

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biochemických věd

Diplomová práce

Stanovení exprese enzymů DHRS7B a
DHRS7C v lidských tkáních

Vedoucí diplomové práce: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Odborný konzultant: RNDr. Lucie Zemanová Ph.D.

RNDr. Eva Novotná Ph.D.

Hradec Králové 2017

Bc. Klára Kozáková

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

Souhlasím, aby tato práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

V Hradci Králové, dne 15. května

.....

podpis

Ráda bych tímto poděkovala svému školiteli prof. Ing. Vladimíru Wsólvi, Ph.D., RNDr. Lucii Zemanové Ph.D. a RNDr. Evě Novotné Ph.D. za poskytnutí cenných rad a za ochotu a trpělivost při zpracování této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat rodině za podporu po dobu celého studia na této škole.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Klára Kozáková

Školitel: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení exprese enzymů DHRS7B a DHRS7C v lidských tkáních

Dehydrogenáza/reduktáza SDR nadrodiny člen 7B (DHRS7B) a 7C (DHRS7C) jsou lidské enzymy patřící do nadrodiny dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR). Tato velice stará a rozsáhlá nadrodina zahrnuje členy, kteří hrají roli v různých fyziologických dějích a patologických stavech. I přesto, že jsou v současné době lidské SDR enzymy více studované, patří stále asi polovina z nich mezi málo charakterizované, jako např. enzymy DHRS7B a DHRS7C.

Cílem této práce bylo stanovit expresi lidských enzymů DHRS7B a DHRS7C na úrovni mRNA i na úrovni proteinu a tím přispět k rozvoji nových poznatků o těchto enzymech. Exprese enzymů byla stanovena ve vzorcích lidských tkání. Ze vzorků byla izolována mRNA, která byla použita pro přepis do cDNA. Vzniklá cDNA byla použita jako templát pro provedení qPCR s fluorescenční detekcí pomocí SYBR GREEN I. Stanovení na úrovni proteinu bylo provedeno v homogenátech lidských tkání pomocí metody Western blotting s chemiluminiscenční detekcí.

Exprese mRNA enzymu DHRS7B byla nejsilnější ve varlatech, a o něco nižší v kosterním svalu, ledvinách, mozku, nadledvině, prostatě, sítnici, štítné žláze a podkožním tuku. V ostatních tkáních (děloha, játra, slezina, slinivka, srdce, tenké střevo, tlusté střevo, viscerální tuk, vaječníky a žaludek) byla exprese velice slabá. Na úrovni proteinu byla pozorována exprese v mozku a slinivce. Exprese mRNA enzymu DHRS7C byla nejsilnější v kosterním svalu a za ním následovala výrazně slabší exprese v srdečním svalu. V ostatních tkáních (děloha, játra, ledviny, mozek, nadledvina, prostata, sítnice, slezina, slinivka, štítná žláza, tenké střevo, tlusté střevo, tuk podkožní, tuk viscerální, vaječníky, varlata a žaludek) byla hladina exprese zanedbatelná. Na úrovni proteinu byla exprese zaznamenána u kosterního svalu, srdečního svalu a štítné žláze.

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Klára Kozáková

Supervisor: prof. Ing. Vladimír Wsól, Ph.D.

Title of diploma thesis: Determination of the expression of enzymes DHRS7B and DHRS7C in human tissues

Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7B (DHRS7B) and 7C (DHRS7C) are human enzymes that belong to the short chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily. This very old and extensive superfamily includes members, which play an important role in different physiological and pathological processes. In spite of that the SDR enzymes are currently more studied, still about half of these enzymes are only poorly characterized, such as DHRS7B and DHRS7C.

The aim of this study was the determination of the expression profiles of human enzymes DHRS7B and DHRS7C at mRNA and protein level and thus brings new knowledge of these enzymes. Expression of enzymes was tested in human tissues. RNA was isolated from the samples and used for transcription to cDNA. Obtained cDNA was utilized as a template for qPCR with fluorescence SYBR GREEN I detection. Determination of enzymes at protein level was done in homogenates of human tissues by using a Western blotting with chemiluminescence detection.

The level of expression mRNA DHRS7B was strongest in testes and a slightly weaker expression was detected in skeletal muscle, kidney, brain, adrenal glands, prostate, retina, thyroid and subcutaneous fat. Expression of other tissues (uterus, liver, spleen, pancreas, heart, small intestine, large intestine, visceral fat, ovaries and stomach) was very low. The expression of DHRS7B at protein level was detected in brain and pancreas. The highest expression of mRNA DHRS7C was in skeletal muscle, following very low expression of heart. The level of the expression in other tissues (uterus, liver, kidney, brain, adrenal glands, prostate, retina, spleen, pancreas, thyroid, small intestine, large intestine, subcutaneous fat, visceral fat, ovaries, testes and stomach) was insignificant. The expression of DHRS7C at protein level was observed in skeletal muscle, heart and thyroid.

Obsah

1 Úvod	10
2 Teoretická část	11
2.1 Nadrodina dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR)	11
2.1.1 Vlastnosti SDR enzymů	11
2.1.2 Lidské SDR enzymy	12
2.1.3 Význam lidských SDR enzymů	14
2.1.4 DHRS7B enzym	15
2.1.4.1 Lokalizace DHRS7B	15
2.1.4.2 Funkce DHRS7B v organismu	16
2.1.5 DHRS7C enzym	16
2.1.5.1 Lokalizace DHRS7C	17
2.1.5.2 Funkce DHRS7C v organismu	18
2.1.5.3 Spojení DHRS7C s onemocněním	18
2.2 Možnosti stanovení exprese na úrovni mRNA	19
2.2.1 Polymerázová řetězová reakce	19
2.2.1.1 Princip PCR	20
2.2.1.2 Složky reakční směsi	22
2.2.1.3 Detekce PCR produktů	24
2.2.2 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)	24
2.2.2.1 Kinetika qPCR reakce	25
2.2.2.2 Kvantitativní analýza pomocí qPCR	26
2.2.2.3 Vyhodnocení amplifikačních křivek	26
2.2.2.4 Efektivita qPCR reakce	28
2.2.2.5 Detekce nespecifických produktů	29
2.3 Možnosti stanovení exprese na úrovni proteinu	30

2.3.1	Gelová elektroforéza	30
2.3.1.1	Separace proteinů	30
2.3.1.2	Hmotnostní markery	31
2.3.1.3	Detekce proteinů po elektroforéze	31
2.3.2	Western blotting	31
2.3.2.1	Transfer proteinů	31
2.3.2.2	Navázání protilátek	32
2.3.2.3	Detekce	33
2.3.2.4	Kvantifikace proteinů	34
2.3.3	Hmotnostní spektrometrie	34
3	Cíl práce	36
4	Experimentální část	37
4.1	Použitý materiál a přístroje	37
4.1.1	Chemikálie	37
4.1.2	Materiál a pomůcky	38
4.1.3	Přístroje	38
4.1.4	Hmotnostní marker	38
4.1.5	Enzymy	39
4.1.6	Kity	39
4.1.7	Plazmidy	39
4.1.8	Primery	39
4.1.9	Protilátky a pozitivní kontroly	40
4.1.10	Pracovní roztoky pro elektroforézu a Western blotting	40
4.1.11	Vzorky	42
4.2	Metodika	42
4.2.1	Kalibrační řada	42
4.2.2	Izolace RNA	42

4.2.3	Odstranění genomové DNA	43
4.2.4	Reverzní transkripce	43
4.2.5	Stanovení integrity RNA	44
4.2.5.1	Metoda 3': 5' assay	44
4.2.5.2	Metoda RIN (RNA integrity number)	45
4.2.6	Návrh primerů	45
4.2.7	Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)	46
4.2.8	SDS-PAGE elektroforéza	47
4.2.8.1	Příprava gelů	47
4.2.8.2	Příprava pozitivních kontrol a vzorků	48
4.2.8.3	Elektroforéza	49
4.2.9	Western blotting	50
4.2.9.1	Příprava blotu a blotování	50
4.2.9.2	Kontrola přenosu proteinů na membránu	51
4.2.9.3	Navázání protilátek	51
4.2.9.4	Chemiluminiscenční detekce	52
5	Výsledková část	53
5.1	Stanovení exprese na úrovni mRNA	53
5.1.1	Příprava vzorků	53
5.1.2	Ověření integrity cDNA	53
5.1.3	Kvalitativní PCR v reálném čase	57
5.1.3.1	Ověření specifity primerů	57
5.1.3.2	Ověření validity výsledků	59
5.1.4	Vyhodnocení mRNA ve tkáních	60
5.1.4.1	Exprese mRNA enzymu DHRS7B	61
5.1.4.2	Exprese mRNA enzymu DHRS7C	63
5.2	Stanovení exprese na úrovni proteinu	65

5.2.1 Western blotting	65
5.2.1.1 Exprese enzymu DHRS7B	66
5.2.1.2 Exprese enzymu DHRS7C	67
6 Diskuze	68
7 Závěr	71
8 Seznam zkratk	73
9 Seznam použité literatury	75
10 Internetové zdroje	80
11 Přílohy	82

1 Úvod

Proteiny hrají důležitou roli v našem organismu, jsou stavebními kameny organismu, zprostředkovávají transport látek v tělních tekutinách, regulují různorodé biochemické procesy v našem těle, podílejí se na fungování imunitního systému, plní funkci signálních molekul, hormonů, receptorů a mnohé další. Mimo jiné plní funkci katalytickou prostřednictvím enzymů, biokatalyzátorů chemických reakcí probíhajících v lidském těle. Z lidských významných lze jmenovat: DNA ligázu účastnící se replikace DNA, ATP syntázu katalyzující tvorbu ATP nebo glukóza-6-fosfátizomerázu participující se na metabolismu sacharidů.

Mimo znalosti reakce, kterou konkrétní enzym katalyzuje, je důležité také znát, ve kterých tkáních se nachází. Pro charakterizaci a odhad funkce dosud necharakterizovaných enzymů je tato znalost velice důležitá.

