a kůži, HSD2 v nadledvinkách, vaječnicích a varlatech [51; 52].

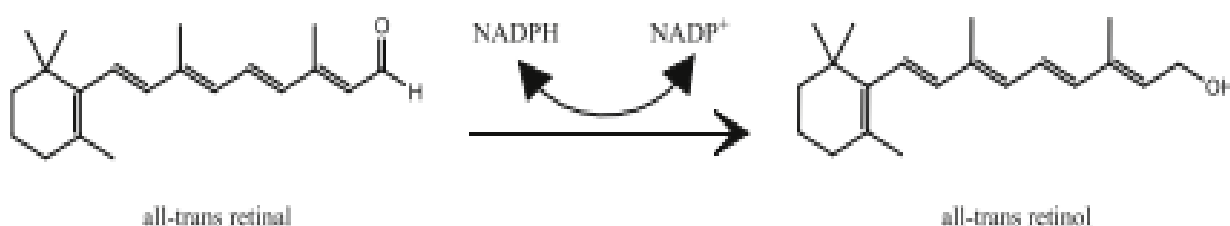
3 β -HSD je klíčovým enzymem při syntéze steroidních hormonů, konkrétně glukokortikoidů, mineralokortikoidů, progesteronu, androgenů i estrogenů. Na druhé straně také katalyzují rozkladné reakce 5 α -androstanu a 5 α -pregnanu, to ovšem záleží na rozdílné tkáňové lokalizaci – Leydigovy buňky vs. hepatocyty [51; 52].

Zvýšená aktivita 3 β -HSD1 je zjišťována u pacientek s karcinomem prsu, a proto se do budoucna uvažuje nad užitím inhibitorů jako potenciálních léčiv. Vývoj byl dlouho zpožděn strachem, že bude docházet k inhibici i izoformy HSD2, což by vedlo k depleci kortizolu a aldosteronu. Bylo ale prokázáno, že inhibitory trilostan a epostan vykazují výrazně vyšší afinitu k 3 β -HSD1 [51; 52].

2. 3. 3. 2. Retinoldehydrogenáza (RDH)

Existuje několik druhů RDH, zmíním se zde o dvou momentálně zkoumaných formách. RDH12 je enzym zodpovědný za několik kroků enzymatických reakcí vedoucích k vzniku zrakového pigmentu, 11-cisretinalu (Obr. 11). Jeví vyšší afinitu k retinalaldehydům než k retinolům, nejvyšší afinitu vůbec vykazuje k všem trans-retinalum. RDH12 je kódována 7 exony, skládá se z 316 aminokyselinových zbytků a nejvíce je exprimována ve vnitřním segmentu fotoreceptorů, nachází se ale také v kůži, játrech a ledvinách. Mutace RDH12 jsou spojovány se vznikem LCA (Leber congenital amaurosis) [53; 54].

Nově zkoumaným enzymem je RDH10. Jeho snížené hladiny a narušení metabolismu retinolu vedou k zrychlení poškození myokardu a rozvoji kardiomyopatie při současně rozvinutém diabetu mellitu II. typu. Předpokládaným mechanismem je navozená kardiotoxicita vysokou hladinou retinolu a lipotoxicita a následná ferroptosa z důvodu nízkých hladin trans-retinových kyselin [53; 54].



Obr. 10 – Mechanismus reakce RDH12 (převzato z: [53])

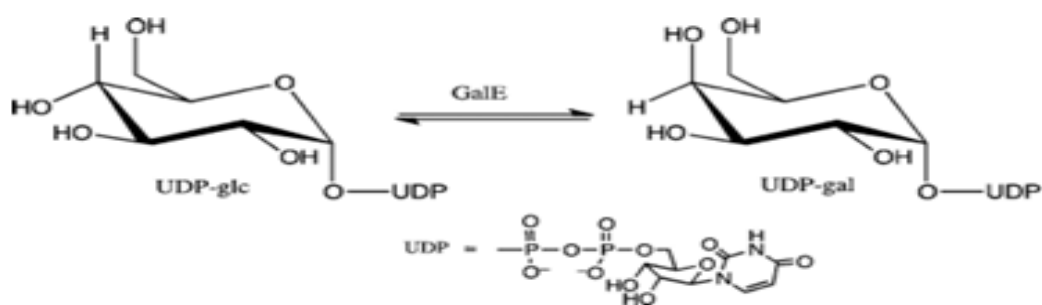
2. 3. 3. 3. Dihydropteridinreduktáza (DHPR)

DHPR je enzym z rodiny SDR, který se účastní a zajišťuje přeměnu tetrahydrobiopterinu (BH₄) na dihydrobiopterin (BH₂). BH₄ je esenciální,

neproteinový kofaktor hydroxylace Phe, Tyr a Trp. Při nedostatku BH4 je narušena a snížena ona hydroxylace ústící k hyperfenylalaninemii (HPA). Negativně ovlivněna je i funkce serotoninového a dopaminového systému. HPA je marker indikující rozvinutou fenylketonurii [55].

2. 3. 3. 4. UDP-galaktose-4-epimeráza (GalE)

GalE je naprosto esenciální enzym pro metabolismus galaktosy v lidském těle. Vyskytuje se všech zdravých buňkách lidského těla. Jako jediný enzym je schopný katalyzovat přeměnu mezi glukosylovými a galaktosylovými zbytky, konkrétně konverzi uridindifosfo- α -D-glukosy na uridindifosfo- α -D-galaktosu (Obr. 12). Nedostatek GalE se projevuje jako galaktosémie, autosomálně recesivní onemocnění. Takto vzniklá galaktosémie může mít 3 formy: generalizovaná, pokročilá a periferní. Poslední dvě zmiňované jsou téměř bezpříznakové, liší se aktivitou GalE v různých tkáních. U pokročilé formy je výrazně snížena jaterní aktivita GalE. Nejzávažnější formou je generalizovaná, kde aktivita GalE je snížena ve všech tkáních a projevuje se charakteristickými symptomy galaktosémie [56; 57].



Obr. 11 – Epimerizace UDP-glc na UDP-gal katalyzováno GalE (převzato z: [56])

2. 4. SDRs a jiné enzymy u *H. contortus*

2. 4. 1. Fylogeneze a rozložení genů SDR

Fylogenetická analýza SDR rodiny *H. contortus* společně s ovčími proteiny poukazuje na existenci více SDR předchůdců před rozdělením organismů.

Rozdělení genetické informace pro SDR je relativně rovnoměrné. Nejvíce sekvencí (15) se nachází na chromozomu 4, následuje chromozom 2 a 5 (10 a 9 genů). Chromozomy 3 a X nesou pouze dva SDR úseky [58].

2. 4. 2. Exprese SDR v jednotlivých životních stádiích

Exprese se liší výrazně, a to jak v závislosti na druhu SDR, tak na životním stádiu parazita a pohlaví. Ve vajíčkách jsou nejvíce zastoupenými izoformy SDR6, SDR14 a SDR18. V larválním stádiu mají dominantní postavení SDR1, SDR3 a SDR18. Celkový počet dosud známých genů kódujících SDR je 46, u AKRs je to pouze 24 [58; 59].

U dospělců obou pohlaví SDR3, SDR5 a SDR18 jeví nejvyšší míru exprese. SDR5 bylo ve vyšším zastoupení u samců, naopak u samic se ve větší míře vyskytuje SDR18 [58; 59].

Vůbec největší míru exprese SDRs vykazují volně žijící larvy s výjimkou SDR5, který se nejvíce vyskytuje u dospělců. Vývojové změny v expresi SDRs nejspíše reflektují nutnost adaptace jedince na rozdílné životní podmínky. U larev je stěžejní oxidativní fosforylace jakožto základ aerobního metabolismu. Dospělci naopak upřednostňují anaerobní metabolismus, jehož hlavní drahou je glykolýza. Taktéž mají dospělci redukované metabolické cesty pro syntézu aminokyselin, purinů a pyrimidinů a lipidů. Současně volně žijící formy *H. contortus* potřebují k přežití ochranu proti v přírodě se vyskytujícím xenobiotikům, naopak parazitická stádia musejí odolávat imunitnímu systému jedince. Ve všech těchto procesech se předpokládá, že míra exprese jednotlivých SDRs ovlivňuje schopnost přežití jedince [58; 59].

2. 4. 3. SDR a jejich role v lékové rezistenci

Znalost genetické informace parazitů je nově klíčová k identifikaci mechanismů rezistence, ruku v ruce s tímto aspektem jde současně i vývoj nových léčiv s zcela novým mechanismem účinku [58; 59].

Předpokládá se, že míra exprese určitých SDRs úzce souvisí s rezistencí *H. contortus* k farmakologické léčbě. Při porovnávání rezistentního a citlivého kmene *H. contortus* bylo zjištěno, že ve vajíčkách, larvách i dospělých rezistentního kmene jsou ve vyšší míře exprimovány SDR1, SDR12, SDR13 a SDR16. Menší míru exprese jevil pouze SDR19 [58; 59].

3 Cíl práce

Cílem diplomové práce byla příprava a klonování plasmidu nesoucí gen pro vybraný enzym reduktázy vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*). K tomu bylo využito metod molekulární biologie (qPCR, ligace, transformace, izolace a amplifikace plasmidu, sekvenace a transfekce). Takto připravený plasmid s genem zájmu může být využit pro další výzkum.

4 Experimentální část

4. 1. Použité chemikálie, vybavení

4. 1. 1. Chemikálie, reagenty, kity

- Agarosa – Serva
- ECL Prime Western Blotting detection reagent – Amersham
- dNTP – Sigma-Aldrich
- *E- Coli* – kmen TOP10 – Life Sciences
- Ethanol 99% – Sigma-Aldrich
- Chloroform – Sigma-Aldrich
- Isopropanol – Sigma-Aldrich
- Loading dye 6x (BioLabs.Inc. New England, USA)
- LB medium (*Luria-Bertani*) s agarem – VWR Biochemicals
- Primární protilátka anti – His Tag – Abcam
- Q5 High-Fidelity DNA Polymeráza – New England BioLabs
- qPCR kit – Xceed qPCR SG Mix – Lo-ROX – Institute of Applied Biotechnologies
- Sekundární protilátka – anti-mouse – Abcam
- Specifické klonovací primery – Generi biotech
- SYBR safe – Thermo Fisher Scientific
- T4 DNA polymeráza – Life Sciences
- LB medium (*Luria-Bertani*) – VWR Biochemicals
- TRI reagent -Molecular Research Center

4. 1. 2. Použité vybavení

- Automatické pipety – Research Plus, Eppendorf
- Centrifuga – Biofuge stratus Heraeus, Thermo Fisher Scientific
- Laminární box – AURA 2000, BioAir
- Minicentrifuga – Sprout, Heathrow Scientific
- Mrazící boxy – Vxe Series Jouan, Thermo Fisher Scientific

- Thermocycler TAdvanced with High-Performance Smart Lid - Biometra
- Vortex – Vortex V-1, BioSan
- Uvitec Alliance Q9 Advanced – Baria

4. 2. Metodika

4. 2. 1. Amplifikace SDR

Jako první byla provedena amplifikace SDR3 a SDR18, kde jako templát byla použita již připravená cDNA z předem provedené reverzní transkripce. Pro amplifikaci bylo využito metody PCR. Pro PCR byla připravena potřebná reakční směs, neboli mastermix.

Reagencie	Množství v μ l
FW primer	1
REV primer	1
cDNA (templát)	2
5x Q5 pufr	10
dNTP	2
Q5 DNA-polymeráza	0,5
dd H2O	33,5

Tabulka 1 – PCR směs pro amplifikaci SDR

Specifické primery pro amplifikaci SDR3 a SDR18 byly využity, vždy musí být použit forward a reverse primer pro daný gen.

Následně se mastermix napipetoval do 4 mikroskopů a ty se umístily do PCR cykléru na předem přednastavený program (Tab. 2). Nejprve byla směs zahřáta na 98°C po dobu 30 sekund, tento proces je nazýván jako denaturace a dochází zde k rozvolnění vodíkových vazeb dvouvláknové molekuly DNA a vzniku jednořetězcové DNA. Následuje annealing, kdy směs je ochlazená na 60°C. Při annealingu se naváží primery a DNA-polymeráza na jednotlivé řetězce molekuly DNA. Poté dochází k připojování jednotlivých dNTP jakožto stavebních kamenů

molekuly DNA a formuje se nová dsDNA. Tento cyklus byl opakován 30x a teplota se zde měnila z 98°C na 60°C a na 75°C. Při každém jednotlivém cyklu bylo původní množství DNA zdvojnásobeno.