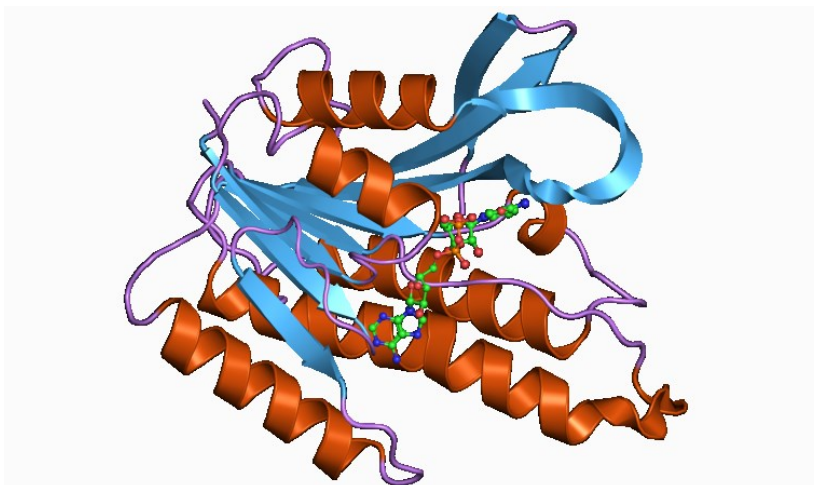
2 Teoretická část

2.1 Nadrodina dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR)

Nadrodina dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem (SDR) je jedna z největších a nejstarších nadrodin, která obsahuje přes 650 000 členů (Jörnvall et al. 2015). Zásadou metagenomického sekvenování bylo zjištěno, že se tyto enzymy nacházejí ve všech formách života: archea, eubakteria a eukaryota (Bhatia et al. 2015, Bray et al. 2009). Členové SDR nadrodiny hrají důležitou roli při regulaci celé řady životně důležitých procesů, jako je metabolismus lipidů, steroidů, prostaglandinů, retinoidů nebo steroidních hormonů. Mimo jiné se SDR enzymy podílejí na detoxifikaci a utilizaci xenobiotik, alkoholů a endogenních metabolitů (Bhatia et al. 2015, Persson et al. 2009).

2.1.1 Vlastnosti SDR enzymů

Klasický SDR enzym se skládá z jednodoménové proteinové podjednotky obsahující 250 - 350 aminokyselinových zbytků, které je tvořena Rossmannovým záhybem s 6 - 7 β -skládanými listy obklopenými z obou stran α -helixy (Obr. 1) (Bray et al. 2009, Persson a Kallberg 2013).



Obrázek 1: Jednodoménová podjednotka SDR proteinu: β -skládaný list označen modře, α -helix označen oranžově (Internet 1).

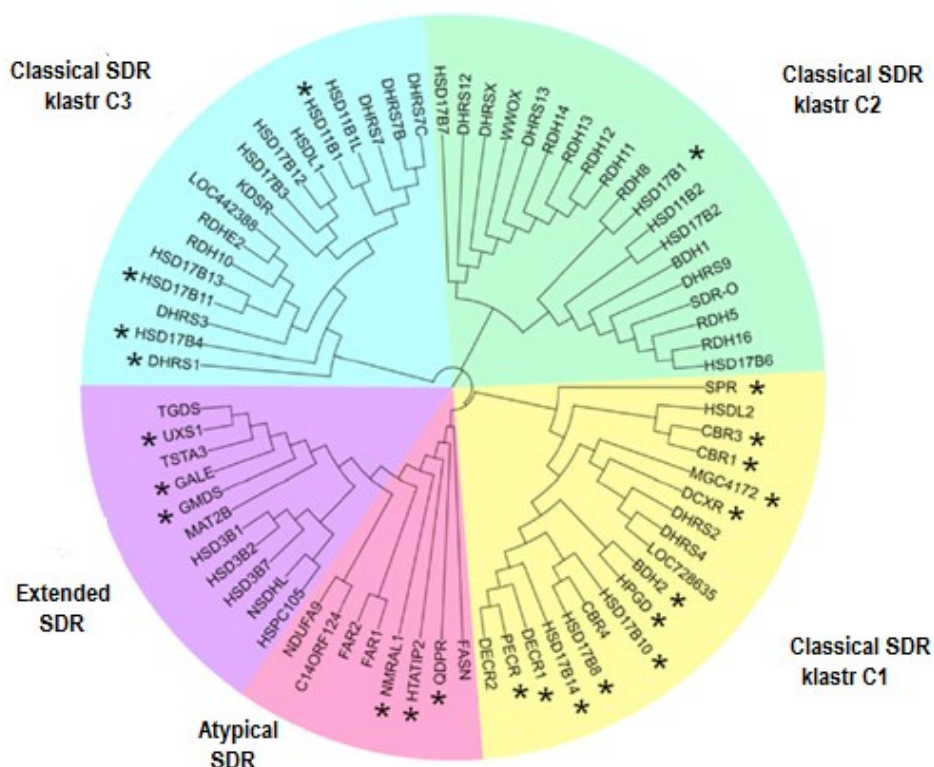
N-terminální konec řetězce je strukturně konzervativní a váže NAD(H) nebo NADP(H) jako kofaktor, zatímco C-terminální konec řetězce je strukturně variabilní a je důležitý pro rozpoznání a vazbu substrátu. Díky vysoké variabilitě C-terminálního

konce SDR enzymy disponují širokou substrátovou specifitou, která zahrnuje: alkoholy, sacharidy, lipidy, steroidy, retinoidy, polyoly nebo xenobiotika (Bray et al. 2009, Štambergová et al. 2014).

SDR enzymy jsou charakteristické nízkou párovou sekvenční identitou okolo 15 - 30 %. I přesto existuje několik konzervativních sekvenčních motivů, které jsou zachovány u většiny členů: region bohatý na glycin (ThrGlyxxxGlyxGly) a katalytickou tetradu složenou ze zbytků Tyr, Lys, Ser a Asn (Bhatia et al. 2015, Bray et al. 2009).

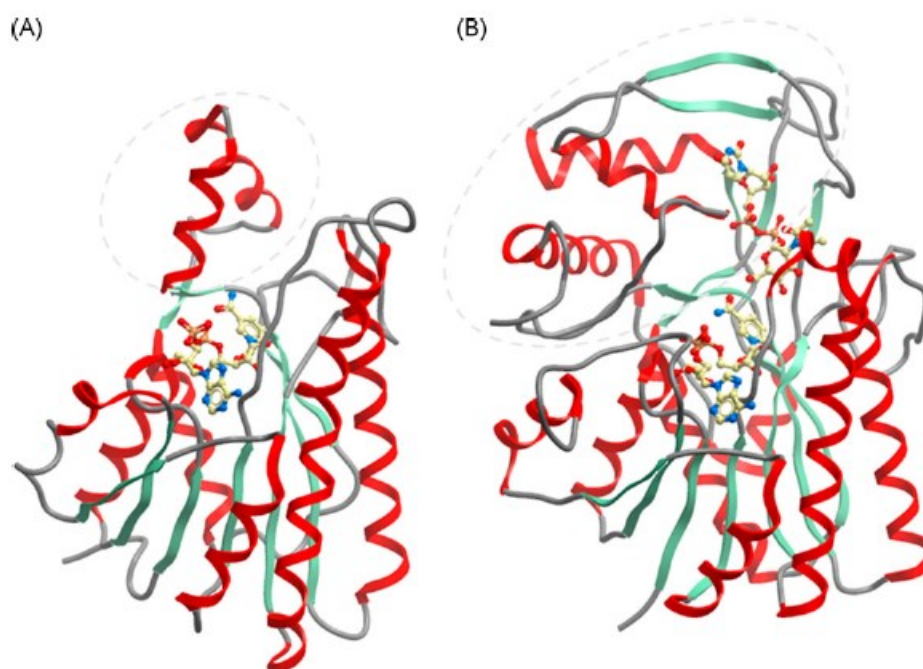
2.1.2 Lidské SDR enzymy

V lidském genomu bylo objeveno přes 80 lidských členů, které byly rozděleny do 48 SDR rodin (Beck et al. 2017). Na základě analýzy sekvenčních motivů jsou lidské SDR rozděleny do minimálně 5 skupin, přičemž pro každou skupinu je specifická sekvence v místě vazby koenzymu a/nebo aktivního místa. První 3 skupiny označujeme jako „classical“ klastr C1, C2, C3, dále „extended“ a „atypical“ skupinu (Obr. 2) (Bhatia et al. 2015, Persson et al. 2009).



Obrázek 2: Schéma skupin SDR nadrodiny: „classical“ klastr C1, C2, C3, „extended“ a „atypical“ skupina. Každý člen je popsán pomocí genového symbolu z databáze HCNG a hvězdička označuje přítomnost jedné nebo více struktur v PDB databázi. Úsečky ilustrují příbuznost enzymů (upraveno z Bray et al. 2009).

Klastr C1 zahrnuje především cytosolické enzymy, které zapojeny do metabolismu sloučenin spojených s koenzymem A, prostaglandiny a molekulami chinonového typu. Klastr C2 a C3 obsahuje převážně membránově vázané enzymy metabolizující retinoidy a steroidy. Obecně pro „classical“ skupinu jsou typická relativně malá α -helikální vazebná místa vázající substrát, která jsou umístěná mezi 6-7 β řetězcem. Zatímco „extended“ enzymy mají tyto vazebná místa významně větší a jsou tvořena 2 paralelními β řetězci s 3 α -helixy (Obr. 3). Enzymy, které mají významnou sekvenční diverzitu anebo neobvyklé strukturální rysy, jsou řazeny do poslední „atypical“ skupiny (Bray et al. 2009).



Obrázek 3: A - Struktura 3-hydroxybutyrátdehydrogenázy typ 2 s „classical“ SDR záhybem, B - Sktruktura UDP-galaktóza-4-epimerázy s „extended“ SDR záhybem. Kruhy zvýrazňují oblasti vazebných míst vázajících substrát, které vykazují výraznou odlišnost mezi oběma typy SDR enzymů (upraveno z Bray et al. 2009).

Každý SDR enzym má v názvu uvedené číslo své rodiny a za ním následuje písmeno, které označuje SDR typ, např. SDR19C1 označuje dehydrogenázu/reduktázu s krátkým řetězcem rodiny 19 patřící do „classical“ skupiny klastr C1 (Persson et al. 2009).

2.1.3 Význam lidských SDR enzymů

Lidské SDR enzymy jsou zapojeny do různých metabolických funkcí v organismu. Některé z nich se účastní redukce karbonylové skupiny aldehydů a ketonů na hydroxyderiváty a proto je označujeme jako reduktázy karbonylových sloučenin. Mezi nejvíce prozkoumané členy reduktáz karbonylových sloučenin patří cytosolická karbonylreduktáza 1, která je zapojena do metabolismu jak endogenních substrátů jako je např. vitamín K nebo prostaglandiny, tak xenobiotik jakou jsou např. léčiva: antipsychotikum haloperidol nebo cytostatikum daunorubicin a jiné (Boušová et al. 2015, Oppermann 2009, Škarydová a Wsól 2012). Další významnou skupinou jsou 17 β -hydroxysteroiddehydrogenázy, které jsou zapojeny do oxidačních (17-hydroxy) a redukčních (17 β -keto) přeměn skupiny androgenů a estrogenů (Štambergová 2013). Zástupci 17 β -hydroxysteroiddehydrogenáz jsou mimo jiné spojováni i se vznikem multifaktoriálních onemocnění jako je např. rakovina prostaty, rakovina prsu, osteoporóza nebo Alzheimerova nemoc (Štambergová 2013, Škarydová a Wsól 2012). Významnou roli lidských SDR hrají také retinoldehydrogenázy, které katalyzují oxidaci a redukci retinoidů a tím přispívají k biochemické podstatě procesu vidění (Štambergová 2013). Nemálo významnou skupinou jsou 11 β -hydroxysteroiddehydrogenázy, s nejznámějšími zástupci 11 β -hydroxysteroiddehydrogenáza typ 1 (reduktáza) a 11 β -hydroxysteroiddehydrogenáza typ 2 (oxidáza), které hrají významnou roli v přeměně 11 β -hydroxy skupiny a 11-keto skupiny glukokortikoidních hormonů. Mikrosomální 11 β -hydroxysteroiddehydrogenáza typ 1 je také zapojen do biotransformace xenobiotik, mezi něž patří např. 4-nitrobenzaldehyd nebo léčivo metyrapon a také je asociován se vznikem onemocnění, které souvisejí s regulací glukokortikoidních hormonů jako je diabetes II. typu, obezita, metabolický syndrom nebo srdeční selhání (Štambergová 2013, Škarydová a Wsól 2012).

I když úroveň poznání některých členů SDR nadrodiny je velmi vysoká, stále u přibližně poloviny enzymů nebylo doposud objasněno, jakou hrají roli v lidském organismu (Beck et al. 2017). Mezi málo prozkoumané členy SDR nadrodiny řadíme i dehydrogenázu/reduktázu rodiny SDR člen 7 (DHRS7), u které byla podle nedávné studie prokázána schopnost redukovat sloučeniny obsahující karbonylové skupiny (Štambergová et al. 2016). Funkce toho enzymu v lidském organismu nebyla zatím objasněna, ale byla publikována studie týkající se sníženého množství enzymu DHRS7 v rakovinných buňkách prostaty oproti normálním buňkám prostaty, a to by mohlo

naznačovat možnou roli toho enzymu při onemocnění rakovinou prostaty (Seibert et al. 2015). Enzym DHRS7C je evolučně příbuzný s dehydrogenázou/reduktázou rodiny SDR člen 7B (DHRS7B) a člen 7C (DHRS7C).

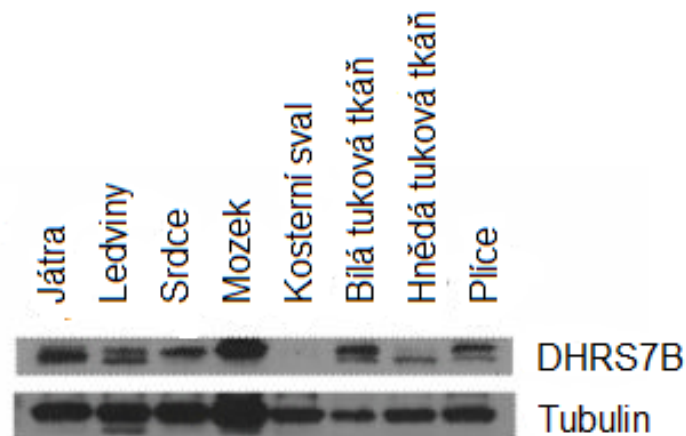
2.1.4 DHRS7B enzym

DHRS7B enzym, nazývaný též jako dehydrogenáza/reduktáza s krátkým řetězcem rodiny 32C člen 1 (SDR32C1) je reduktáza, kterou řadíme do „classical“ skupiny SDR enzymů klastr C3 (Bray et al. 2009, Internet 2).

Gen pro lidský enzym DHRS7B se nachází na chromozomu 17 a skládá se z 325 aminokyselin. Molekulová hmotnost odpovídá 35 kDa. Významným paralogem toho genu je enzym DHRS7C (Internet 2, Internet 3).

2.1.4.1 Lokalizace DHRS7B

Na základě studie prováděné u myši v roce 2009 bylo zjištěno, že se enzym DHRS7B nachází na membráně endoplazmatického retikula (Keller et al. 2009). Exprese myšího enzymu DHRS7B byla prozatím detekována v játrech, ledvinách, srdci, mozku, plicích, hnědé tukové tkáni a bílé tukové tkáni. V kosterním svalu byla exprese velice nízká (Obr. 4).



Obrázek 4: Western blot analýza exprese enzymu DHRS7B v myších tkáních (upraveno z Lodhi et al. 2012).

Celková exprese v hnědé tukové tkáni byla o poznání nižší v porovnání s bílou tukovou tkání, a to by mohlo naznačovat jinou roli enzymu DHRS7B v těchto tkáních (Lodhi et al. 2012). Exprese a lokalizace lidského enzymu DHRS7B nebyla zatím prozkoumána.

2.1.4.2 Funkce DHRS7B v organismu

Funkce lidského enzymu DHRS7B nebyla zatím blíže specifikována. Objevila se prvotní studie, která předpokládá určitou funkci DHRS7B ve spojení s metabolismem lipidů u myši. V této studii byl enzym DHRS7B identifikován jako redukční enzym, který se účastní terminální části syntézy éterových lipidů. Tato metabolická dráha probíhá na membráně peroxisomů, kde byl enzym DHRS7B nalezen. Předpokládá se, že éterové lipidy mohou být zapojeny do aktivace genů pro transkripční regulátory, které se podílejí na syntéze lipidů. Tato hypotéza byla zkoumána u vzorku myši, kterým byla snížena exprese enzymu DHRS7B. Snížená exprese tohoto enzymu vyvolala nízkou expresi genů pro transkripčních faktory a to mělo za následek snížení hladiny těchto lipidů. Tyto nálezy naznačují, že by inhibice DHRS7B nebo enzymů souvisejících se syntézou lipidů, mohly léčit obezitu a s tím související diabetes (Lodhi et al. 2012).

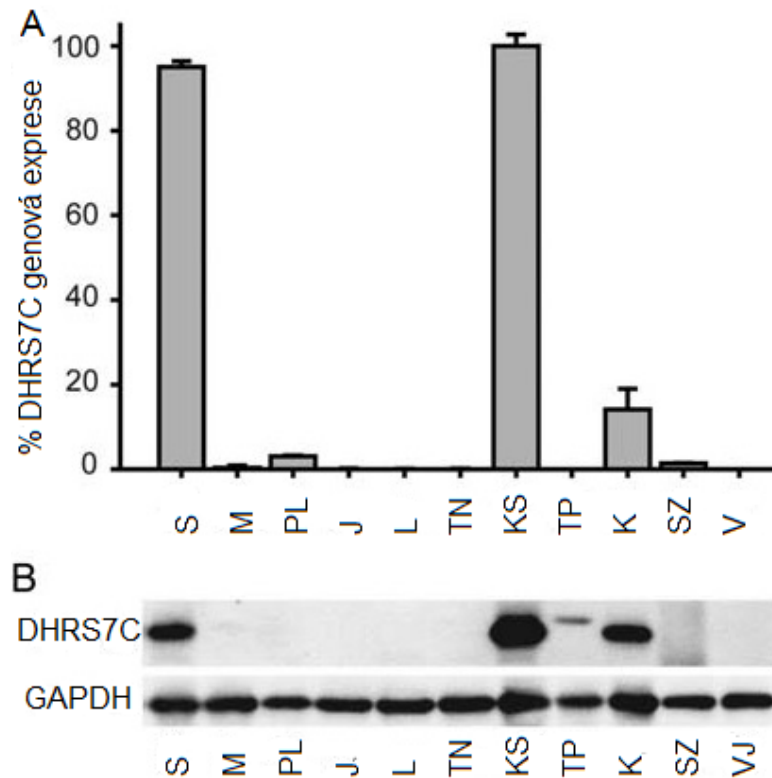
2.1.5 DHRS7C enzym

DHRS7C enzym, nazývaný též jako dehydrogenáza/reduktáza s krátkým řetězcem rodiny 32C člen 2 (SDR32C2) je dehydrogenáza, kterou řadíme do „classical“ skupiny SDR enzymů klastr C3 (Bray et al. 2009, Internet 4).

Gen pro lidský enzym DHRS7C je lokalizován na chromozomu 17 a kóduje dvě izoformy. Izoforma 1 se skládá z 312 aminokyselin a izoforma 2 je dlouhá 311 aminokyselin. Molekulová hmotnost obou izoform je přibližně stejná a odpovídá 35 kDa (Internet 4, Internet 5).

2.1.5.1 Lokalizace DHR57C

Vysoká exprese enzymu byla doposud prokázána ve vzorcích kosterního a srdečního svalu (Arai et al. 2017, Lu et al. 2012, Treves et al. 2012) a o něco nižší exprese byla objevena ve vzorcích kůže (Obr. 5) (Lu et al. 2012).



Obrázek 5: Expresa DHR57C: A - sloupcový diagram znázorňující relativní expresi mRNA v různých myších tkáních, vztaheno k expresi GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza) B - Western blotting analýza exprese enzymu DHR57C v různých myších tkáních. S - srdce, M - mozek, PL - plíce, J - játra, L - ledviny, TN - tenké střevo, KS - kosterní sval, TP - tuk podkožní, K - kůže, SZ - slezina, V - varlata, VJ - vaječníky (upraveno z Lu et al. 2012).

Subcelulární lokalizace tohoto enzymu byla zaznamenána na membráně endoplazmatického/sarkoplasmatického retikula u buněk kosterního a srdečního svalu. Všechny tři uvedené studie byly provedeny na tkáních a orgánech získaných z myší (Arai et al. 2017, Lu et al. 2012, Treves et al. 2012). Expresa lidského DHR57C enzymu byla zatím zaznamenána pouze v srdci (Lu et al. 2012).

2.1.5.2 Funkce DHRS7C v organismu

Role lidského DHRS7C je prozatím nejasná. Objevují se prvotní informace o možné funkci toho enzymu u myši, které souvisejí s vysokou expresí toho enzymu v kosterním svalu. Enzym DHRS7C katalyzuje přeměnu all-trans-retinolu na retinaldehyd za současné redukce kofaktoru NAD^+ na NADH a tím by mohl být zapojen do signální dráhy kyseliny retinové. Kyselina retinová se účastní různých fyziologických funkcí ale je mimo jiné také zapojena do metabolismu kosterního svalu (Treves et al. 2012). Spojení DHRS7C a jeho účasti v metabolismu kosterního svalu podporují také výsledky dvou studií, které zkoumají vliv změny exprese DHRS7C na homeostáze Ca^{2+} iontů. Tyto ionty jsou zapojeny do kontrakce a relaxace kosterních svalů (Arai et al 2017, Treves et al. 2012). U zkoumaných buněk byla snížena exprese tohoto enzymu, která zapříčinila vysoké uvolňování Ca^{2+} iontů do cytosolu a endoplazmatického/sarkoplasmatického retikula. Uvolňování velkého množství Ca^{2+} iontů může způsobit změny v buněčné morfologii (Arai et al. 2017).