98°C	98°C	60°C	75°C	72°C	4°C
30''	10''	15''	15''	5''	nekonečno
	30 cyklů				

Tabulka 2 – PCR program pro amplifikaci, žlutě označená část byla opakována 30x (čas je uveden v sekundách)

4. 2. 2. Agarosová elektroforéza (ELFO)

Produkty z PCR se analyzují pomocí horizontální agarosové elektroforézy. Principem metody je separace vzniklých fragmentů v gelu podle velikosti pomocí jednosměrného elektrického proudu a jejich porovnání s markerem molekulových hmotností (tzv DNA *ladder*, žebříček). Separace probíhá na základě prostupnosti molekuly DNA strukturou gelu (čím větší je molekula DNA, tím hůře prostupuje gelem). Od toho se tedy odvíjí i koncentrace gelu, nižší koncentrace je žádoucí pro větší molekuly DNA, aby jim byl umožněn průchod gelem.

Při přípravě gelu se navážilo 0,4g agarosy, ke které se přidalo 40 ml čistého 1x TAE pufru. Na 30-40 sekund se umístilo do mikrovlnné trouby. Roztok agarosy se pak přelil do vaničky v elektroforetické vaně a do roztoku agarosy se umístil hřeben, který vytvořil jamky pro nanášení vzorků. Po ztuhnutí se gel naorientoval tak, aby vzorky byly blíž k záporné elektrodě a převrstvilo se 1x TAE pufrem. Do první jamky byly nanесeny 2μl markeru (100bp) a do dalších jamek 5μl vzorků smíchaných se vzorkovým pufrem obsahujícím kontrastní látku (DNA *stain*). Elektroforéza probíhala 30 minut při napětí 90 V.

Složení 10x TAE pufru: 0,4 M Tris/0,2 M kyselina octová/10 mM EDTA

4. 2. 3. Přečištění produktu PCR

Po provedení PCR je produkt nutné vždy přečistit pro následné měření koncentrace dsDNA a její další zpracování. Pro přečištění byl využit předem připravený kit pro přečištění, sestává se ze 4 kroků.

V prvním kroku je nutné si připravit vzorek. Bylo napipetováno 10 μ l vzorku do 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky. Ke vzorku se poté přidalo 50 μ l DF pufru a promísilo se na vortexu.

V druhé fázi probíhá vazba DNA na absorpční vrstvu kolony (DF – diafiltrační, princip je založen na přidání roztředného pufru po provedení přechozí filtrace). DF kolona se vložila do 2 ml sběrné zkumavky a do DF kolony byl přenesen námi promísený vzorek. Centrifugovalo se 16000x g podobu 30 sekund, proteklý obsah se odstranil a DF kolona se vrátila zpět.

Ve třetí fázi probíhá samotné čištění zachycené dsDNA. Přímo do středu DF kolony se přidalo 600 μ l čistícího pufru, nechalo se 1 minutu stát při laboratorní teplotě. Následně se centrifugovalo 30s na 16000x g. Proteklý čistící pufr s obsahem nečistot se odstranil, DF kolona se vrátila zpět do sběrné zkumavky a na sucho se centrifugovalo další 3 minuty při 16000 x g pro kompletní vysušení.

V posledním kroku probíhá eluce přečištěné dsDNA. DF kolona se přemístila do nové, sběrné 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky. Do středu kolony se napipetovalo 20 μ l elučního pufru (lze přidat až 50 μ l, ale chceme koncentrovanější vzorek) a 2 minuty se ponechalo při laboratorní teplotě, aby eluční pufr zcela DNA vyvázal. Po 2 minutách se 2 minuty centrifugovalo při 16000x g.

4. 2. 4. Měření koncentrace DNA

Po přečištění bylo nutno změřit koncentraci dsDNA pro další postupy. Principem zjišťování koncentrace je měření absorbance vzorku, jako pozadí (*blank*) se používá PCR H₂O. Množství nanášeného vzorku na destičku bylo 1 μ l, měření probíhalo pomocí spektrofotometru Tecan SPARK.

4. 2. 5. Štěpení

Po přečištění dsDNA je dalším krokem štěpení. Pomocí příslušných enzymů se štěpil připravený produkt (dsDNA) a také plasmid, do kterého následně budeme vzniklý fragment DNA ligovat.

Ke štěpení se využily 2 enzymy – XhoI a NdeI (enzymy se mezi sebou liší restrikčním místem, které obsahují použité primery). Stejně dva enzymy se přidaly i do směsi s plasmidem, použili jsme nosný plasmid pET-22b(+). Plasmid byl štěpen v tzv. MCS místě obsahujícím celou řadu vhodných enzymů. Štěpením stejnými enzymy bylo docíleno linearizace plasmidu, s odpovídajícími konci jako připravený fragment, který bude do plasmidu ligován.

Pro štěpení byly připraveny 4 směsi obsahující naši dsDNA a 4 vzorky s plasmidem. U vzorků s plasmidem byla připravena směs s oběma enzymy (bude využita pro ligaci), pro ověření štěpení jednotlivými enzymy směs pouze s enzymem XhoI a s enzymem NdeI a jako čtvrtou směs pouze plasmid bez enzymu.

Reagencie	Množství v μl
XhoI	1
NdeI	1
Restrikční pufr	2
dsDNA (SDR3, SDR18)	16

Tabulka 3 – Složení směsí obsahující dsDNA pro štěpení, 4 vzorky

XhoI (μl)	NdeI (μl)	Pufr (μl)	pET-22b(+) (μl)	H ₂ O(μl)
1	1	1	7	-
-	-	1	3	6
-	1	1	3	5
1	-	1	3	5

Tabulka 4 – Složení směsí obsahujících plasmid pET-22b(+) pro štěpení, žlutě označena je směs pro nadcházející ligaci

Takto připravené směsi se nechaly inkubovat 1 hodinu při 37°C (během této doby probíhá štěpení příslušnými enzymy).

Po štěpení je nutností provést gelovou elektroforézu se směsmi obsahující plasmidy pro ověření, zda-li došlo k potřebnému naštěpení. Objem vzorků nanášených na elektroforézu byl 5µl, pouze u směsi s oběma enzymy se nanášely pouze 2µl, aby se zbytek ušetřil pro následné čištění a ligaci.

Po elektroforéze je opět nutností směs přechistit (čištění pomocí kitu viz. kapitola 4. 2. 3. Přechištění produktu PCR a změřit koncentraci.

4. 2. 6. Ligace a *colony* PCR

Po štěpení a přechištění plasmidu i insertu je dalším krokem ligace, vnesení naší dsDNA do pET-22b(+). Pro provedení ligace se musí vypočítat orientační množství insertu a vektoru tak, aby reakce mohla probíhat bezproblémově. Pro výpočet je nutno znát velikost vektoru v kb, jeho množství v ng a velikost insertu v kb, výpočet byl proveden za využití LabGuide.cz. Pro hladký průběh reakce je doporučeno použít množství insertu a vektoru v poměru 3:1. Pro výpočet množství se vychází z koncentrací po štěpení. Při použití 2 µl přechištěného vektoru (koncentrace přibližně 60ng) vyšlo množství insertu na 17 ng, tudíž do reakce bude použito přibližně 50 ng pro dodržení poměru 3:1, což při naměřených koncentracích pro fragment SDR3 odpovídá přibližně 4 µl a SDR8 6,5 µl.

VÝPOČET MNOŽSTVÍ INZERTU LIGOVANÉHO DO VEKTORU

Velikost vektoru [kb]	5.49
Množství vektoru [ng]	120
Velikost insertu [kb]	0.8
Množství insertu [ng]	17.486338797814206
<input type="button" value="Vypočítat"/> <input type="button" value="Resetovat"/>	

Obr. 12 – Výpočet množství insertu v ng přes LabGuide.cz

Pro ligaci byla následně připravena reakční směs v následujícím složení. Jako kontrola byla použita totožná směs, kde místo dsDNA bylo použito pouze 6,5 μ l H₂O. Inkubace ligační směsi probíhala při 16°C přes noc.

Reagencie	Množství v μ l
T4-DNA-ligáza	0,5
pufr	1
pET-22b(+)	2
SDR3 + H ₂ O	4 + 2,5
nebo SDR18	6,5

Tabulka 5 – Složení reakční směsi pro ligaci

Po dokončení ligace je dalším krokem inserce plasmidu pET-22b(+) s vloženou dsDNA do chemicky kompetentních *E. coli* (působením CaCl₂ je narušena integrita plazmatické membrány pro usnadnění vstupu plasmidu do buňky). Nejprve byly buňky s přidanou ligovanou směsí chlazeny 30 minut na ledě. Poté byl proveden *heatshock* (buňky se zahřejí na 42°C na 1 minutu), který způsobí ztekucení membrány a umožní příjem plasmidu buňkou. Přidá se SOC médium (médium bohaté na živiny) a nechá se třepat hodinu při 37°C.

Po hodině byla směs nanášena na živné půdy tvořené LB médiem s ampicilinem pro selekci buněk. Náš inzert obsahuje gen pro rezistenci k ampicilinu. Vzorek byl nanášen na půdu v objemu 50 μ l a 150 μ l. Celkem bylo nanášeno na 6 půd (SDR3, SDR18 a kontrolní s H₂O) a nechalo se přes noc kultivovat při 37°C.

Druhý den po kultivaci se odebíraly vzorky pro colony PCR. Bylo odebráno 10 vzorků z půd, na které se nanášelo 150 μ l média. Kolonie se manuálně nabraly na špičku pipety a byly přemístěny do mikrozkušavek s 10 μ l H₂O. Takto odebrané kolonie se nechaly zahřívat 10 minut při teplotě 95°C. Během této doby byl připraven mastermix pro colony PCR.

Reagencie	Množství v μ l
OneTaq pufr	4
dNTP	1
F3/F18-primer	1
R3/R18 primer	1 /1
OneTaq polymeráza	0,15
H2O	3,85

Tabulka 6 – Složení mastermixu pro colony PCR

Reagencie	Množství v μ l
pET-22b(+)	0,5
T7seq primer	0,5
T7 term primer	0,5
H2O	13,35

Tabulka 7 – Složení kontrolní směsi pro colony PCR

95°C	94°C	94°C	55°C	68°C	68°C
10'	30''	15''	30''	25''	5'
		30 cyklů			

Tabulka 8 – OneTaq colony PCR schéma

Po dokončení colony PCR bylo provedena gelová elektroforéza. Na gel bylo naneseno 3 μ l markeru 100bp a 8 μ l jednotlivých vzorků.

4. 2. 7. Sekvence

Současně byly vzorky obsahující primery SDR3 a SDR18 po štěpení odeslány k sekvenaci. Sekvence je metoda, která umožňuje popis jednotlivých nukleotidů v molekule DNA.

Poté byla provedena ligace s využitím T4-DNA-ligázy a zero-blunt vektoru, která též nebyla úspěšná.

Rozhodli jsme se tedy tedy začít od začátku, PCR amplifikací, kdy jako templát byl využit SDR3 produkt po sekvenaci, u kterého byla jistota, že pořadí nukleotidů je takové, jaké by mělo být.

4. 2. 8. PCR amplifikace, gelová elektroforéza, přečištění a měření koncentrace (2. pokus)

Jako templát byly použity SDR3 od docentky Matouškové ve známé koncentraci 100 µg/ µl, SDR3 po sekvenaci v koncentraci 5ng/µl, u kterého víme, že pořadí nukleotidů odpovídá konsenzu a nové SDR3, dosud nepoužité. Program PCR se nezměnil (viz. 4. 2. 1). Do směsi byl přidán Q5-High-GC-Enhancer pro zvýšení výtěžku PCR.

Složení PCR směsi bylo následující:

Reagencie	Množství v µl
Q5-pufr	10
dNTP	2
F-primer SDR3	2,5
R-primer SDR3	2,5
Templát	1
Q5-DNA-polymeráza	0,5
Q5-High-GC-Enhancer	10
H2O	21,5

Tabulka 9 – Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci

4. 2. 9. Ligace do blunt vektoru

Po změření koncentrace byla opět provedena ligace, tentokrát za využití rozdílné ligázy a pufru. Bylo ligováno do Zero-blunt vektoru. Směs se po napipetování nechala 15 minut kultivovat při pokojové teplotě. Po 15 minutách se

celý objem přenesl ke kompetentním *E. coli* a inkubovalo se 30 minut na ledu. Po 30 minutách byl proveden heatshock, následně se směs přenesla na 2 minuty opět na led a poté bylo k směsi přidáno 250 μ l SOC média. Nechalo se 1 hodinu třepat při 36°C, 225 rpm.

Reagencie	Množství v μ l
Zero-blunt vector	0,5
SDR3 (45,22 ng/ μ l)	2
pufr	1
T4-DNA ligáza	0,5
H2O	1

Tabulka 10 – Složení ligační směsi pro ligaci do Zero-blunt vectoru

Po dokončení kultivace byla směs nanesena na dvě plotny (LB agar s kanamycinem) v objemu 50 μ l a 150 μ l, nechalo se kultivovat přes noc při 37°C.

4. 2. 10. Colony PCR (2. pokus)

Kolonie narostly, byly odebrány vzorky, které se přenesly do 10 μ l H2O a do každé mikrozkušavky byl následně napipetováno 10 μ l mastermixu. Schéma PCR reakce pro colony PCR je totožné jako při prvním provedení (viz. 4. 2. 6.).