2.1.5.3 Spojení DHRS7C s onemocněním

Uvažuje se o určité roli DHRS7C při rozvoji srdečního selhání, které je společnou drahou většiny kardiovaskulárních onemocnění. V uvedené studii byly zkoumány kultivované krysí kardiomyocyty aktivované pomocí adrenergního stimulu fenylefrinu (α -adrenergní) a isoproterenolu (β -adrenergní). Gen, u kterého byla pro oba stimuly nejvíce snížena jeho exprese, byl identifikován jako enzym DHRS7C vázaný na membránu endo/sarkoplasmatického retikula. Snížená exprese tohoto genu byla prokázána i u vzorků biopsií získaných od pacientů trpících kardiomyopatií a ischemickou chorobou srdeční (Lu 2012).

2.2 Možnosti stanovení exprese na úrovni mRNA

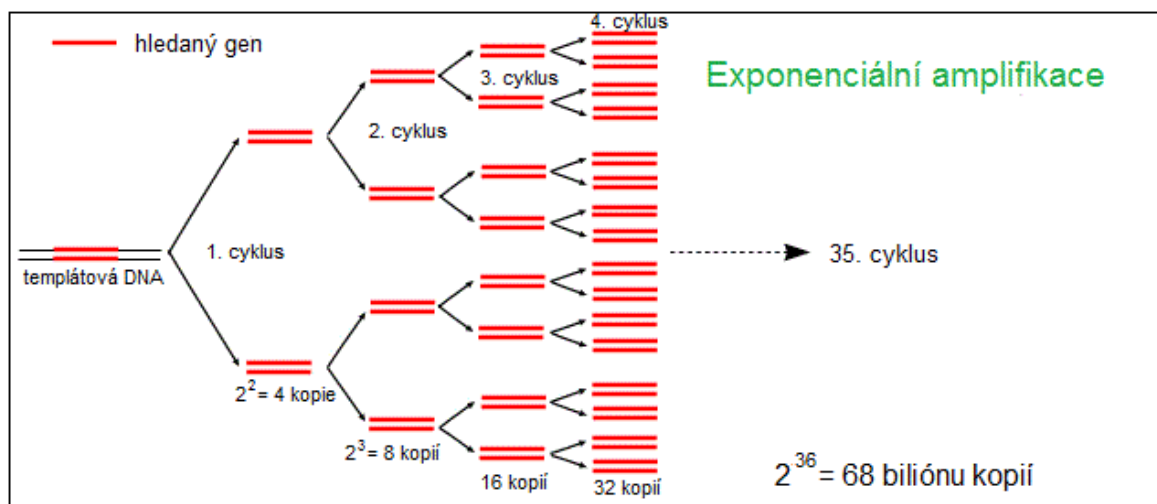
Struktura a tím i funkce všech proteinů je zapsaná do genů, tj. úseky DNA (deoxyribonukleové kyseliny). Geny se exprimují přepisem genetické informace z primární struktury DNA do mRNA (mesengerová ribonukleová kyselina) a tento přepis se nazývá transkripce (Alberts a kol. 2008). K přepisu genů dochází v závislosti na typu, diferenciaci a stáří buňky, podle fáze buněčného cyklu a mimo jiné podle vnějšího prostředí (Beránek 2016). Celý proces je ukončen překladem (translací) mRNA do struktury proteinů (Alberts a kol. 2008).

Expresi mRNA můžeme stanovit několika technikami: autoradiografie *in situ*, hybridizačními metodami (Northern blotting, fluorescenční hybridizace *in situ*, ribonuclease protection assay), čipovou technologií (DNA mikročipy, oligonukleotidové mikročipy), RT-PCR a RT-qPCR (Dvořák et al. 2003, Němcová 2012).

Pro studium exprese mRNA v různých tkáních se nejvíce používá technika RT-qPCR, která spojuje přepis RNA získané ze vzorku do komplementární DNA (cDNA) metodou reverzní transkripce (RT) pomocí reverzní transkriptázy a kvantifikaci vzniklé cDNA pomocí kvantitativní PCR v reálném čase, tzv. qPCR (Šimůnek 2015/16). Tato technika disponuje především vysokou citlivostí a specifičností, jednoduchostí a rychlostí, ale zároveň je tato metoda vysoce citlivá na jakýkoliv druh kontaminace a přítomnost inhibitorů (Němcová 2012, Dvořák et al. 2003).

2.2.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z anglického polymerase chain reaction) je metoda molekulární biologie, která dokáže amplifikovat i velice malé množství DNA v *in vitro* podmínkách. Základní princip je velice jednoduchý: z každé jedné molekuly DNA vzniknou dvě molekuly produktu (Obr. 6). K tomuto zdvojování molekul dochází za pomoci DNA polymerázy. Polymeráza vyžaduje ke své práci nukleotidy, stavební kameny DNA. Nukleotidy se skládají ze 4 bází: adenin (A), thymin (T), cytosin (C) a guanin (G). Další nezbytnou součástí reakce jsou krátké úseky DNA, které ohraničují amplifikovaný úsek, a jsou označovány jako primery (Šmarda et al. 2005, Joshi a Deshpande 2011).

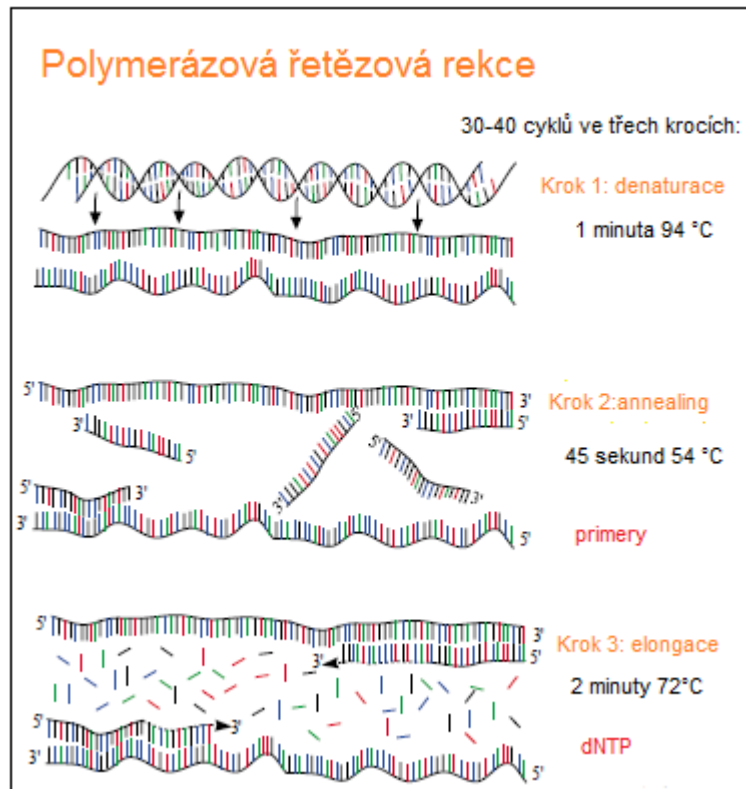


Obrázek 6: Základní princip PCR. V každém PCR cyklu dochází ke zdvojení molekuly DNA pomocí DNA polymerázy (upraveno z Internet 7).

2.2.1.1 Princip PCR

Molekula DNA je tvořena dvěma řetězci, z nichž jedno vlákno označujeme jako kódující řetězec (forward) a druhé jako nekódující řetězec (reverse). Při denaturaci se rozruší vazby mezi těmito dvěma řetězci a obě vlákna se stanou templátem pro vznik nového řetězce. Syntéza se zahajuje nasednutím specifických primerů, které jsou komplementární s jedním z řetězců templátové DNA. Od přisedlých primerů se syntetizuje nový komplementární řetězec na základě katalytické aktivity DNA polymerázy ve směru 5' - 3' (Obr. 7).

Amplifikace řetězce probíhá ve třech cyklicky se opakujících teplotních krocích: denaturace, annealing a extenze, přičemž pro dostatečnou amplifikaci DNA postačuje obvykle 30-40 opakujících se cyklů (Beránek 2016, Šmarda et al. 2005).



Obrázek 7: Syntéza nového řetězce probíhá ve třech teplotních krocích. Nejdříve dochází k denaturaci DNA při teplotě 94 °C, následuje annealing primerů na specifické úseky DNA při teplotě 54 °C a celý proces je ukončen syntézou nového komplementárního řetězce ve směru 5' - 3' při teplotě 72 °C (upraveno z Internet 7).

I. Denaturace

V prvním kroku PCR reakce dochází k denaturaci (rozrušení) vodíkových můstků v dvouřetězcové molekule DNA při teplotě 94 - 98 °C a to dává vzniku dvěma jednovláknovým molekulám templátu (Bustin 2009, Šmarda et al. 2005). V případě dlouhých úseků DNA (jako je genomová DNA) trvá úvodní denaturace delší dobu (3 - 5 minut) z důvodu plného rozvinutí celého úseku DNA. V dalších cyklech se amplifikuje už jen kratší úsek a tím se doba denaturace zkracuje na 30 - 60 sekund (Internet 6, Šmarda et al. 2005).

II. Annealing

Dalším krokem je navázání specifických primerů na jednovláknové řetězce templátu při teplotě 50 - 65 °C. Teplotní optimum annealingu se odvíjí od délky primerů a množství GC párů v řetězci a proto oba primery musí disponovat podobnými

parametry. Příliš vysoká teplota annealingu by mohla způsobit nespecifické nasednutí primerů, zatímco nízká teplota by zapříčinila nízkou výtěžnost reakce (Bustin 2009, Šmarda et al. 2005).

III. Extenze

Teplotní optimum extenze závisí na použitém druhu DNA polymerázy. Nejběžněji používaná *Taq* polymeráza je optimálně aktivní při teplotě okolo 70 °C. Při extenzi dochází k vlastnímu nárůstu nového řetězce ve směru od 5' konce ke 3' konci (Bustin 2009, Šmarda et al. 2005).

2.2.1.2 Složky reakční směsi

Pro standartní provedení PCR reakce se připravuje 10-100 µl reakční směsi, kterou označujeme jako Master mix. Jednotlivé složky Master mixu se přidávají do reakce v takové koncentraci, aby výtěžek reakce byl vysoký a zároveň specifický (Beránek 2016, Šmarda et al. 2005).

Master mix se skládá z těchto komponent:

Templátová DNA

Templátová DNA se získává z různých zdrojů a obsahuje úsek, který má být namnožen. Množství přidaného templátu by mělo být v rozmezí 1-500 ng, přičemž příliš vysoká koncentrace DNA může způsobit nespecifický annealing. Úspěšnost reakce závisí také na čistotě a integritě izolované DNA (Beránek 2016, Šimůnek 2015/2016).

Primery

Koncentrace primerů je pro průběh reakce velice zásadní a měla by odpovídat 0,1-1 µmol/l. Příliš vysoká koncentrace by způsobila chybný annealing anebo párování primerů tzv. dimerizaci. Zatímco příliš nízká koncentrace primerů by zapříčinila nedostatečnou tvorbu produktu. Dalšími nezbytnými vlastnostmi primerů jsou: délka oligonukleotidového řetězce v rozmezí 16-25 nukleotidů, obsah GC párů 50-60 %, podobná teplota tání (mohou se lišit o méně než 5 °C), dále by primery nesměly být vzájemně komplementární zejména na svém 3' konci a neměly by vytvářet sekundární

struktury, které by mohly znesnadnit annealing (Beránek 2016, Bustin 2009, Šimůnek 2015/2016).

Deoxynukleotidy (dNTPs)

Deoxynukleotidy: deoxyadenozintrifosfát (dATP), deoxytymidintrifosfát (dTTP), deoxyguanozintrifosfát (dGTP), deoxycytozintrifosfát (dCTP) jsou stavební kameny nového řetězce DNA. Přidávají se do reakce v ekvimolárním poměru o celkové koncentraci 200-250 $\mu\text{mol/l}$. Koncentrace dNTPs musí být v reakce optimální, protože vyšší koncentrace snižují přesnost DNA polymerázy a tím i výtěžek reakce (Beránek 2016, Bustin 2009, Šimůnek 2015/2016).

Hořčnaté kationty

Hořčnaté kationty tvoří komplexy s dNTPs, stabilizují primery a jsou důležité pro přesnost a procesivitu DNA polymerázy. Koncentrace hořčnatých iontů, nejběžněji ve formě MgCl_2 , úzce souvisí s koncentrací dNTPs a měla by se pohybovat mezi 1-5 mmol/l (při koncentraci dNTPs 200 $\mu\text{mol/l}$). Při vyšších koncentracích hořčnatých iontů by se mohla snížit specifická reakce (Beránek 2016, Bustin 2009, Šimůnek 2015/2016).

Reakční pufr

Reakční pufr je dodáván jako 10x koncentrovaný a obvykle obsahuje 500 mM chlorid draselný, 10 mM TRIS-HCl. Optimální pH reakčního pufru je mezi 8-9 (Beránek 2016, Šimůnek 2015/2016).

DNA polymeráza

DNA polymeráza katalyzuje vznik fosfodiesterových vazeb mezi deoxynukleotidy. Nejběžněji se používají termostabilní polymerázy, které jsou stabilní při všech třech teplotních krocích PCR reakce. Nejvíce používaným zástupcem termostabilních polymeráz je *Taq* polymeráza získaná z bakterie *Thermus aquaticus*, která je stabilní až do teploty 98 $^{\circ}\text{C}$. Dalšími zástupci jsou *Pwo* polymeráza (*Pyrococcus woesei*) *Pfu* polymeráza (*Pyrococcus furiosus*) a *Tth* polymeráza (*Thermus thermophilus*). Koncentrace polymeráz by se měla pohybovat mezi 0,1-1 U na 25 μl Master mixu (Beránek 2016, Bustin 2009, Šimůnek 2015/2016).

Všechny složky PCR reakce se pro každou assay individuálně optimalizují a to zejména koncentrace hořčičných kationtů. Důležitá je také optimální teplota annealingu (Šimůnek 2015/2016).

2.2.1.3 Detekce PCR produktů

Konečným produktem PCR reakce jsou krátké úseky DNA o definované délce, tzv. amplikony. Detekce amplikonů probíhá pomocí elektroforetických a chromatografických metod, sekvenčních a hybridizačních technik anebo pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (Beránek 2016, Šmarda et al. 2005).

2.2.2 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

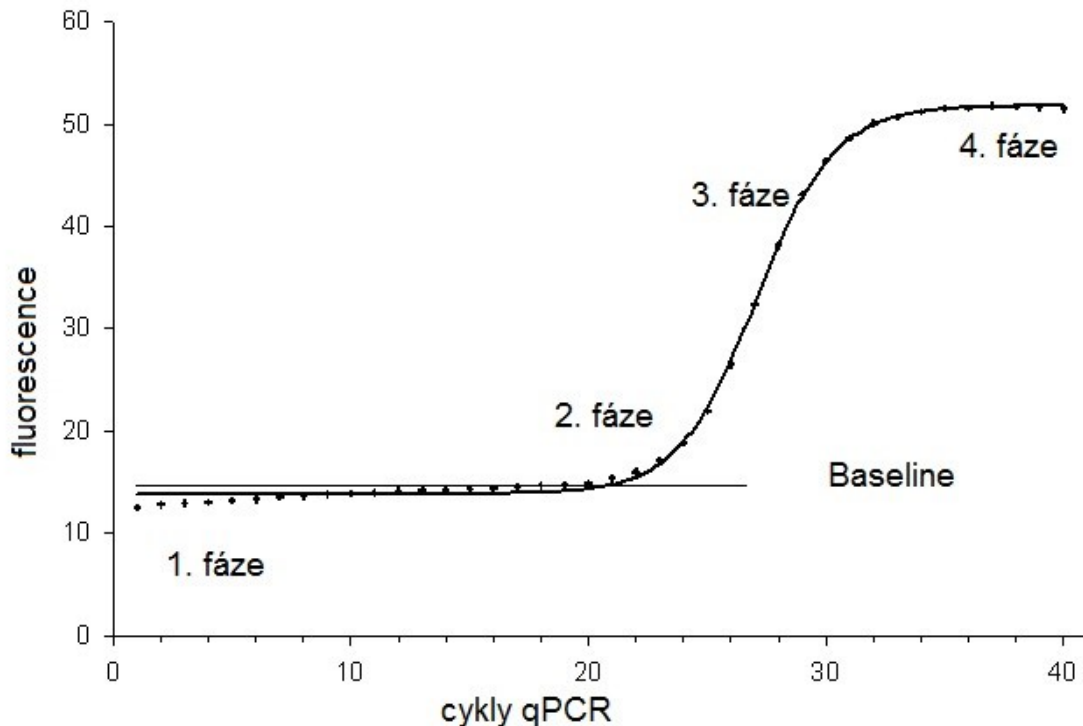
Při klasické PCR metodě dochází k detekci amplikonů až po skončení celého procesu a tuto metody označujeme jako tzv. End-point PCR. V současné době se využívá novější způsob detekce amplikonů, který změří nárůst fluorescence od prvního cyklu reakce v reálném čase, tzv. kvantitativní PCR v reálném čase (Šimůnek 2015/2016, Šmarda et al. 2005).

Reakční směs pro metodu qPCR obsahuje všechny složky jako klasická PCR, ale navíc je obohacena o fluorescenční barvivo, fluorescenční sondu nebo fluorescenčně značený primer. Fluorescenční barvivo má povahu interkalační látky, tedy látky, která se vmezeřuje mezi dva sousední nukleotidy molekuly DNA. Nejčastěji se používají barviva typu ethidiumbromid, SYBR Green, SYBR Gold nebo Amplifluor. Fluorescenční sondy, na rozdíl od fluorescenčních barviv, jsou specifické pro amplifikovanou oblast DNA (Beránek 2016, Šimůnek 2015/2016). Existují dva typy sond, a to sondy hydrolyzační (př. TaqMan) a sondy hybridizační (př. Molecular Beacons a Scorpions). Po navázání barviva nebo sondy na molekulu DNA, dochází k vlastní generaci fluorescenčního signálu, který je přímo úměrný množství templátu DNA (Beránek 2016, Nádvorník 2016).

V běžné praxi se nejběžněji používají fluorescenční barviva typu SYBR Green, která disponují hned dvěma pozitivy: relativně malá pořizovací cena (oproti specifickým sondám) a možnost navázání barviva na jakýkoliv DNA templát (Bustin 2009, Internet 8).

2.2.2.1 Kinetika qPCR reakce

Fluorescenční křivka signálu PCR reakce má esovitý charakter (Beránek 2016) a tuto křivku lze rozdělit do 4 fází (Obr. 8):



Obrázek 8: 4 fáze PCR reakce (upraveno z Pfaffl a Hageleit 2001).

I. Baseline

Jako baseline označujeme fázi, kdy sice dochází k exponenciálnímu nárůstu PCR produktů, ale množství fluorescence (kopií DNA) je pod mezí detekce přístroje.

II. exponenciální fáze

Ve druhé fázi PCR reakce je nárůst amplifikační křivky exponenciální, a pokud se efektivita reakce blíží ke 100 %, tak množství kopií DNA přibývá teoreticky dle 2^n , kde n je číslo amplifikačního cyklu. V této fázi se vyhodnocuje množství DNA templátu.

III. lineární fáze

Lineární fáze je charakteristická strmým nárůstem fluorescence, kde nové PCR produkty vznikají teoreticky dle $2n+1$, kde n je číslo amplifikačního cyklu. Tato fáze

není vhodná k vyhodnocení amplifikačních křivek, protože množství dodaných reagensů začíná klesat a PCR produkty začínají degradovat.

IV. plató fáze

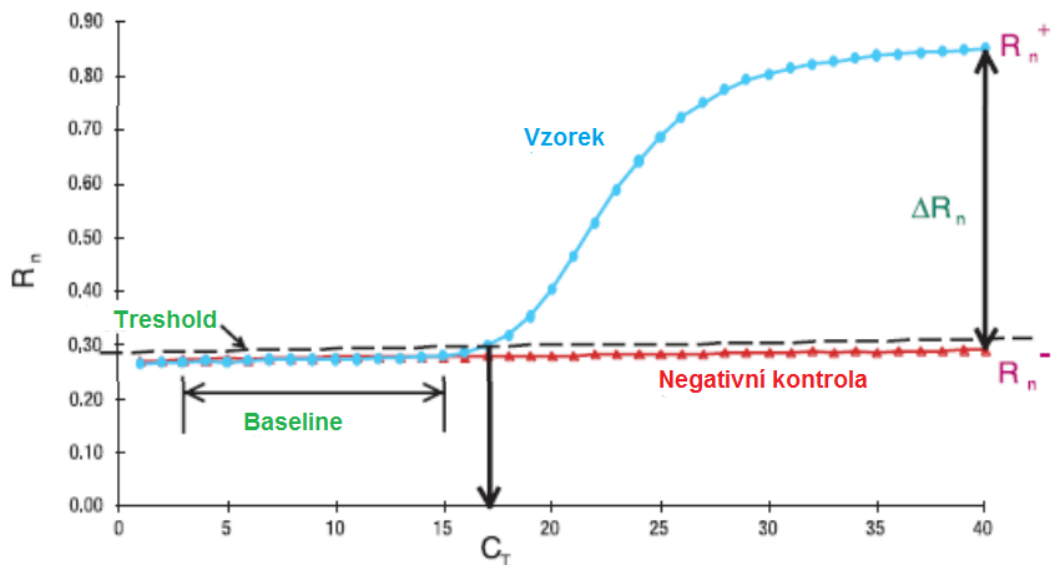
Poslední fáze amplifikační křivky vykazuje stagnující průběh, protože dochází k útlumu exponenciálního nárůstu produktů kvůli vyčerpání reakčních složek a degradaci PCR produktů (Internet 8, Pfaffl a Hageleit 2001, Šmehilová 2011).