Reagencie	Množství v μ l
OneTaq pufr	4
dNTP	1
F-primer SDR3	0,5
R-primer SDR3	0,5
OneTaq polymeráza	0,15
H2O	3,85

Tabulka 11 – Složení mastermixu pro colony PCR

Po dokončení colony PCR bylo provedeno ELFO. Kolonie č. 3 vyhovovala. Pro další pokračování byla opět odebrána z plotny a zaočkována do 3ml LB média s 3 μ l kanamycinu. Nechalo se 24 hodin kultivovat při 36°C, 200 rpm.

4. 2. 11. Izolace plasmidu a měření koncentrace

Po kultivaci musí být provedena lýza buněk, aby došlo k uvolnění Zeroblunt plasmidu s naší dsDNA pro změření koncentrace. K izolaci bylo využito komerčního setu NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid).

V prvním kroku se odebralo 5ml LB média s *E.coli* a přenesly se do standardní mikrozkuřavky. Centrifugovalo se 30 sekund při 11000x g. Supernatant se odstranil a opatrně se odstranila pomocí pipety zbylé LB médium.

Druhým krokem je vlastní lýza. K peletě *E. coli* se přidá 250 μ l Buffer A1 a resuspendovalo se pomocí vortexu tak, aby nezůstaly žádné shluky buněk. Následně se přidá 250 μ l Buffer A2. Promísilo se opatrným převrácením mikrozkuřavky 6-8x (nesmí se umístit na vortex, došlo by k poškození molekuly DNA). Inkubovalo se při laboratorní teplotě po dobu 5 minut, dokud lyzát nebyl čirý. Posledním krokem lýzy buněk bylo přidání 300 μ l Buffer A3. Opět se promísilo převrácením mikrozkuřavky 6-8x.

Ve třetím kroku byl přečištěn lyzát. Mikrozkuřavka se umístita do centrifugy a centrifugovalo se 5 minut při 11000x g, pokud supernatant není čirý je nutno krok opakovat.

Čtvrtým krokem bylo navázání molekuly DNA na membránu. NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid) kolona se umístita do 2ml sběrné mikrozkuřavky a celý objem supernatantu z kroku tři byl přenesen na kolonu a centrifugovalo se 1 minutu při 11000x g. Proteklá kapalina se odstranila.

V pátém kroku se promývá membrána s navázanou DNA. Do kolony bylo napipetováno 600 μ l Buffer A4 (nutno před prvním použitím přidat ethanol) a 1 minutu se centrifugovalo při 11000x g, proteklá kapalina s nečistotami se odstranila.

Šestý krok bylo sušení membrány, 2 minuty se centrifugovalo při 11000x g a kapalina se odstranila.

V posledním kroku se eluuje DNA. NucleoSpin Plasmid/Plasmid (NoLid) kolona se přemístita do nové 1,5ml mikrozkuřavky. Na kolonu bylo napipetováno

30 μ l Buffer AE, inkubovalo se 1 minutu při laboratorní teplotě a následně bylo centrifugováno 1 minutu, 11000x g.

Následně byl odebrán 1 μ l pro změření koncentrace pomocí absorbance, jako blank byla použita PCR H₂O.

4. 2. 12 Sekvence vektoru s dsDNA

Vzorek obsahující Zero-blunt plasmid s vloženou dsDNA pro SDR3 byl odeslán k sekvenaci do firmy Eurofins Genomics.

4. 2. 13. Štěpení zero-blunt vektoru a pET-22b(+) plasmidu

Po změření koncentrace bylo provedeno štěpení enzymy XhoI a NdeI. Štěpení byl podroben jak zero-blunt plasmid s naší dsDNA, tak budoucí vektor plasmid pET-22b(+). Směs pro štěpení byla následující:

Reagencie	Množství v μ l
Enzym XhoI	1
Enzym NdeI	1
rCut Smart Buffer	1
Zeroblunt+SDR3 (c=1176ng/ μ l) nebo	7
pET-22b(+) (c=245ng/ μ l)	3
-ke směsi s plasmidem pET-22b(+) bylo přidáno 4 μ l H ₂ O	

Tabulka 12 – Složení směsi pro štěpení enzymy XhoI a NdeI

Směs se nechala reagovat 1 hodinu při 36°C bez třepání.

4. 2. 13. Gelová elektroforéza, extrakce z gelu a přečištění

S produkty po štěpení byla provedena gelová elektroforéza. Pro následné měření koncentrace bylo nutné plasmidy z gelu extrahovat a přečistit.

K tomu byl využit komerční set NucleoSpin Gel and PCR Clean-up. Nejprve se pomocí čistého skalpelu vyřízla část gelu s plasmidy, je nutné minimalizovat dobu působení UV světla, aby se předešlo poškození DNA. Gel byl po extrakci zvážen ($m=200\text{mg}$) a přenesen do čisté mikrokumavky. Ke gelu se napipetovalo $400\ \mu\text{l}$ Buffer NTI (pro gel o koncentraci $<2\%$ se na každých $100\ \text{mg}$ gelu přidá $200\ \mu\text{l}$ pufru). Nechalo se inkubovat 5-10 minut při 50°C . Každé dvě minuty se krátce vortexovalo do doby, než se gel zcela rozpustil.

V druhém kroku byl celý objem přenesen do NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column, která byla vložena do 2ml sběrné mikrokumavky. 30 sekund se centrifugovalo při $11000x\ g$ pro navázání molekuly DNA na kolonu.

V třetím kroku byl na kolonu nanesen $700\ \mu\text{l}$ Buffer NT3, opět se centrifugovalo 30 sekund, $11000x\ g$. Celý krok byl ještě jednou zopakován, aby byla zajištěna potřebná čistota.

Čtvrtý krok je nutný pro vysušení kolony. Nechalo se 1 minutu centrifugovat při $11000x\ g$.

V posledním kroku se kolona přemístila do nové $1,5\text{ml}$ mikrokumavky. Přímo na střed kolony byl nanesen $15\ \mu\text{l}$ Buffer NE a inkubovalo se při laboratorní teplotě 1 minutu. Následně se 1 minutu centrifugovalo při $11000x\ g$ pro eluci DNA.

Změřila se koncentrace pomocí absorbance.

4. 2. 14. Ligace SDR3 do pET-22b(+) a colony PCR

Pro ligaci byly připraveny 2 směsi.

	LIGACE	KONTROLA
pET-22b(+)	2 µl	2 µl
T4 DNA ligáza	0,5 µl	0 µl
T4-pufr	1 µl	1 µl
SDR3	6,5 µl	6,5 µl

Tabulka 13 – Složení ligační a kontrolní směsi pro ligaci

Obě směsi se nechaly inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě. Po půl hodině byl celý objem přepipetován ke kompetentním *E. coli*, nechalo se stát 30 minut na ledu. Byl proveden *heatshock* (42°C, 2 minuty), na 45 sekund se přeneslo na led. Poté bylo k buňkám přidáno 250 µl SOC média a nechalo se hodinu třepat při 37°C, 225rpm.

Po dokončení ligace byla směs přenesena na LB plotny s ampicilinem. Buňky s ligační směsí byly nanášeny na dvě plotny v objemu 50 µl a 100 µl. Kontrolní směs byla nanášena pouze v objemu 50 µl. Na plotně, kam bylo nanášeno 100 µl narostla jedna kolonie. S odebraným vzorkem bylo provedeno colony PCR (viz. 4. 2. 6.)

4. 2. 15. MIDIPREP

Narostlá kolonie obsahovala požadovaný insert, příslušný plasmid byl proto připraven ve větším množství metodou midiprep. Odebral se vzorek z pozitivní kolonie a zaočkoval se do 50ml LB média, nechalo se kultivovat přes noc při 36°C a třepalo se při 225 rpm. Midiprep byl proveden za využití komerčního setu ZymoPURE II Plasmid Midiprep Kit.

4. 2. 15. 1. Obecný protokol

Druhý den se bakteriální kultura odstředila při 3400 x g po dobu 10 minut, aby došlo k sedimentaci buněk, supernatant se odstranil.

K suspendovaným buňkám bylo přidáno 8 ml ZymoPURE P1 (Red) a kompletně se resuspendovalo vortexováním/pipetováním.

Následně bylo přidáno 8 ml ZymoPURE P2 (Green) a okamžitě se promísilo převrácením zkumavky 6-8x. Poté se nechalo odstát 3 minuty při laboratorní teplotě (buňky jsou zcela lyzovány, když roztok je čirý, fialový a viskózní).

Po dokončení lýzy se ke směsi napipetovalo 8 ml ZymoPURE P3 (Yellow) a opět se opatrně promíchalo převrácením zkumavky, nesmí se vortexovat. Po dokončení neutralizace se směs zbarvila do žluta a na povrchu se vytvořil žlutý precipitát.

Lyzát byl přenesen do ZymoPURE Syringe Filter, kde musel být utěsněný uzávěr, aby nedošlo k protečení. Po přenesení se muselo 5-8 minut počkat, aby precipitát plovál na povrchu směsi.

Po vysrážení precipitátu byla odstraněna zátká ze spodu Syringe Filter a celá sestava se umístila do nové, 50 mililitrové konické zkumavky. Za pomoci pístu se směs protlačila přes filtr jedním, kontrolovaným pohybem tak, aby bylo získáno cca 20 ml čistého lyzátu.

K čistému lyzátu se přidalo 8 ml ZymoPURE Binding Buffer a promísilo se převrácením zkumavky 8x.

4. 2. 15. 2. Centrifugační protokol

Z vrcholu Zymo-Spin III-P Column Assembly byl odstraněn 50 ml reservoir. Muselo se zajistit, že spojení mezi 15 ml konickým reservoarem a Zymo-Spin III-P Column je těsné a celá soustava se umístí na 50 ml zkumavku.

10 ml lyzátu z předešlého kroku bylo přeneseno do 15 ml Conical Reservoir/Zymo-Spin III-P Column soustavy a centrifuguje se 2 minuty při 500 x g.

50 ml zkumavka s proteklou kapalinou se vyprázdní a krok se opakuje, aby celý objem lyzátu prošel kolonou.

Do soustavy s kolonou byly napipetovány 2 ml ZymoPURE Wash 1 a centrifugovalo se 500 x g po dobu 2 minut.

Dále se přidal 2 ml ZymoPURE Wash 2 a centrifugovalo se 500 x g po dobu 2 minut. Celý promývací proces byl zopakován.

Zymo-Spin III-P Column byl přenesen do nové sběrné mikrozukavky a centrifugovalo se 1 minutu při 1000 x g pro odstranění zbytkového promývacího pufru.

V posledním kroku byla kolona přenesena do nové 1,5 ml sběrné mikrozukavky a přímo na kolonu bylo nanášeno 200 μ l ZymoPURE Elution Buffer. Počkalo se 2 minuty pro kompletní navázání a centrifugovalo se 1 minutu při 10000 x g.

Po posledním kroku bylo nutností změřit koncentraci. Opět se měřila absorbance, jako blank byla použita PCR H₂O.

4. 2. 16. Expese proteinu

Pro kontrolu expese protein byl použit plasmid pET-22b(+) s vloženou sekvencí dsDNA SDR3 o známé a vhodné koncentraci ($c=197$ ng/ μ l).

4. 2.16. 1. Transformace tepelným šokem

Před samotnou expresí proteinu bylo nutné plasmid transformovat do buněk, které jsou expese schopné. Námi byly využity BL21 buňky.

K 50 μ l BL21 buněk se přidalo 2 μ l plasmidu. Nechalo se 30 minut stát na ledě. Následně byl proveden *heatshock* (42°C, 10 sekund) a buňky byly umístěny zpět na led na 5 minut. Po 1 hodině se 50 μ l rozetřelo na ampicilinovou plotnu a

50 μ l se napipetovalo do 3 ml LB média s 6 μ l ampicilinu (AMP) (c=50mg/ml). Bylo kultivováno přes noc.

4. 2. 16. 2. Měření optické density a indukce exprese

Jako slepý vzorek bylo použito čisté LB médium, ke kterému bylo přidáno 100 μ l AMP. Z této směsi se odebral 1 ml do kyvety pro měření.

Následně se změřila absorbance v čase 0. K LB médiu s AMP se přidalo 500 μ l inokula, odebral se 1 ml a změřila se absorbance v čase 0.

LB médium s inokulem se nechalo třepat (37°C, 225 rpm) a pravidelně v hodinových, respektive 30 minutových intervalech se měřila OD.

Čas	Absorbance
0 hod	0,051
1 hod	0,114
2 hod	0,300
2,5 hod	0,495

Tabulka 14 – Naměřené hodnoty absorbance při měření OD

Cílová hodnota absorbance byla 0,4-0,8. Takovéto hodnoty odpovídají log-fázi buněčného dělení. Po 150 minutách (A=0,495) se z inokula odebraly 4 ml do mikrozkuhavky, jednalo se o vzorek před přidáním indukčního činidla IPTG. Ke zbylému 40 ml inokula se přidalo 160 μ l 100mM IPTG pro indukci exprese.