2.2.2.2 Kvantitativní analýza pomocí qPCR

Množství molekul DNA se kvantifikuje pomocí dvou metod: absolutní kvantifikací nebo relativní kvantifikací. Při absolutní kvantifikaci se množství templátu DNA vyhodnocuje na základě kalibrační přímky, která je sestavena ze standardů o známé koncentraci (Beránek 2016, Pfaffl a Hageleit 2001). Jako standardy se používají rekombinantní plazmidy DNA, *in vitro* transkribovaná rekombinantní RNA, genomická DNA, RT-PCR produkty nebo oligonukleotidy (Pfaffla a Hageleit 2001). Zatímco relativní kvantifikace je založena na porovnání hladiny exprese cílového genu a tzv. referenčního genu, který disponuje konstantní hladinou transkriptů DNA ve všech buňkách bez ohledu na změny podmínek (Beránek 2016, Pfaffl a Hageleit 2001). Jako referenční geny se nejčastěji používají 18S RNA, glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza, β -aktin, cyklofilin, fosfoglycerátkináza, β 2-mikroglobulin, β -glukoronidáza, hypoxantinquaninfosforibosyltransferáza (Beránek 2016).

2.2.2.3 Vyhodnocení amplifikačních křivek

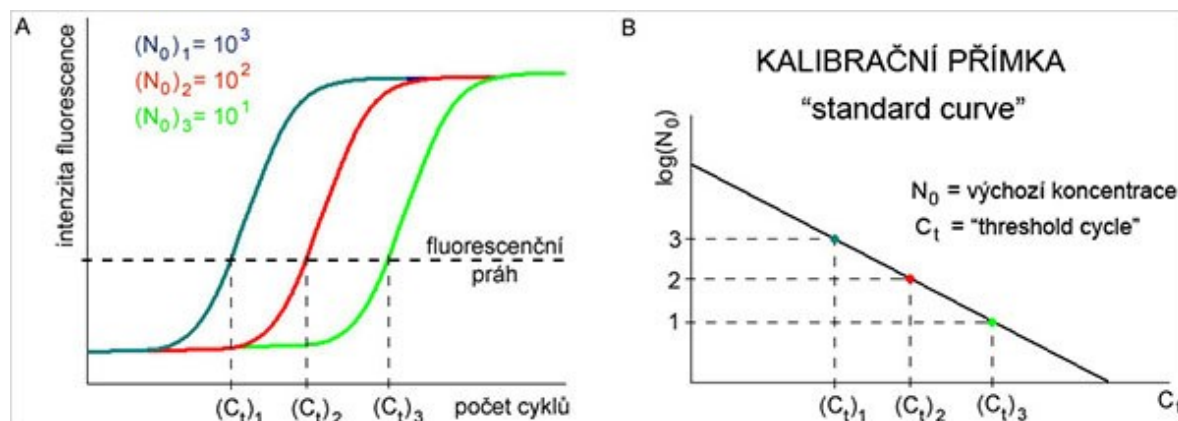
Samotné vyhodnocení amplifikačních křivek probíhá v exponenciální fázi reakce, kdy fluorescenční signál překoná hodnotu prahu detekce (tzv. treshold) a tuto hodnotu označujeme jako cyklus prahu (Ct z angl. cycle of treshold), Obr. 9.



Obrázek 9: Amplifikační křivka qPCR reakce, kde C_t je cyklus prahu, R_n je poměr fluorescenční intenzity signálního barviva a pasivního barviva, R_n^- je hodnota negativní kontroly, R_n^+ je hodnota vzorku s templátem, ΔR_n je normalizace hodnoty R_n pomocí odečtu základní linie nebo-li rozdíl R_n^- a R_n^+ (upraveno z Šmečilová 2011).

Čím větší je množství přítomného DNA templátu, tím je C_t hodnota nižší (Beránek 2016, Nádvorník 2016).

U absolutní kvantifikace je množství templátu vypočítáno na základě kalibrační křivky, která je sestavena z hodnot C_t vůči logaritmu počtu kopií v jednotlivých standardech, Obr. 10 (Bustin 2009).



Obrázek 10: A - amplifikační křivka znázorňující C_t jednotlivých standardů o výchozích koncentracích, B - křivka převedena do logaritmického měřítka (převzato z Internet 9).

Relativní kvantifikace využívá pro stanovení množství templátu komparativní Ct metodu ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), kdy se předpokládá, že se efektivita rovná 100 %. Vzorec pro výpočet $\Delta\Delta Ct$ metody (Nádvořník 2016):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ vzorek} - \Delta Ct \text{ kontrola}$$

$$\Delta Ct = Ct \text{ cílový gen} - Ct \text{ gen referenční.}$$

2.2.2.4 Efektivita qPCR reakce

Vyhodnocení efektivity (účinnosti) qPCR reakce je nezbytným krokem k určení správné hladiny exprese určitého genu (Pfaffl a Hageleit 2001). V ideálním případě by se měla účinnost blížit ke 100 %, ale existuje spousta faktorů ovlivňující efektivitu reakce, jako je: přítomnost inhibitorů/enhancerů, složení reakce, délka ampliconů, vlastnosti primerů, sekundární struktury a v neposlední řadě efektivní annealing. V běžné praxi by se měla efektivita reakce pohybovat mezi 90-110 %, přičemž se snižující účinností reakce výrazně klesá množství PCR produktů (Tab. 1).

Tabulka 1: Účinnost qPCR reakce znázorňující vztah efektivity (E) na množství vniklých kopií DNA (upraveno z Nádvořník 2016).

Cyklus	E = 100%	E = 90%	E = 80%	E = 70%
0	1	1	1	1
1	2	1,9	1,8	1,7
2	4	3,6	3,2	2,9
3	8	6,9	5,8	4,9
4	16	13	10,5	8,4
5	32	24,8	18,9	14,2
6	64	47	34	24,1
7	128	89,4	61,2	41
8	256	169,8	110,2	69,8
9	512	322,7	198,4	118,6
10	1024	613,1	357	201,6
30	1073741824	230466617,9	45517159,6	8193465,7
	100%	21%	4%	0,80%

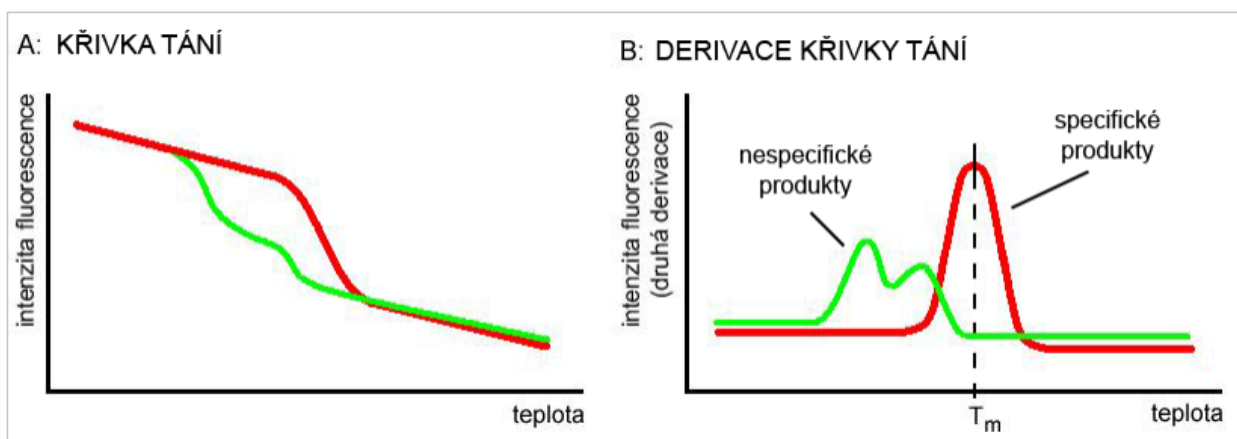
Efektivita qPCR reakce se vypočítává ze sklonu standardní křivky, která je vyjádřením vztahu Ct hodnot vůči logaritmu počtu kopií DNA. Vzorec pro výpočet efektivity reakce:

$$E = 10^{-1/\text{slope}} - 1 \text{ (x100)\%},$$

kde E je hodnota efektivity a slope je sklon standardní křivky. Pokud je sklon standardní křivky -3,32, tak se efektivita rovná 100% (Nádvořník 2016, Pfaffl a Hageleit 2001, Šmehilová 2011).

2.2.2.5 Detekce nescifických produktů

U fluorescenčních barviv typu SYBR Green může vzniknout riziko navázání těchto barviv na nescifické produkty PCR reakce nebo primer-dimer artefakty a tyto barviva mohou přispět k falešnému zvýšení množství DNA templátu. Nescifické produkty vznikají na podkladě nízké specifiity navržených primerů, kvůli špatně nastaveným reakčním podmínkám. Detekce nescifických produktů PCR reakce je založena na různé teplotě tání (T_m) těchto produktů a analyzuje se pomocí křivky tání, která porovnává závislost intenzity fluorescence ke klesající teplotě. Pro lepší odhad T_m se křivka tání pomocí softwaru derivuje a vzniklý vrchol píku se rovná T_m produktu (Obr. 11).



Obrázek 11: A - křivka tání, která ukazuje závislost fluorescence na teplotě, B - derivace křivky tání, kde vrchol píku se rovná T_m produktu (převzato z Šmehilová2011).

V případě tvorby pouze specifických produktů by křivka tání měla disponovat pouze jedním vrcholem. Detekce více než jednoho vrcholu dokazuje přítomnost

nespecifického produktu nebo jiného artefaktu (Internet 8, Nádvořník 2016, Pffafel a Hageleit 2001).

2.3 Možnosti stanovení exprese na úrovni proteinu

Stanovení exprese mRNA nám sice dává určitou představu o expresi genetické informace, ale není přímým projevem obsahu daného proteinu v buňce. V některých případech míra transkripce konkrétní mRNA zcela neodpovídá úrovni exprese vzniklého proteinu a to z mnoha důvodů jako jsou např. různé posttranslační modifikace, mRNA sestřih nebo různé regulační procesy v buňce. Dále je nutné si uvědomit, že všechna mRNA vzniklá v buňce není určena pro translaci do struktury proteinů (Internet 19, Graves a Timothy 2002).

Expresi na úrovni proteinu stanovujeme pomocí metod, které jsou založeny na principu detekce pomocí specifických protilátek (Western blotting, fluorescenční mikroskopie, ELISA a jiné) nebo pomocí hmotnostní spektrometrie (Šimůnek 2015/2016).

2.3.1 Gelová elektroforéza

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejběžnější instrumentální technice, která se používá k separaci, k purifikaci a izolaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti ve stejnosměrném elektrickém poli (Internet 10, Šmarda et al. 2005).

2.3.1.1 Separace proteinů

Proteiny se separují nejčastěji v jejich denaturované formě. Denaturace proteinů probíhá nejčastěji působením vysokých teplot s přidáním SDS. SDS je anionický detergent, který obalí molekuly proteinů a poskytne jim negativní náboj. Po vložení elektrického pole začnou proteiny migrovat různou rychlostí směrem ke kladně nabitým elektrodám v závislosti na molekulové hmotnosti (Internet 11).

Vlastní separace proteinů probíhá v polyakrylamidovém gelu (PAGE), který je vytvořen polymerací akrylamidu a bisakrylamidu s přidáním persíranu amonného (APS) a tetramethylendiaminu (TEMED). Velmi často se využívá kombinace dvou různých koncentrací polyakrylamidových gelů, kdy proteiny nejdříve migrují v tzv.

zaostřovacím gelu, který je mírně kyselý (pH 6,8) a má nižší koncentraci polyakrylamidu. Zaostřovací gel slouží k tomu, aby se proteiny koncentrovaly do tenké a ostře definované linie. Následně proteiny putují separačním gelem, který je bazický (pH 8,8) a obsahuje vyšší podíl polyakrylamidu. V separačním gelu dochází k vlastní separaci proteinů na základě molekulové hmotnosti a platí, že menší molekuly se pohybují rychleji (Internet 13, Mahmood a Yang 2012).

2.3.1.2 Hmotnostní markery

Pro odhad molekulové hmotnosti proteinů se využívají hmotnostní markery. Jedná se o směs proteinů se známou molekulovou hmotností, která se separuje spolu s testovanými vzorky (Internet 11).

2.3.1.3 Detekce proteinů po elektroforéze

Vizualizace proteinů může probíhat pomocí barvicích technik, kdy se používají barviva typu Comassie modř nebo uhličitan stříbrnoamonný (tzv. barvení stříbrem) a dále se využívají fluorescenční barviva typu SYBRO Ruby a Cy barviva (Cibíček a kol. 2014, Šimůnek 2015/2016). K detekci specifických proteinů ve směsi se používá technika Western blotting, která vizualizuje proteiny na základě navázání specifických protilátek (Internet 12).

2.3.2 Western blotting

Western blotting je typ hybridizační metody, která je prováděna na pevném nosiči, a to na nitrocelulóзовé nebo polyvinylfluoridové (PVDF) membráně (Beránek 2016, Mahmood a Yang 2012).

2.3.2.1 Transfer proteinů

První krok Western blottingu zahrnuje separaci proteinů na základě molekulové hmotnosti, nejčastěji pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Separované proteiny jsou dále přeneseny z gelu na membránu působením elektrického pole. Membrána je umístěna mezi povrchem gelu a kladnou elektrodou v tzv. sendviči, který je tvořen na každé straně porézní houbičkou a filtračními papíry z důvodu ochrany membrány i gelu. Pro

účinný transfer proteinů je důležité, aby membrána těsně přiléhala k povrchu gelu a byla orientovaná směrem ke kladné elektrodě. Po aplikaci elektrického pole negativně nabitě proteiny migrují z gelu na membránu. Tento typ přenosu se nazývá elektroforetický transfer a může probíhat v „semi-dry“ nebo „wet“ podmínkách (Mahmood a Yang 2012).

„Wet“ transfer

U „wet“ transferu se celý sendvič umístí do blotovací kazety, která je ponořena do blotovacího pufru mezi dvě elektrody a celý proces probíhá tzv. mokrou („wet“) cestou. Výhoda „wet“ transferu spočívá v tom, že nedochází tak často k vysušení gelu a tím je tento přenos více spolehlivý a účinný. Oproti „semi-dry“ transferu je tento typ přenosu více flexibilní ve vybírání blotovacího času, chladících podmínek a nastavení napětí. „wet“ transfer je vhodný pro přenos proteinů s větší molekulovou hmotností.

„Semi-dry“ transfer

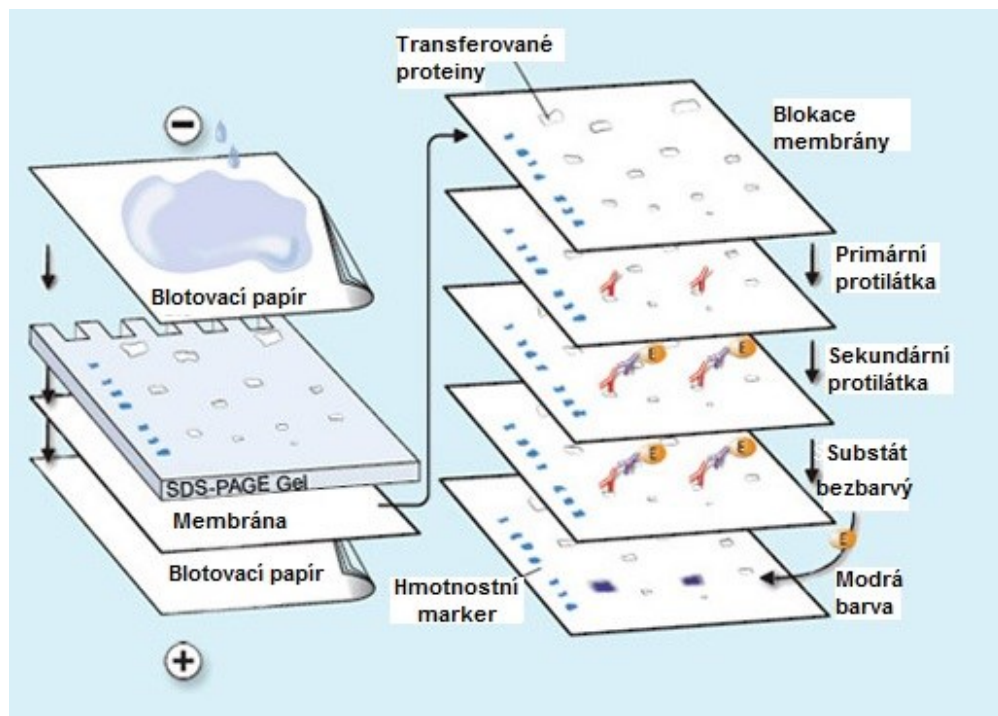
U „semi-dry“ transferu je membrána a gel obklopen z každé strany filtračním papírem napuštěným blotovacím pufrem a ten je v přímém kontaktu s deskovými elektrodami. Výhodou „semi-dry“ přenosu je rychlejší přenos, výrazně nižší množství blotovacího pufru a snadnější instalace. „Semi-dry“ metoda je vhodná pro rychlý přenos proteinů s nižší molekulovou hmotností (Internet 13).

2.3.2.2 Navázání protilátek

Po transferu jsou proteiny navázány na povrch membrány, a tím jsou zpřístupněna vazebná místa pro navázání specifické (primární) protilátky (Internet 14, Šimůnek 2015/2016). Před aplikací primární protilátky se provádí tzv. blokace membrány, kdy se zablokují neobsazená vazebná místa na povrchu membrány pomocí koncentrovaného roztoku BSA (hovězí sérový albumin) nebo netučného sušeného mléka (Mahmood a Yang 2012). Po blokaci membrány se primární protilátka naváže na příslušné antigeny. K vizualizaci reakce dochází pomocí značené sekundární protilátky, která se naváže na primární protilátku (Internet 14).

2.3.2.3 Detekce

Sekundární protilátka je značená pomocí enzymů, jako je např. alkalická fosfatáza nebo křenová peroxidáza. Po přidání bezbarvého substrátu, enzym katalyzuje barevnou reakci, která je detekována vizuálně (Internet 13, Internet 14). Schéma celého postupu Western blottingu je znázorněn na Obr. 12.



Obrázek 12: Schéma Western blottingu: V prvním kroku se proteiny přenesou z SDS-PAGE gelu na membránu působením elektrického pole. Následně se membrána zablokuje a aplikuje se primární protilátka, která se specificky naváže na své antigeny. V dalším kroku se přidává značená sekundární protilátka, která se naváže na primární protilátku. Po přidání substrátu dochází k barevné reakci, která je viditelná (Internet 15).

Jiný způsob detekce zahrnuje přidání chemiluminiscenčního substrátu, který generuje signál v místě navázání protilátky. Tento signál je zachycen na fotografický papír v temné komoře nebo pomocí CCD kamery. Oproti kolorimetrickému způsobu vyhodnocení, je chemiluminiscenční detekce vysoce specifickou a citlivou metodou (Internet 13, Mahmood a Yang 2012).

2.3.2.4 Kvantifikace proteinů

Western blot analýza se považuje za semi-kvantitativní metodu, protože poskytuje pouze relativní srovnání hladiny proteinů mezi vzorky. Absolutní kvantifikace není v tomto případě reálná, protože jsou určité rozdíly v rychlosti transferu jednotlivých vzorků mezi různými blottingy a generovaný signál není lineární v širším koncentračním rozmezí (Mahmood a Yang 2012).

2.3.3 Hmotnostní spektrometrie

Pro stanovení exprese proteinů v různých tkáních se může využít i technika hmotnostní spektrometrie, která identifikuje proteiny na základě jejich molekulové hmotnosti (Graves a Timothy 2002).

Proteiny se obvykle nejdříve separují pomocí gelové elektroforézy a pak se následně proteolyticky štěpí v gelu, tzv. in-gel-štěpení (Graves a Timothy 2002, Dvořáková et al. 2014). Rozštěpení proteinů na kratší peptidy probíhá pomocí proteolytických enzymů, jako je např. trypsin. Jinou možností je pracovat s intaktní proteiny bez nutnosti jejich štěpení na peptidy (Dvořáková et al. 2014). Vzorky jsou dále podrobeny ionizaci a to pomocí měkkých ionizačních technik: MALDI (ionizace laserovou desorpčí v přítomnosti matrice) nebo ESI (ionizace elektrosprejem). V obou případech jsou peptidy převedeny na ionty získáním nebo ztrátou jednoho nebo více iontů bez významné ztráty integrity vzorku. Tím lze získat přesnou informaci o molekulové hmotnosti peptidů a proteinů v jejich nativní formě (Graves a Timothy 2002). Posledním krokem je hmotnostní analýza vzniklých iontů, která porovnává poměr jejich hmotnosti k náboji (m/z). K dělení iontů na základě jejich poměru m/z dochází v hmotnostních analyzátoch, kdy pro identifikaci proteinů se nejvíce využívá analyzátor doby letu (TOF) ve spojení s MALDI. Výsledkem měření je hmotnostní spektrum, které je charakteristické pro každý protein. Hmotnostní spektrum naměřených iontů porovnává hodnoty naměřených m/z s teoretickými hodnotami m/z v dostupných databázích. Na základě shody naměřených a teoretických hodnot m/z , lze s určitou jistotou přiřadit spektrum k stanovovanému proteinu (Dvořáková et al. 2014).

Pomocí hmotnostní spektrometrie se dají nejen identifikovat proteiny, ale tato metoda je vhodná také ke kvantifikaci genové exprese (absolutní i relativní). Při absolutní kvantifikaci se používají standardy o známé koncentraci, zatímco relativní

kvantifikace využívá sledování změny koncentrace proteinů mezi různými vzorky nebo fyziologickými stavy. V obou případech se využívá buďto izotopově značených proteinů nebo se používají metody bez značení tzv. label free metody (Srbová 2013).