Odebrané 4 ml se ihned stočily (2500 x g, 5 minut) a supernatant se odstranil. Obdobně byl po 5 hodinách stočen a slit vzorek s přidáním IPTG.

4. 2. 16. 3. Extrakce proteinu a měření koncentrace

K extrakci proteinu bylo využito komerčního lyzačního roztoku.

K Non-I vzorku bylo napipetováno 200 μ l BUGBUSTER PROTEIN extraction reagent, k vzorku po indukci se přidaly 2 ml BUGBUSTER PROTEIN extraction

reagent. Vzorky se resuspendovaly při laboratorní teplotě po dobu 20 minut při 10000 rpm. Po resuspendaci byly vzorky stočeny po dobu 20 minut, 16000 x g při 4 °C. Supernatant byl přenesen do nových mikrozkušavek (sedimentované buňky se odstranily) a okamžitě se umístilo na led.

Dalším krokem bylo měření koncentrace proteinu. K měření koncentrace byla využita mikrotitrační destička. Pro měření koncentrace byly naše vzorky naředěny (ředí se 5x a 20x). Tedy 10 µl vzorku + 40 µl H₂O a 10 µl vzorku + 190 µl H₂O.

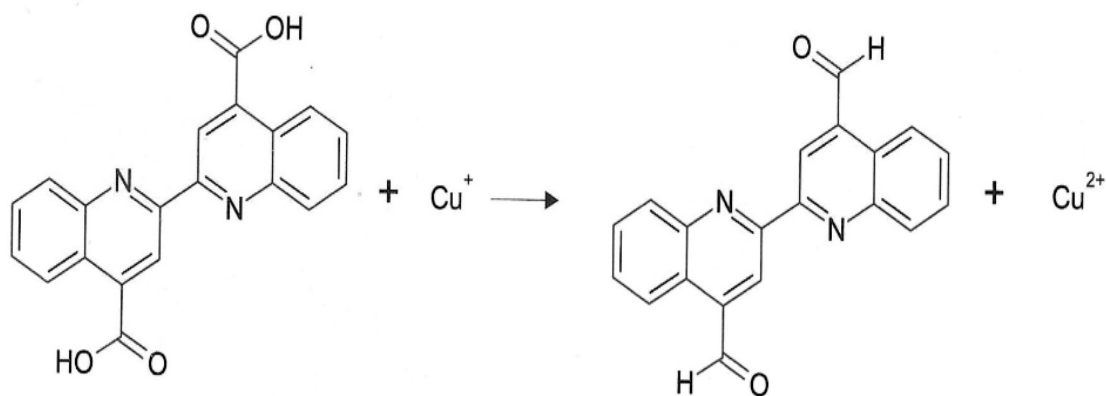
Prvních 6 sloupců tvořily vzorky o přesně známé, odstupňované koncentraci pro vytvoření kalibrační křivky.

	Koncentrace	0,1% roztok BCA	Destilovaná voda
1	0 µg/ml	0 µl	100 µl
2	200 µg/ml	20 µl	80 µl
3	400 µg/ml	40 µl	60 µl
4	600 µg/ml	60 µl	40 µl
5	800 µg/ml	80 µl	20 µl
6	1000 µg/ml	1000 µl	0 µl

Tabulka 15 – Složení směsí a jejich koncentrace pro kalibrační křivku

Další 2 sloupce tvořily Non-IPTG 5x a 20x zředěné a poslední dva sloupce byly vzorky s přidaným IPTG 5x a 20x zředěné. Celkem 10 sloupců po 4 řádcích, pipetovalo se 10 µl do každé jamky. Následně bylo do každé jamky přidáno 200 µl pracovního roztoku C (NaHCO₃, Na₂CO₃, BCA v 0,1M NaOH + 4% CuSO₄ · 6 H₂O v poměru 50:1). Inkubovalo se 30 minut při 37°C za stálého třepání. Po 30 minutách se změřila koncentrace.

Princip metody je založen na reakci proteinu s kationty Cu²⁺ v alkalickém prostředí. Kationty Cu²⁺ se redukuje na Cu¹⁺, které vytváří v prostředí o pH=10 stabilní modrofialový komplex s BCA (bicinchonic acid). Absorbance komplexu je měřena při 562 nm.



Obr. 13 – Schéma reakce při tvorbě komplexu

4. 2. 16. 4. DotBlot

Na membránu z nitrocelulózy byly naneseny vzorky ve 2 řadách. Nahoře byla nanesena pozitivní kontrola, což byl izolovaný čistý protein obsahující his tag. V druhé řadě byly naneseny vzorky. Nanášelo se 2,5 a 7,5 μl vzorku, které byly v koncentraci 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

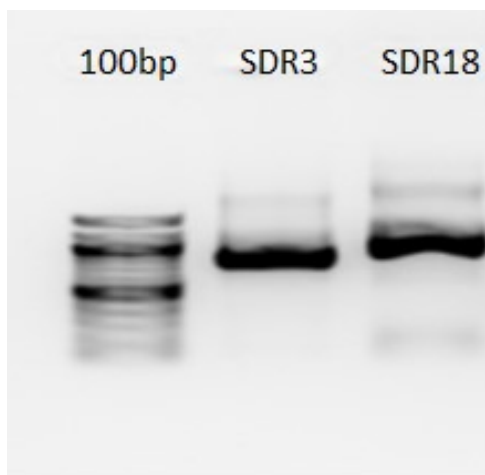
Membrána se přelila 5% roztokem mléka v TBST pufrem. Umístilo se na kývačku a nechalo se 2 hodiny blokovat. Po 2 hodinách se mléko slilo a membrána se opláchla redestilovanou vodou. Následovala inkubace s primární protilátkou (anti-6x Histag, rabbit, 1:1000) 1 hodinu při laboratorní teplotě. Po 1 hodině se protilátka odstranila a oplachovalo se TBST pufrem (4x po dobu 5 minut). Následovala inkubace se sekundární protilátkou (GOAT, anti-rabbit, 96 cqm). Po 1 hodině se opět oplachovalo TBST pufrem.

K detekci se připravilo činidlo. Smísilo se ECL Prime Peroxide Solution + ECL Prime Luminol Enhancer Solution v poměru 1:1. Bylo naneseno na membránu tak, aby celá membrána byla ponořena a vyvíjelo se 5 minut v temné komoře. Následně byla membrána snímána pomocí Uvitec Alliance Q9 Advanced systému pro zobrazení výsledku.

5. Výsledková část

5. 1 Amplifikace SDR3 a SDR18

Jako první krok byla provedena amplifikace DNA kódující SDR3 a SDR18. Pro ověření úspěšné amplifikace byly vzorky byly nanášeny na 1% agarosový gel a byla provedena gelová elektroforéza, která nám umožnila jejich vizualizaci (Obr. 14).



Obr. 14 – Gelová elektroforéza – amplifikace SDR3 a SDR8. V první jamce byl nanášen 100bp marker. Následně v jamkách 1-2 bylo nanášeno zprava SDR3 a SDR18

Po provedené elektroforéze a přečištění vzorků se změřila koncentrace amplifikované DNA. K měření koncentrace se vždy odebral 1 μ l vzorku.

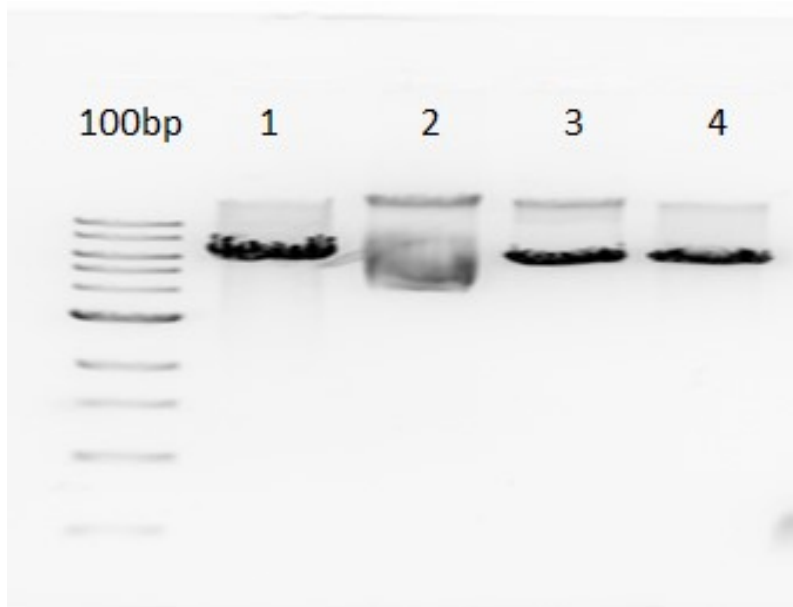
Well	260	230	280 ng/ μ l	Ratio 260/230	Ratio 260/280	Sample IDs
A1	0,028	0,0621	0,0132	28,01	0,45	2,12 SDR3
A2	0,0187	0,0114	0,0096	18,66	1,64	1,95 SDR18

Tabulka 16 – Naměřené absorbance vzorků a koncentrace dsDNA po přečištění

5. 2. Restrikční štěpení enzymy XhoI a NdeI

Amplifikovaná DNA i plasmid pET-22b(+) byly štěpeny dvěma restrikčníma endonukleázama XhoI a NdeI. Po štěpení byla provedena horizontální gelová elektroforéza pro vizualizaci. Objem nanášených vzorků byl 5 μ l, směs obsahující

oba enzymy byla nanášena v objemu 2 μ l (amplifikovaná DNA nebyla nanášena na gel vůbec, aby nedošlo ke zbytečným ztrátám vzorku, byla pouze přečištěna) (Obr. 15).



Obr. 15 – Gelová elektroforéza – štěpení enzymy XhoI a NdeI. V první jamce je nanášen marker 100bp. Dále v jamkách 1-4 bylo nanášeno pET-22b(+) s oběma enzymy (1), pET-22b(+) bez enzymů (2), pET-22b(+) s XhoI (3) a pET-22b(+) s NdeI (4)

Po vizualizaci lze jasně vidět, že štěpení příslušnými enzymy úspěšně proběhlo, protože neštěpený plasmid vypadá jinak než štěpené vzorky; v gelu putuje rychleji, kvůli tzv. „supercoiled“ formě, která i přesto, že má stejnou velikost, díky svému sbalení prochází gelem lépe a vypadá tedy kratší.

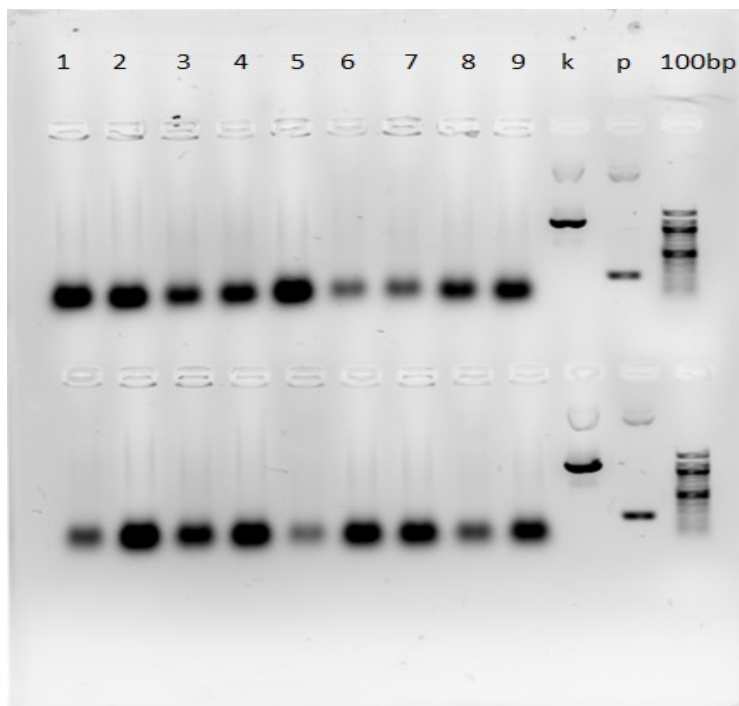
Po přečištění vzorků se opět změnila koncentrace (Tab. 18).

Well	260	230	280 ng/ μ l	Ratio 260/230	Ratio 260/280	Sample IDs
A1	0,0146	0,0189	0,0067	14,63	0,77	2,2 SDR3 po štěpení
A2	0,0076	0,1132	0,0042	7,6	0,07	1,83 SDR18 po štěpení
C1	0,0565	0,8719	0,0338	56,49	0,06	1,67 pET-22b(+) s XhoI a NdeI

Tabulka 17 – Koncentrace vzorků s dsDNA po štěpení (první dva) a pET-22b(+) štěpený oběma enzymy (poslední)

5. 3. Výsledky colony PCR po ligaci

Po přečištění vzorků byla provedena ligace na základě výpočtů pro použitá množství (viz kap.4.2.6.) a následovala transformace *E. coli*. Druhý den byly narostlé kolonie kontrolovány pomocí „colony PCR“.



Obr. 16 – Gelová elektroforéza – colony PCR. V horní řadě (jamky č. 1 – 9) byly naneseny vzorky s SDR13. V dolní řadě (jamky č. 1 – 9) byly naneseny vzorky s SDR18. Vedle nich v obou sloupcích byla nanesena kontrolní směs (k) a prázdný plasmid pET-22b(+) (p) a 100bp marker.

Po vizualizaci gelovou elektroforézou (Obr. 16) lze vidět, že k inzerci SDR3 ani SDR18 do plasmidu pET-22b(+) nedošlo.

5. 4. Výsledky sekvenace PCR

Vzhledem k neúspěšnému vytvoření plasmidu obsahujícího SDR3 nebo SDR18 byly na kontrolu sekvenace poslány amplifikované DNA získané v prvním kroku (kap. 5.1.). Sekvenace byla zadána komerční firmě Eurofins Laboratories (Německo), v rámci služby LightRun sekvenace, kam se posílají vzorky ve směsi primerů označené zakoupeným barkódem (5 μ l přečištěného PCR vzorku + 5 μ l

primeru). Sekvenací bylo prokázáno, že pořadí nukleotidů v amplifikované DNA odpovídá oblastem použitých FW- i REV-primerů a sekvenci SDR3 (Obr. 17, 18).

	1	10	20	30
	-----+-----+-----+-----			
SDR3_CDS		ATGTCCTCGTCGATGACATCGCTTACGGCA		
DHK691_rc	TTGCAT	ATGTCCTCGTCGATGACATCGCTTACGGCA		
FW	TTGCAT	ATGTCCTCGTCGATGAC		
Consensus	ttgcat	ATGTCCTCGTCGATGAC	atcgcttacggca	

Obr. 17 – Porovnání sekvenace kódujícího úseku SDR3 (začátek sekvenace), obdržené sekvenace (DHK691_rc) a použitého FW-primeru

	751	760	770	780	790	800	810	820
	-----+-----+-----+-----+-----+-----							
SDR3_CDS	ACGATTGGAGTAAACGGTGG	CATGCAGGCCATATATAA						
DHK690	ACGATTGGAGTAAACGGTGG	CATGCAGGCCATATAGAGAACCTGTACTTCCAAGGCCTCGAGATAAAGT						
REV_rc			CATGCAGGCCATATAGAGAACCTGTACTTCCAAGGCCTCGAGATA					
Consensus	acgat	tggagt	aaacgggtgg	CATGCAGGCCATATA	gA	aacctgt	acttccaaggcct	cgagata....

Obr. 18 – Porovnání sekvenace kódujícího úseku SDR3 (konec sekvenace), obdržené sekvenace (DHK690) a použitého REV-primeru

	1	10	20	30	40
	-----+-----+-----+-----+-----				
DHK693_rc	ATTTGCAT	ATGGCTTCGATTCTCCGTTGACGAGGGG			
SDR18-CDS		ATGGCTTCGATTCTCCGTTGACGAGGGG			
FW	TTGCAT	ATGGCTTCGATTCTCCGTTG			
Consensus	...ttgcat	ATGGCTTCGATTCTCCGTTG	acgaagggg		

Obr. 19 – Porovnání sekvenace kódujícího úseku SDR18 (začátek sekvenace), obdržené sekvenace (DHK693_rc) a použitého FW-primeru

	751	760	770	780	790	800	810	814
	-----+-----+-----+-----+-----+-----							
DHK692	ATCCGTCTTGATGGTTCA	CTTCGTATGCCGCCGAGAACCTGTACTTCCAAGGCCTTCGAGATA						
SDR18-CDS	ATCCGTCTTGATGGTTCA	CTTCGTATGCCGCCGTA						
REV_rc			CTTCGTATGCCGCCGAGAACCTGTACTTCCAAGGCCT-CGAGATA					
Consensus	atccgtcttgatggttca	CTTCGTATGCCGCCG	gA	aacctgt	acttccaaggcct	cgagata		

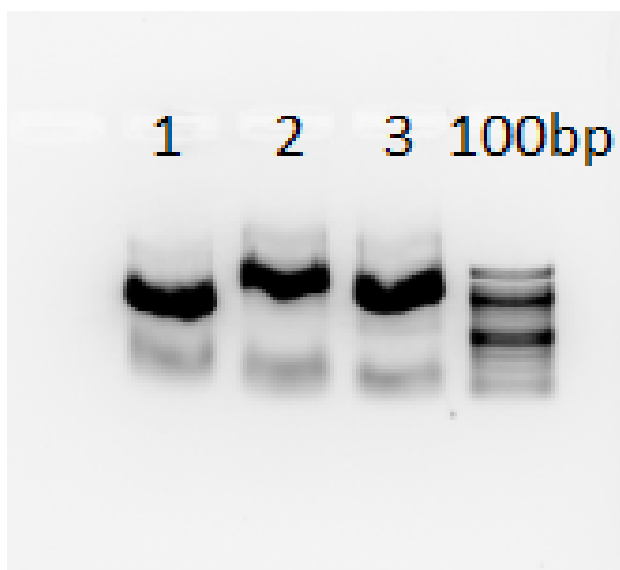
Obr. 20 – Porovnání sekvenace kódujícího úseku SDR18 (konec sekvenace), obdržené sekvenace (DHK692) a použitého REV-primeru. Žlutě vyznačený nukleotid je v sekvenci navíc.

Po sekvenaci produktu SDR18 je zřejmé, že FW-primer opět odpovídá zadané sekvenci (Obr. 19). REV-primer bohužel nevyhovuje, lze vidět, že na 807. místě je navíc thymidin přesně v oblasti cílového místa endonukleázy XhoI (CTCGAG) (Obr. 20, žlutě vyznačeno).

Vzhledem k tomu, že není jasné, zda jde o problém sekvenace nebo primeru, tak se dále pracovalo tedy pouze s SDR3.

5. 4. Výsledky amplifikace SDR3 (2. pokus)

Byla provedena další PCR amplifikace pouze s primery pro SDR3. Pro vizualizaci byla opět využita gelová elektroforéza (Obr. 21). Byly použity tři různé templáty.



Obr. 21 – Gelová elektroforéza – amplifikace SDR3. V první jamce nanesen zcela nový SDR3 (1), v druhé SDR3 po sekvenaci (2), ve třetí SDR3 od doc. Matouškové (3). Vlevo 100bp marker.

Všechny tři produkty byly přečištěny pomocí komerčního setu (viz 4. 2. 3.) a změřila se koncentrace.

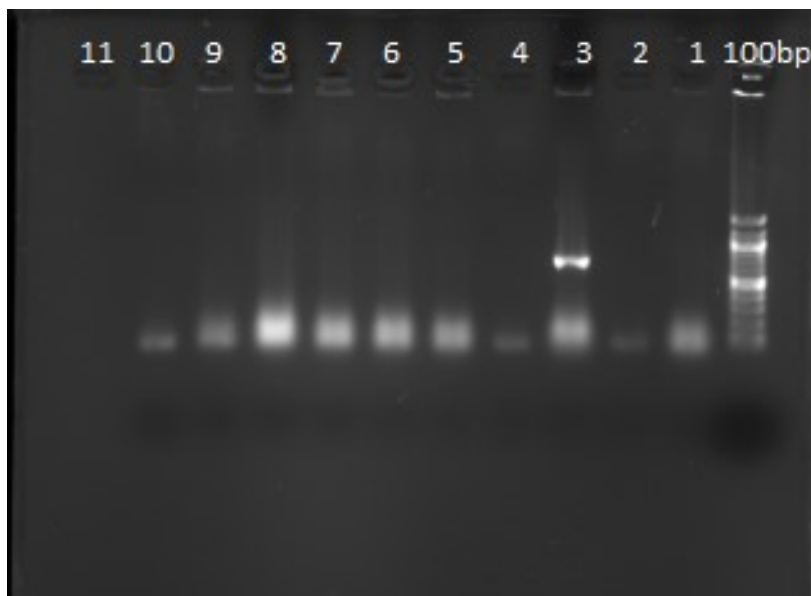
Well	260	230	280 ng/ μ l	Ratio 260/230	Ratio 260/280	Sample ID
A1	0,0866	0,124	0,0454	86,57	0,7	SDR3-NR
A2	0,0561	0,0897	0,0299	56,09	0,63	SDR3-3P
B1	0,0452	0,0639	0,024	45,22	0,71	SDR3-seq

Tabulka 18 – Naměřené koncentrace po PCR amplifikaci

Vzhledem k úspěšné sekvenaci prvního PCR vzorku SDR3, byl pro další práci použit vzorek, který vznikl s použitím tohoto templátu. Jeho koncentrace byla

45,22 ng/ μ l (Tab. 19). Dále byl pro práci využíván pouze tento produkt, který byl následně klonován do sekvenačního plasmidu Zero-Blunt s využitím komerčního kitu a komerčních kompetentních buněk *E. coli* TOP10.

5. 5. Výsledky colony PCR a měření koncentrace dsDNA v Zero-blunt vektoru



Obr. 22 – Gelová elektroforéza po colony PCR – v jamkách č. 1 – 11 byly naneseny vzorky z jednotlivých narostlých kolonií. Vpravo marker 100bp.

Z jedenácti kontrolovaných kolonií lze vidět, že pouze v kolonii č. 3 došlo k ligaci dsDNA SDR3 do Zero-blunt plasmidu (Obr. 22). Po provedení colony PCR a následné kultivaci kolonie č. 3 v chemicky kompetentních *E. coli* byla provedena lýza buněk pro uvolnění Zero-blunt plasmidu obsahující dsDNA SDR3. Následně byla změřena koncentrace spektrofotometricky. Koncentrace plasmidu byla 194,35 ng/ μ l.

5. 6. Výsledky sekvenace Zero-blunt plasmidu s SDR3

dsDNA

Vzorek Zero-blunt plasmidu s vloženým úsekem SDR3 dsDNA byl následně odeslán k sekvenaci, plasmid byl sekvenován z obou směrů pro lepší pokrytí sekvenace.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
DHK710_rc	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
DHK713	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
SDR3-CDS	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
DHK710_rc	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
DHK713	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
SDR3-CDS	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	261	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390
DHK710_rc	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
DHK713	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
SDR3-CDS	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	391	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
DHK710_rc	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
DHK713	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
SDR3-CDS	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	521	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
DHK710_rc	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
DHK713	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
SDR3-CDS	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	651	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780
DHK710_rc	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
DHK713	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
SDR3-CDS	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	781	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910
DHK710_rc	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
DHK713	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
SDR3-CDS	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	911	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040
DHK710_rc	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
DHK713	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
SDR3-CDS	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	1041	1050	1060	1070	1080	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170
DHK710_rc	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
DHK713	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
SDR3-CDS	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
	1171	1180	1190	1200	1210	1220	1230	1240	1248					
DHK710_rc	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
DHK713	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
SDR3-CDS	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													
Consensus	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----													

Obr. 23 – Porovnání kódující sekvenace SDR3 se získanou nukleotidovou sekvencí Zero-blunt plasmidu s vloženou SDR3 dsDNA (DHK710, DHK713).

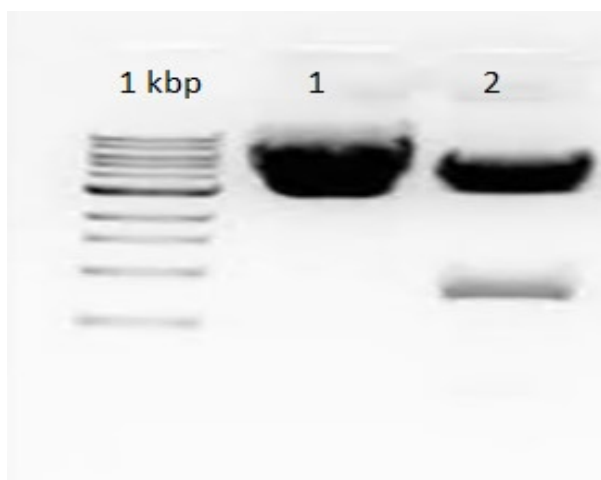
Námi odeslaná sekvenace byla porovnána se sekvencí z databáze WormBase obsahující celý genom *H. contortus*. Na obr. 23 lze vidět, že sekvenace se až na výjimky shodují. Na určitých místech se jednotlivé nukleotidy liší, což odpovídá frekvenci tzv. single nucleotide polymorphism (SNP). Při porovnání sekvenace přeložené do aminokyselin, se oba proteiny až na jednu změnu v pozici 50. (P50L) shodují.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
SDR3-DK	MSSHTSLTAARKFLTDRYAVVYSSASTKGIGFAIAKRLGADGASVYVSSRKLKNVEDAYNALRVEGIDAVGVPAHYGTDKDRKKLIQYAIIDRYGKLDILVSNAAVNPWFQIMHSISDSQDKLLQINVRSA													
SDR3	MSSHTSLTAARKFLTDRYAVVYSSASTKGIGFAIAKRLGADGASVYVSSRKLKNVEDAYNALRVEGIDAVGVPAHYGTDKDRKKLIQYAIIDRYGKLDILVSNAAVNPWFQIMHSISDSQDKLLQINVRSA													
Consensus	MSSHTSLTAARKFLTDRYAVVYSSASTKGIGFAIAKRLGADGASVYVSSRKLKNVEDAYNALRVEGIDAVGVPAHYGTDKDRKKLIQYAIIDRYGKLDILVSNAAVNPWFQIMHSISDSQDKLLQINVRSA													
	131	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260
SDR3-DK	QLTQEAAPHLERASGRGNVYLVSSVAGYSPIDGLGAYSYMKSTLIGLNKALSQLARRNIRYNAIAPGTIRTDFSRALYENEVDHQNALRSIPLNRLGHADECADAVSFLYSDEASYISGETIGVNGGHA													
SDR3	QLTQEAAPHLERASGRGNVYLVSSVAGYSPIDGLGAYSYMKSTLIGLNKALSQLARRNIRYNAIAPGTIRTDFSRALYENEVDHQNALRSIPLNRLGHADECADAVSFLYSDEASYISGETIGVNGGHA													
Consensus	QLTQEAAPHLERASGRGNVYLVSSVAGYSPIDGLGAYSYMKSTLIGLNKALSQLARRNIRYNAIAPGTIRTDFSRALYENEVDHQNALRSIPLNRLGHADECADAVSFLYSDEASYISGETIGVNGGHA													
	261	268												
SDR3-DK	HIENLYFQ													
SDR3	HI													
Consensus	HI.....													

Obr. 24 – Porovnání příslušné proteinové sekvence SDR3 z databáze s přeloženou získanou nukleotidovou sekvencí (SDR3-DK).

5. 7. Překlonování SDR3 ze sekvenačního do expresního vektoru

Po ověření sekvence v sekvenačním vektoru Zero-Blunt, bylo následně nutné překlonovat získanou SDR3 do expresního plasmidu pET22b(+). Plasmid nesoucí SDR3 (izolovaný z kolonie č.3) byl štěpen restrikními endonukleázami XhoI a NdeI. Následně byla provedena gelová elektroforéza a vzniklý fragment byl vyříznut a přečištěn z gelu. Stejným způsobem byl štěpený i plasmid pET22b(+), který byl přečištěn rovnou po štěpení bez kontroly na gelu.



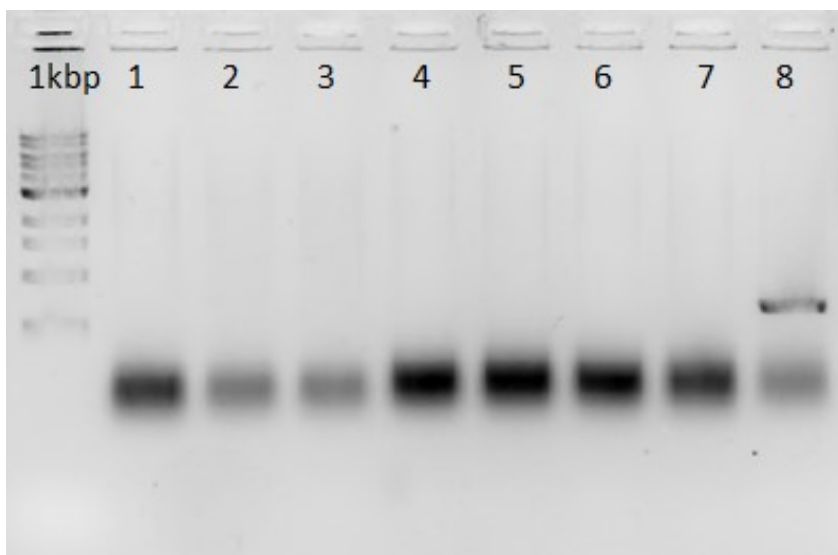
Obr. 25 – Gelová elektroforéza – štěpení pomocí XhoI a NdeI. Zleva v první jamce marker 1kbp, v jamce druhé neštěpený Zero-blunt plasmid s SDR3 dsDNA (1) a v třetí štěpený (2).

Na obr. 25 lze vidět, že štěpení proběhlo, tak jak by mělo. Na gelu je patrný vyštěpený fragment o přibližné velikosti 900bp, což odpovídá předpokládané velikosti SDR3.

5. 8. Koncentrace pET-22b(+) a SDR3 po štěpení XhoI a NdeI

Koncentrace obou přečištěných vzorků byla změřena spektrofotometricky. Koncentrace SDR3 byla 28,03 ng/μl, koncentrace pET-22b(+) 19,39 ng/μl. Jedná se o poměrně nízké koncentrace, které mohou negativně ovlivnit další výsledky práce. Následovala ligace a transformace vzorku do chemicky kompetentních buněk *E. coli*.

5. 9. Výsledky colony PCR po ligaci dsDNA SDR3 do pET-22b(+)

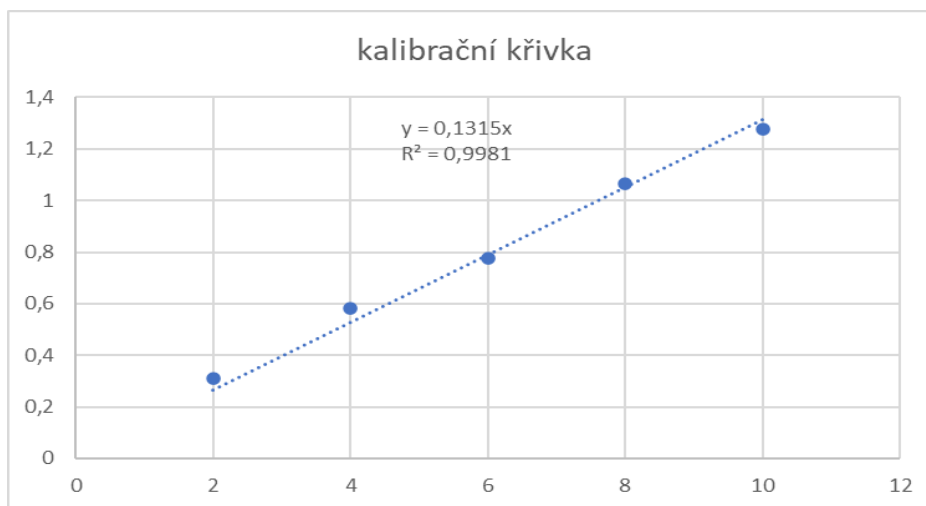


Obr. 26 – Gelová elektroforéza po colony PCR – v jamkách č. 1 – 8 byly naneseny vzorky z jednotlivých narostlých kolonií. Vlevo marker 1kbp.

Na obr. 26 lze vidět, že 8. kolonie vyhovovala. Došlo k ligaci dsDNA SDR3 do plasmidu pET-22b(+). Tato kolonie byla použita k získání většího množství plasmidu midiprepem. Pro jistotu byl plasmid opět sekvenován a potvrzena byla přítomnost SDR3.

5. 10. Výsledky stanovení proteinu metodou BCA

Pro ověření exprese SDR3 byl plasmid transfekován do buněk BL21. Po indukci IPTG byly z buněčného lyzátu uvolněny proteiny a jejich koncentrace byla stanovena metodou BCA.

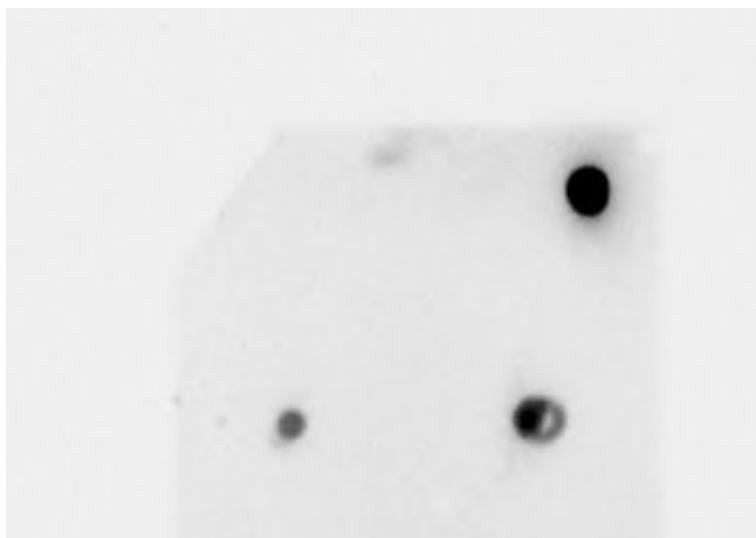


Obr. 27 – Kalibrační křivka využitá pro výpočet koncentrace proteinu metodou BCA

Na základě naměřených koncentrací byla sestrojena kalibrační křivka, tedy závislost absorbance (osa y) na koncentraci vzorku (osa x). Hodnoty byly proloženy přímkou lineární regrese a z rovnice byla dopočtena koncentrace našeho vzorku.

Koncentrace proteinů před indukcí byly 745,1 $\mu\text{g/ml}$ a po indukci 613 $\mu\text{g/ml}$.

5. 11. Výsledky transfekce metodou DotBlot



Obr. 28 – Výsledek metody DotBlot – průkaz přítomnosti proteinu

Závěrečný experiment ověřil přítomnost exprimovaného proteinu ve směsi pomocí detekce protilátkou proti Histidinové kotvě, která díky plasmidu byla na C-konci SDR3. Na obr. 26 lze vidět v pravém horním rohu pozitivní kontrolu přítomnosti proteinu. Ve spodní řadě lze vidět průkaz proteinu ve dvou různých koncentracích.

6 Diskuse

Haemonchóza představuje velmi problematické onemocnění postihující malé přežvýkavce, zejména ovce a kozy. Původcem haemonchózy je *Haemonchus contortus*, hlístice parazitující v gastrointestinálním traktu zvířat. Infekce je ve velkém počtu případů letální, což s sebou nese významný negativní ekonomický dopad pro chovatele zvěře [1; 4].

Esenciální pro zvládnání nákazy je včasná diagnostika a zahájení účinné léčby antiparazitiky. Bohužel značným problémem se stává neustále narůstající léková rezistence k většině dostupným, široce používaným anthelmintikům. Existují dva hlavní druhy rezistence. Prvním typem je rezistence nespecifická, která je zprostředkována zejména efluxními transportéry. Druhým, významnějším typem je rezistence specifická. Ta je vázána na jednotlivé skupiny léčiv, zprostředkována je pomocí specifických enzymatických drah. Žádoucí je tedy sledování a popis rozvoje rezistence a současný vývoj nových, účinných anthelmintik. [4; 22].

V posledních letech se výzkum rezistence, a tedy i potenciálních nových léčiv ubírá různými směry. Jedním z těchto směrů je zkoumání dvou enzymatických nadrobin – aldoketoreduktázy a reduktázy/dehydrogenázy s krátkým řetězcem. Jedná se doposud o velmi málo prozkoumané enzymy, tudíž je do jejich výzkumu, jakožto potenciálních cílů nových léčiv, vkládána veliká naděje [33; 50; 59].

SDRs představují zásadní roli v signálních procesech, několik SDRs se dokonce podílí na metabolismu anthelmintik, představují tak významný zdroj rezistence. Při srovnávání úrovní transkripce jednotlivých SDR mezi kmenem citlivým k léčivům (ISE) a kmenem rezistentním k benzimidazolům (IRE) byly zjištěny rozdíly v hladinách jednotlivých enzymů. Ve vajíčkách IRE kmene byly ve zvýšené míře exprimovány SDR1, SDR12, SDR13, SDR16 a SDR21. SDR4 a SDR19 byly naopak ve vyšší míře v ISE kmeni. V larválním stádiu L1 byly v IRE kmeni exprimovány ve zvýšené míře tytéž enzymy jako ve vajíčku, spolu s nimi i SDR2 a SDR20. Naopak v L3 stádiu byla většina SDR v IRE kmeni exprimována méně oproti ISE kmeni. Pouze SDR12, SDR16 a SDR21 dominovaly u IRE v L3 stádiu. U dospělců IRE dominovala exprese SDR1, SDR12, SDR13, SDR18, SDR21 a SDR23 v porovnání s ISE. Při srovnání obou pohlaví byl zjištěn pouze jeden signifikantní rozdíl, SDR1

dominoval u samičího pohlaví IRE kmene. Na základě těchto zjištěných informací lze usuzovat, že reduktázy mohou zastávat významnou roli v lékové rezistenci *H. contortus*. Z tohoto důvodu je nezbytné jim do budoucna věnovat pozornost jakožto možným cílům vyvíjených léčiv [59].

Oxidační aktivita enzymů byla dlouhodobě přehlížena u helmintů, nově se ale její zkoumání dostává do popředí. *H. contortus* má mnoho genů pro cytochomy (CYP) a jejich exprese se liší v závislosti na životním stádiu parazita. Geny CYPs pro endogenní substráty, které se vyskytují jako jedna kopie v obratlovcích se též vyskytují jako jedna kopie v *H. contortus*. Naopak geny CYPs pro metabolismus xenobiotik se vyskytují ve více kopiích, to je nejspíše způsobeno duplikací genů po expozici k danému toxinu. Ve vyšší míře byly exprimovány CYP34 a CYP35 (některé jsou inducibilní xenobiotiky) a jsou nadále zkoumány jako potenciální zdroje rezistence. Jako zdroj rezistence je zdokumentována oxidace albendazolu na albendazol-sulfoxid u *H. contortus*, *C. elegans*, ale také u *Dicrocoelium dendriticum* a *Fascioloides magna*. U *H. contortus* je zdokumentována dvojnásobná oxidace monepantelu (MOP) na MOP-sulfoxid a následně na MOP-sulfon. MOP-sulfon vzniká pouze v multirezistentních druzích White River izolátech [59].

Z enzymů II. fáze stojí za zmínku glutathiontransferázy (GSTs) a UDP-glykosyltransferázy (UGTs). První zmiňované se účastní detoxifikace lipidových peroxidů a karbonylových sloučenin. Současně GSTs jsou schopny vázat glutathion s xenobiotiky, ale dosud nebyly identifikovány konjugáty glutathionu s antihelmintiky. Zvýšená exprese GSTs je ale spjata s vyšší odolností larev *H. contortus* a *C. elegans* vůči vysychání [59].

Glukosidace byla popsána jako jedinečná metoda deaktivace benzimidazolů albendazolu a flubendazolu u *H. contortus* a *C. elegans*. Taktéž byla naměřena vyšší aktivita UGTs u volně žijících larev *H. contortus*, předpokládá se jeho význam u metabolismu naftalofosu [22; 59].

Dalším významným zdrojem rezistence nejen u helmintů jsou efluxní transportéry. V případě helmintů jsou nejvýznamnější rodinou ABC- transportéry (ATP-binding cassette). V případě nematod byl ABC transportér popsán u *H. contortus*, *B. malayi*, *C. elegans*, u několika dalších druhů *Caenorhabditis* a řady

dalších. Zdokumentována je rezistence k MLs, zejména k ivermektinu, za kterou stojí právě ABC transportéry [59].

V úvodu experimentální části byl pomocí PCR amplifikován gen pro SDR3 s příslušnými primery. Poté následovalo zaklonování nejprve do Zeroblunt plasmidu, následně byl náš gen vložen do vektoru pET-22b(+). Takto modifikovaný plasmid byl vložen do kompetentních *E. coli*. Tím byla umožněna translace příslušného genu do aminokyselinové podoby. Takto připravený enzym může být využit pro zkoumání rezistence, či přípravu nových účinných látek.

7 Závěr

V rámci diplomové práce byla provedena literární rešerše zahrnující problematiku *H. contortus*, haemonchózy, možnosti léčby této nákazy a taky stav lékové rezistence na nejčastěji používaná anthelmintika. Součástí rešerše jsou i kapitoly týkající se dvou nadrodin enzymů – karbonylreduktázy a dehydrogenázy/reduktázy s krátkým řetězcem.

V experimentální části byl za využití metod molekulární biologie připraven plasmid nesoucí gen pro SDR3. Využitými metodami byla PCR, ligace do vektoru, sekvenace, transformace, namnožení a izolace plasmidu a transfekce. Takto připravený plasmid může být využit dále pro studium aktivity tohoto enzymu.

8 Seznam použitých zkratk

- ABC – ATP – binding cassette
- AKR – Aldoketoreduktáza
- AMK – Aminokyselina
- AMP – Ampicilin
- API – Active pharmaceutical ingredient
- BCA – Bicinchonic acid
- BH4 – Tetrahydrobiopterin
- BH2 – Dihydrobiopterin
- CBR – Karbonylreduktáza
- CRPC – Kastrálně rezistentní karcinom prostaty
- CYP – Cytochrom
- DF – Diafiltrace
- DHPR – Dihydropteridinreduktáza
- DSU – Derivát sulfonylurey
- ECL – Enhanced chemiluminescence
- EDTA – Kyselina ethylendiamintetraoctová
- FAMACHA – Faffa Malan Chart
- FW – Forward primer
- FWEC - Faecal worm egg counts
- GalE – Uridildifosfátgalaktosa-4-epimeráza
- GIT – Gastrointestinální trakt
- GlucA – Glukuronát
- GluCl – Glutamate gated chlorid channels
- GSNO – S-nitrosoglutahion
- GST – Glutathion tranferáza
- HPA – Hyperfenylalaninemie
- HSD – Hydroxysteroiddehydrogenáza
- IPM – Integrated parasite management
- IPTG – Isopropyl β -D-1-tiogalaktopyranosid
- IRE – Benzimidazole resistant isolate

- ISE – Susceptible isolate
- LB – Lysogeny broth
- LCA – Leber congenital amaurosis
- MCS – Multiple cloning site
- ML – Makrocyclické laktony
- MOP – Monepantel
- nAChR – Nikotinový acetylcholinový receptor
- NAPQI – N-acetyl-p-benzochinon-imin
- NSAID – Non-steroidal anti-inflammatory drug
- PAH – Polycyklický aromatický uhlovodík
- PAPS – Fosfoadenosin fosfosulfát
- PGF – Prostaglandin F syntáza
- REV – Reverse primer
- ROS – Reaktivní formy kyslíku, reactive oxygen species
- Rpm – Rounds per minute
- SDR – Small chain dehydrogenases/reductases
- SOC – Super optimal broth
- TAE – Tris – acetát – EDTA pufr
- TBST – Tris-buffered saline with 0,1% Tween 20 detergent
- UGT – UDP-glukuronosyltransferáza

9 Seznam použité literatury

1. VanHoy, G. (n.d.). *Common Gastrointestinal Parasites of Small Ruminants*. MSD VeterinaryManual. Dostupné z: <https://www.msddvetmanual.com/digestivesystem/gastrointestinal-parasites-of-ruminants/common-gastrointestinal-parasites-of-small-ruminants#v81479446>. [citováno 2024-05-03].
2. KAUFMANN, J. *Parasitic diseases of domestic animals: a diagnostic manual*. Basel: Berlin - Birkhauser (1996). 423-425.
3. *Barber's pole worm in sheep*. (n.d.). Agriculture and Food Dostupné z: <https://www.agric.wa.gov.au/livestockparasites/barbers-pole-wormsheep?page=0%2C0>. [citováno 2024-05-03].
4. Besier, R., Kahn, L., Sargison, N., & Van Wyk, J. (2016b). The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. In *Advances in Parasitology*, 95–143.
5. Emery, D., Hunt, P. W., & Jambre, L. L. (2016). *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *International Journal for Parasitology*, 46(12), 755–769.
6. Harold C. Gibbs, J.R. Baker, R. Muller (1986). *Advances in Parasitology*, Academic Press Hypobiosis in Parasitic Nematodes—An Update, Editor(s): Academic Press, Volume 25, 129-130.
7. Fox. M. T. 2016. Gastrointestinal parasites of sheep and goats. Dostupné z: <http://www.merckvetmanual.com/digestivesystem/gastrointestinal-parasites-of-ruminants/gastrointestinal-parasites-of-sheep-and-goats>. [citováno 2024-05-03].
8. Gareh, A., Elhawary, N. M., Tahoun, A., Ramez, A. M., El-Shewehy, D., Elbaz, E., Khalifa, M. I., Alsharif, K. F., Khalifa, R., Dyab, A. K., Monib, M., Arafa, M. I., & Elmahallawy, E. K. (2021b). Epidemiological, Morphological, and Morphometric Study on *Haemonchus* spp. Recovered From Goats in Egypt. *Frontiers in Veterinary Science*, 8.
9. Tak, irfan rauf & Shoaib, Ali & Dar, Jehangir & Dar, Shoaib & Ganai, Bashir & Chishti, M Zahoor & Bhat, Fayaz Ahmad. (2014). A Brief Study of Morphology of

Haemonchus contortus and its Hematophagous Behaviour. *Global Veterinaria*. 13 (6). 960-965.

10. Hunt, P.W., Knox, M.R., Le Jambre, L.F., McNally, J., Anderson, L.J. (2008). Genetic and phenotypic differences between isolates of *Haemonchus contortus* in Australia. *Int. J. Parasitol.* 38, 885 – 990.

11. Bowman, D.D. (2014). *Georgi's Parasitology for Veterinarians*, tenth ed. Elsevier Health Science Division, Philadelphia, USA.

12. Malan, F.S., Van Wyk, J.A., Wessels, C.D. (2001). Clinical evaluation of anaemia in sheep: early trials. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 68, 165-174.

13. Iliev, P., Prelezov, P., Иванов, A. B., Kirkova, Z., & Tonev, A. (2017). Clinical study of acute haemonchosis in lambs. *Trakia Journal of Sciences*, 15(1), 74–78.

14. Zarlenga, D. S., Hoberg, E. P., & Tuo, W. (2016). The identification of *Haemonchus* species and diagnosis of Haemonchosis. In *Advances in Parasitology*, 145–180.

15. Van Wyk, J., & Bath, G. F. (2002). The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research*, 33(5), 509–529.

16. Barger, I., & Dash, K. (1987). Repeatability of ovine faecal egg counts and blood packed cell volumes in *Haemonchus contortus* infections. *International Journal for Parasitology*, 17(4), 977–980.

17. McKellar, Q., & Jackson, F. (2004). Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends in Parasitology*, 20(10), 456–461.

18. Playford, M., Smith, A., Love, S. C. J., Besier, R., Kluver, P., & Bailey, J. N. (2014). Prevalence and severity of anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in Australia (2009–2012). *Australian Veterinary Journal*, 92(12), 464–471.

19. Nakatani, M. T. M., Burgas, D. G. L., Conde, M. H., De Freitas, M. G., Tutija, J. F., Rodrigues, V. D., Reckziegel, G. H., Carollo, C. A., & De Almeida Borges,

F. (2023). Synergism of macrocyclic lactones against *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*, 122(3), 867–876.

20. Hosking, B. C., Kaminsky, R., Sager, H., Rolfe, P., & Seewald, W. (2009). A pooled analysis of the efficacy of monepantel, an amino-acetonitrile derivative against gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitology Research*, 106(2), 529–532.

21. Lanusse, C., Álvarez, L. I. O., & Lifschitz, A. L. (2016). Gaining Insights Into the Pharmacology of Anthelmintics Using *Haemonchus contortus* as a Model Nematode. In *Advances in Parasitology*, 465–518.

22. Kotze, A. C., & Prichard, R. K. (2016). Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. In *Advances in Parasitology*, 397–428.

23. ŠVIHOVEC, Jan; BULTAS, Jan; ANZENBACHER, Pavel; CHLÁDEK, Jaroslav; PŘÍBORSKÝ, Jan et al. (ed.). (2018). *Farmakologie. Ilustroval Miroslav BARTÁK. Praha: Grada Publishing.*

24. Lyndal-Murphy, M., Ehrlich, W., & Mayer, D. G. (2014). Anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in inland southern Queensland. *Australian Veterinary Journal*, 92(11), 415–420.

25. Hahnel, S., Zdraljevic, S., Rodriguez, B., Zhao, Y., McGrath, P. T., & Andersen, E. C. (2018). Extreme allelic heterogeneity at a *Caenorhabditis elegans* beta-tubulin locus explains natural resistance to benzimidazoles. *PLOS Pathogens*, 14(10), 1-26.

26. Furtado, L. F. V., De Paiva Bello, A. C. P., & Rabelo, É. M. L. (2016). Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis. *Acta Tropica*, 162, 95–102.

27. Sarai, R. S., Kopp, S., Knox, M., Coleman, G., & Kotze, A. C. (2015). In vitro levamisole selection pressure on larval stages of *Haemonchus contortus* over nine generations gives rise to drug resistance and target site gene expression changes specific to the early larval stages only. *Veterinary Parasitology*, 211(1–2), 45–53.

28. Urdaneta-Márquez, L., Bae, S. H., Janukavicius, P., Beech, R. N., Dent, J. A., & Prichard, R. K. (2014). A dyf-7 haplotype causes sensory neuron defects and is associated with macrocyclic lactone resistance worldwide in the nematode parasite *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, *44*(14), 1063–1071.
29. Lynagh, T., & Lynch, J. W. (2010). A glycine residue essential for high ivermectin sensitivity in Cys-loop ion channel receptors. *International Journal for Parasitology*, *40*(13), 1477–1481.
30. Hofman, J., Štaud, F. Metabolismus léčiv [Online]. [Hradec Králové (Czechia)]. 44. Dostupné z: <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijnimaterialy/KFLT/?path=farmakologie+a+toxikologie>. [citováno 2024-02-08].
31. Jan, Š., & Kolektiv. (2018). *Farmakologie*. Grada Publishing a.s.
32. Ritter, J. M., Flower, R. J., Henderson, G., Loke, Y. K., MacEwan, D., Robinson, E., & Fullerton, J. (2023). *Rang & Dale's Pharmacology*. Elsevier.
33. Forrest, G. L., & Gonzalez, B. (2000). Carbonyl reductase. *Chemico-Biological Interactions*, *129*(1–2), 21–40.
34. Ledvina, M., Stoklasová, A., & Cerman, J. (2005). *Biochemie pro studující medicíny. 1. díl: kapitola 1-13*.
35. Weiner, H., & Wermuth, B. (1982). *Enzymology of carbonyl metabolism : aldehyde dehydrogenase and aldo/keto reductase : proceedings of a workshop entitled Enzymology of Aldehyde Dehydrogenase and Aldehyde-Ketone Reductase*, 291 – 305.
36. Jin, Y., & Penning, T. (2007). Aldo-Keto reductases and Bioactivation/Detoxication. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *47*(1), 263–292.
37. Penning, T., Wangtrakuldee, P., & Auchus, R. J. (2018). Structural and Functional biology of Aldo-Keto reductase Steroid-Transforming Enzymes. *Endocrine Reviews*, *40*(2), 447–475.

38. Jez, J. M., Flynn, T. G., & Penning, T. (1997). A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochemical Pharmacology*, 54(6), 639–647.
39. Penning, T., & Drury, J. E. (2007). Human aldo–keto reductases: Function, gene regulation, and single nucleotide polymorphisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 464(2), 241–250.
40. O'connor, T., Ireland, LS., Harrison, DJ., Hayes, JD. (1999). Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochem J.* 343(2):487-504.
41. Stomberski, CT., Anand, P., Venetos, NM., Hausladen, A., Zhou, HL., Premont, RT., Stamler, JS. (2019). AKR1A1 is a novel mammalian S-nitroso-glutathione reductase. *J Biol Chem.* 29;294(48), 18285-18293.
42. Penning, T. (2014). Human Aldo-Keto reductases and the metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemical Research in Toxicology*, 27(11), 1901–1917.
43. Iino, K., Toriumi, K., Agarie, R., Miyashita, M., Suzuki, K., Horiuchi, Y., Niizato, K., Oshima, K., Imai, A., Nagase, Y., Kushima, I., Koike, S., Ikegame, T., Jinde, S., Nagata, E., Washizuka, S., Miyata, T., Takizawa, S., Hashimoto, R., . . . Arai, M. (2021b). AKR1A1 variant associated with schizophrenia causes exon skipping, leading to loss of enzymatic activity. *Frontiers in Genetics*, 12.
44. Endo, S., Matsunaga, T., & Nishinaka, T. (2021). The role of AKR1B10 in physiology and pathophysiology. *Metabolites*, 11(6), 1 – 23.
45. Qu, J., Li, J., Zhang, Y., He, R., Liu, X., Gong, K., Duan, L., Luo, W., Hu, Z., Wang, G., Xia, C., & Luo, D. (2021). AKR1B10 promotes breast cancer cell proliferation and migration via the PI3K/AKT/NF-κB signaling pathway. *Cell & Bioscience*, 11(1), 1 – 13.
46. Zeng, C., Chang, L., Ying, M., Cao, J., He, Q., Zhu, H., & Yang, B. (2017). Aldo–Keto reductase AKR1C1–AKR1C4: Functions, regulation, and intervention for anti-cancer therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 8.

47. Weners, A., Hartmann, F., Jochens, A., Roemer, A. M., Alkatout, I., Klapper, W., et al. (2016). Stromal markers AKR1C1 and AKR1C2 are prognostic factors in primary human breast cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 21, 548–556.

48. Chow, R. K. K., Sin, S. T. K., Liu, M., Li, Y., Chan, T., Song, Y., Kwong, D. L. W., & Guan, X. Y. (2016). AKR7A3 suppresses tumorigenicity and chemoresistance in hepatocellular carcinoma through attenuation of ERK, c-Jun and NF- κ B signaling pathways. *Oncotarget*, 8(48), 83469–83479.

49. Liu, H., Song, Y., Min, J., Wang, R., Li, H., Zhu, L., Guo, Y., Gan, D., Li, S., Ma, P., Yang, C., Yang, J., Shi, J., Li, J., & Su, H. (2023). AKR7A3 modulates the metastasis of pancreatic ductal adenocarcinoma through regulating PHGDH-suppressed autophagy. *Cancer Science*, 114(8), 3101–3113.

50. Persson, B., & Kallberg, Y. (2013). Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chemico-Biological Interactions*, 202(1–3), 111–115.

51. Rasmussen, M. K., Ekstrand, B., & Zamaratskaia, G. (2013). Regulation of 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17926–17942.

52. Thomas, J. L., Bucholtz, K. M., & Kacsóh, B. (2011). Selective inhibition of human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a potential treatment for breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125(1–2), 57–65.

53. Sarkar, H., & Moosajee, M. (2019). Retinol dehydrogenase 12 (RDH12): Role in vision, retinal disease and future perspectives. *Experimental Eye Research*, 188, 107793.

54. Wu, Y., Huang, T., Li, X. et al. (2023). Retinol dehydrogenase 10 reduction mediated retinol metabolism disorder promotes diabetic cardiomyopathy in male mice. *Nat Commun* 14, 1181.

55. Ponzzone, A., Spada, M., Ferraris, S., Dianzani, I., & De Sanctis, L. (2003). Dihydropteridine reductase deficiency in man: From biology to treatment. *Medicinal Research Reviews*, 24(2), 127–150.

56. Demirbas, D., Coelho, A. D., Rubio-Gozalbo, M. E., & Berry, G. T. (2018). Hereditary galactosemia. *Metabolism*, *83*, 188–196.
57. Frey, P. A., & Hegeman, A. D. (2013). Chemical and stereochemical actions of UDP–Galactose 4-Epimerase. *Accounts of Chemical Research*, *46*(7), 1417–1426.
58. Matoušková, P., Vokřál, I., Lamka, J., & Skálová, L. (2016). The role of Xenobiotic-Metabolizing enzymes in anthelmintic deactivation and resistance in helminths. *Trends in Parasitology*, *32*(6), 481–491.
59. Štěřbová, K., Rychlá, N., Matoušková, P., Skálová, L., & Stuchlíková, L. R. (2023). Short-chain dehydrogenases in *Haemonchus contortus*: changes during life cycle and in relation to drug-resistance. *Veterinary Research*, *54*(1).

10 Seznam použitých obrázků

Obr. 1 – Vývojový cyklus <i>Haemonchus contortus</i> (převzato z: [5])	11
Obr. 2 – Morfologie <i>Haemonchus spp.</i> pod elektronovým mikroskopem (sameček) Samčí ocasní část ve tvaru písmene Y s kopulatoční burzou (červená šipka) (převzato z: [8]).....	12
Obr. 3 – Morfologie <i>Haemonchus spp.</i> pod elektronovým mikroskopem (samička) Polymorfismus vulvárního krytí u samiče; A – široký, velký plát; B – útvar podobný kouli (převzato z: [8])	12
Obr. 4 – Bílé zbarvení spojivek (převzato z: [13])	13
Obr. 5 – Část DNA kódující β -tubulin s vyznačenými mutacemi zodpovědnými za rozvoj rezistence (převzato z: [25])	18
Obr. 6 – Krystalická struktura lidské CBR1 v komplexu s hydroxy-PP (převzato z PDB).....	21
Obr. 7 – Přehled lidských AKRs a jejich lokalizace na konkrétním chromozomu (převzato z [37]).....	22
Obr. 8 – 7 druhů SDRs. Horní číslo specifikuje počet zástupců, spodní číslo počet rodin. Pod nimi je specifikována aktivita jednotlivých skupin (převzato z: [50])	26
Obr. 9 – Rozložení SDR rodin mezi Archea (A), prokaryota (B) a eukaryota (E). 34 rodin se nachází napříč všemi druhy, naopak neexistuje typický zástupce pro Archea (převzato z: [50]).....	27
Obr. 10 – Mechanismus reakce RDH12 (převzato z: [53]).....	28
Obr. 11 – Epimerizace UDP-glc na UDP-gal katalyzováno GalE (převzato z: [56]).....	29
Obr. 12 – Výpočet množství inzertu v ng přes LabGuide.cz	38
Obr. 13 – Schéma reakce při tvorbě komplexu	51
Obr. 14 – Gelová elektroforéza – amplifikace SDR3 a SDR8. V první jamce byl nanesen 100bp marker. Následně v jamkách 1-2 bylo nanášeno zprava SDR3 a SDR18.....	52

Obr. 15 – Gelová elektroforéza – štěpení enzymy XhoI a NdeI. V první jamce je nanesen marker 100bp. Dále v jamkách 1-4 bylo nanesen pET-22b(+) s oběma enzymy (1), pET-22b(+) bez enzymů (2), pET-22b(+) s XhoI (3) a pET-22b(+) s NdeI (4).....	53
Obr. 16 – Gelová elektroforéza – colony PCR. V horní řadě (jamky č. 1 – 9) byly nanesen vzorky s SDR13. V dolní řadě (jamky č. 1 – 9) byly nanesen vzorky s SDR18. Vedle nich v obou sloupcích byla nanesena kontrolní směs (k) a prázdný plasmid pET-22b(+) (p) a 100bp marker.....	54
Obr. 17 – Porovnání sekvence kódujícího úseku SDR3 (začátek sekvence), obdržené sekvence (DHK691_rc) a použitého FW-primeru	55
Obr. 18 – Porovnání sekvence kódujícího úseku SDR3 (konec sekvence), obdržené sekvence (DHK690) a použitého REV-primeru	55
Obr. 19 – Porovnání sekvence kódujícího úseku SDR18 (začátek sekvence), obdržené sekvence (DHK693_rc) a použitého FW-primeru	55
Obr. 20 – Porovnání sekvence kódujícího úseku SDR18 (konec sekvence), obdržené sekvence (DHK692) a použitého REV-primeru. Žlutě vyznačený nukleotid je v sekvenci navíc.....	55
Obr. 21	56
Obr. 22 – Gelová elektroforéza po colony PCR – v jamkách č. 1 – 11 byly nanesen vzorky z jednotlivých narostlých kolonií. Vpravo marker 100bp.	57
Obr. 23 – Porovnání kódující sekvence SDR3 se získanou nukleotidovou sekvencí Zero-blunt plasmidu s vloženou SDR3 dsDNA (DHK710, DHK713).	58
Obr. 24 – Porovnání příslušné proteinové sekvence SDR3 z databáze s přeloženou získanou nukleotidovou sekvencí (SDR3-DK).....	59
Obr. 25 – Gelová elektroforéza – štěpení pomocí XhoI a NdeI. Zleva v první jamce marker 1kbp, v jamce druhé neštěpený Zero-blunt plasmid s SDR3 dsDNA (1) a v třetí štěpený (2).....	59
Obr. 26 – Gelová elektroforéza po colony PCR – v jamkách č. 1 – 8 byly nanesen vzorky z jednotlivých narostlých kolonií. Vlevo marker 1kbp.....	60
Obr. 27 – Kalibrační křivka využitá pro výpočet koncentrace proteinu metodou BCA.....	61

Obr. 28 – Výsledek metody DotBlot – průkaz přítomnosti proteinu.....62

11 Seznam použitých tabulek

Tabulka 1 – PCR směs pro amplifikaci SDR.....	34
Tabulka 2 – PCR program pro amplifikaci, žlutě označená část byla opakována 30x (čas je uveden v sekundách).....	35
Tabulka 3 – Složení směsí obsahující dsDNA pro štěpení, 4 vzorky	37
Tabulka 4 – Složení směsí obsahujících plasmid pET-22b(+) pro štěpení, žlutě označena je směs pro nadcházející ligaci.....	37
Tabulka 5 – Složení reakční směsi pro ligaci.....	39
Tabulka 6 – Složení mastermixu pro colony PCR.....	40
Tabulka 7 – Složení kontrolní směsi pro colony PCR	40
Tabulka 8 – OneTaq colony PCR schéma.....	40
Tabulka 9 – Složení reakční směsi pro PCR amplifikaci.....	41
Tabulka 10 – Složení ligační směsi pro ligaci do Zero-blunt vectoru	42
Tabulka 11 – Složení mastermixu pro colony PCR.....	42
Tabulka 12 – Složení směsi pro štěpení enzymy XhoI a NdeI	44
Tabulka 13 – Složení ligační a kontrolní směsi pro ligaci	46
Tabulka 14 – Naměřené hodnoty absorpance při měření OD	49
Tabulka 15 – Složení směsí a jejich koncentrace pro kalibrační křivku	50
Tabulka 16 – Naměřené absorpance vzorků a koncentrace dsDNA po přečištění.....	52
Tabulka 17 – Koncentrace vzorků s dsDNA po štěpení (první dva) a pET-22b(+) štěpený oběma enzymy (poslední).....	53
Tabulka 18 – Naměřené koncentrace po PCR amplifikaci.....	56