3 Cíl práce

Cílem práce bylo stanovit expresi enzymů DHRS7B a DHRS7C ve vzorcích lidských tkání, které byly zpracovány na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové a tím přispět k novým poznatkům v rámci zkoumání role těchto enzymů v lidském organismu. Množství mRNA ve vzorcích stanovit pomocí metody RT-qPCR za použití fluorescenčního barviva SYBR Green I. Přítomnost proteinů v tkáních stanovit metodou Western blotting s chemiluminiscenční detekcí. Cíl práce lze rozdělit do několika dílčích cílů:

- izolovat mRNA ze vzorků tkání
- odstranit zbytky genomové DNA z izolovaných vzorků
- přepsat mRNA do cDNA pomocí reverzní transkripce
- ověřit integritu cDNA pomocí metody 3': 5' assay
- stanovit množství mRNA enzymu DHRS7B ve vzorcích lidských tkání
- detekovat přítomnost enzymu DHRS7B v homogenátech lidských tkání
- stanovit množství mRNA enzymu DHRS7C ve vzorcích lidských tkání
- detekovat přítomnost enzymu DHRS7C v homogenátech lidských tkání

4 Experimentální část

4.1 Použitý materiál a přístroje

4.1.1 Chemikálie

Název	Výrobce
2-merkapt ethanol	Sigma-Aldrich
Akrylamid (AA)	Sigma-Aldrich
bis-AA	Lachema
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich
Blotting-Grade Blocker (blokovací mléko)	Bio-Rad
DNase I pufr	Biolabs
dNTP mix 10 nM	Biolabs
DTT 0,1 M	Biolabs
Dodecylsírán sodný (SDS)	Lachema
Ethanol	PENTA
First-Strand Buffer	Biolabs
Fomadon LQN	Foma
Fomafix	Foma
Glycin	Sigma-Aldrich
Glycerol	Lach-Ner
Chlorid sodný (NaCl)	PENTA
Chloroform	Serva
Isopropanol	Sigma
Kyselina chlorovodíková (HCl)	Lach-Ner
Kyselina octová	PENTA
Lihomethanol 96%	PENTA
Methanol	PENTA
N,N,N',N'-tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Persírán amonný (APS)	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Ultračistá voda	
TRI reagent	MRC

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)
TWEEN 20

PENTA
Sigma-Aldrich

4.1.2 Materiál a pomůcky

Název

Agilent RNA 6000 Nano čipy
Amersham ECL Prime Western blotting detection reagent
Amersham Hyperfilm ECL
Blotovací papíry Blotting pad 707
Červená žárovka do fotokomory Narva (15W/220V)
Polyvinylfluoridová (PVDF) membrána 0,45 μm

Výrobce

Agilent Technologies
GE Healthcare Life Sciences
GE Healthcare Life Sciences
VWR
Dr. Fischer
Merck Milipore

4.1.3 Přístroje

Název

Blotovací aparatura Tetra Blotting Module
Centrifuga MiniSpin plus
Elektroforetická aparatura Mini-PROTEAN Tetra cell
Elektroforetický přístroj Agilent 2100 Bioanalyzer
Homogenizátor FastPrep-24
NanoDrop 1000 Spectrophotometer
Osvitová kazeta Hypercassette
QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR system
Termomixer Compact
Thermal Cycler MJ Mini
Zdroj napětí Powerpac universal

Výrobce

Bio-Rad
Eppendorf
Bio-Rad
Agilent Technologies
MP
Thermo Fisher Scientific
Amersham
Applied biosystems
Eppendorf
Bio-Rad
Bio-Rad

4.1.4 Hmotnostní marker

Název

Presicion plus protein Standards, All blue

Výrobce

Bio-Rad

4.1.5 Enzymy

Název	Výrobce
DNÁza I	Biolabs
SuperScript II reverzní transkriptáza	Biolabs

4.1.6 Kity

Název	Výrobce
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies
qPCR SYBR Green I Core kit	Eurogentec

4.1.7 Plazmidy

Název	Výrobce
pFB-CT10HF-LIC DHRS7B	KBV FaFUK
pFB-CT10HF-LIC DHRS7C	KBV FaFUK

4.1.8 Primery

Název	Výrobce
Oligo(dT) 0,1 mM	Biolabs
GAPDH (5') Forward: 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	Generi Biotech
GAPDH (5') Reverse: 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	Generi Biotech
GAPDH (3') Forward: 5'-CTCCCACTCTTCCACCTTCG-3'	Generi Biotech
GAPDH (3') Reverse: 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTAG-3'	Generi Biotech
DHRS7B Forward: 5'-GCCTTACTTGGTGACCTTCG-3'	Generi Biotech
DHRS7B Reverse: 5'-TCGACATAGCCAAAGCACTG-3'	Generi Biotech
DHRS7C Forward 1: 5'-AGACATTACCCCCAAAGCTG-3'	Generi Biotech
DHRS7C Reverse 1: 5'-TCCACACAGCCATAGCAATC-3'	Generi Biotech
DHRS7C Forward 2: 5'-CACATTGACGAAAGCCCTGC-3'	Generi Biotech

4.1.9 Protilátky a pozitivní kontroly

Název	Výrobce
Primární králičí protilátka proti DHRS7B, Ab 98880	Abcam
Primární králičí protilátka proti DHRS7C, Ab 116345	Abcam
Sekundární prasečí protilátka proti králičí protilátce, P0217	Dako
Sf9 mikrosomy s rekombinantní lidskou DHRS7B, c = 14,46 mg/ml	KBV FaFUK
Sf9 mikrosomy s rekombinantní lidskou DHRS7C, c = 11,09 mg/ml	KBV FaFUK

4.1.10 Pracovní roztoky pro elektroforézu a Western blotting

Podrobné popisy přípravy pracovních roztoků a pufrů pro SDS-PAGE elektroforézu a Western Blotting jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 2 a 3) :

Tabulka 2: Pracovní roztoky pro SDS-PAGE elektroforézu.

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	18,5 g Tris <u>75 ml ultračisté vody</u> upravit pH na 8.8 pomocí koncentrované HCl doplnit ultračistou vodou do 100 ml uchovávat v lednici
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	6,0 g Tris <u>75 ml ultračisté vody</u> upravit pH na 6,8 pomocí koncentrované HCl doplnit ultračistou vodou do 100 ml uchovávat v lednici
10% SDS	10 g SDS <u>80 ml ultračisté vody</u> doplnit do 100 ml uchovávat při laboratorní teplotě
10% APS	10 mg APS <u>100 µl ultračisté vody.</u> připravovat v čas potřeby

30% akrylamid (AA) + 0,8% bis-akrylamid (bis-AA)	30 g AA 0.8 g bis-AA <u>100 ml ultračisté vody</u> uchovávat v lednici
5 × zásobní elektrodový pufr	15,1 g Tris 72 g glycin <u>5,0 g SDS</u> přidat 900 ml ultračisté vody upravit pH na 8,3 pomocí koncentrované HCl doplnit ultračistou vodou do 1000 ml
5 × zásobní vzorkový pufr	6,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8 3,75 ml glycerol 1,0 g SDS <u>2,5 mg Bromfenolová modř</u> přidat 2-merkптоethanol (25 µl ME na 200 µl pufru) uchovávat při teplotě - 20°C
Isobutanol nasycený vodou	smíchat čistý isobutanol s ultračistou vodou isobutanol je horní vrstva

Tabulka 3: Pracovní roztoky pro Western blotting.

3% Blokovací pufr	3,0 g blokovacího mléka nebo BSA 100 ml TBS-T
5% Blokovací pufr	5,0 g blokovacího mléka nebo BSA 100 ml TBS-T
1× TBS-T pufr	<u>100 ml 10× zásobního TBS pufru</u> doplnit do 1000 ml ultračistou vodou <u>1,0 ml TWEEN 20</u> uchovávat při laboratorní teplotě
10× zásobní TBS pufr	24 g Tris 88 g NaCl <u>900 ml ultračisté vody</u> upravit pH na 7,6 pomocí HCl doplnit do 1000 ml ultračistou vodou uchovávat při laboratorní teplotě
Blotovací pufr	1,51 g 25 mM Tris 7,21 g 192 mM glycin <u>100 ml 20% methanol</u> doplnit ultračistou vodou do 500 ml, pH se neupravuje uchovávat v lednici

4.1.11 Vzorky

Vzorky lidských tkání byly získány z Ústavu soudního lékařství FN Hradec Králové od 9 osob středního věku, které zemřely náhle, bez zjevného onemocnění nebo intoxikace. Od každé zemřelé osoby bylo odebráno několik vzorků tkání reprezentujících hlavní orgány a tkáně. Všechny zemřelé osoby byly mužského pohlaví, až na člověka č. 8, kterým byla žena. Vzorky člověka č. 4 se nestanovovaly.

4.2 Metodika

4.2.1 Kalibrační řada

Pro přípravu kalibrační řady DHRS7B a DHRS7C enzymu byl použit plazmid pFB-CT10HF-LIC se zaklonovanou sekvencí stanovovaného genu. Kalibrační řada se skládala z osmi bodů. Nejvyššímu bodu kalibrační řady (10^8 molekul) odpovídala koncentrace lineárního plazmidu pFB-CT10HF-LIC DHRS7B 0,07166575 ng/ul a pFB-CT10HF-LIC DHRS7C 0,071215 ng/ul. Ostatní kalibrační body byly získány ředěním desítkovou řadou až na hodnotu 10^1 . Kalibrační řada byla použita pro měření absolutní kvantifikace v kap. 4.2.7.

4.2.2 Izolace RNA

Z každého vzorku tkáně se odebralo přibližné množství 50-100 mg. Nejdříve se tkáň opláchla ve vodě ošetřené diethylpyrokarbonátem (500 μ l), pak se nastříhala do homogenizační vialky naplněné 400 μ l TRI reagentu. Ke tkáním se přidaly homogenizační kuličky a směs se nechala lyzovat v homogenizátoru. Vzniklý lyzát se doplnil TRI reagentem na celkový objem 1 ml a nechal se inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě. Následovně se vzorek intenzivně protřepal (15 sekund) s 200 μ l chloroformu, nechal se stát 2-3 minuty při laboratorní teplotě a nakonec se stočil ve vychlazené centrifuze (4 °C) po dobu 15 minut při 12 000 g.

Celá horní vodná fáze (tj. ~500 μ l) se přepipetovala do nové mikrozkušavky, smíchala se s 500 μ l isopropanolu a nechala se inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci se vzorek stočil ve vychlazené centrifuze (4 °C) po dobu 15 minut při 12 000 g a ze zkumavky se odstranila horní vrstva supernatantu.

Vzniklá peleta se nejdříve opláchla 75% ethanolem (1ml) a stočila se ve vychlazené centrifuze (4 °C) po dobu 5 minut při 7 500 g. Po odstranění supernatantu ze vzorku se peleta nechala usušit na vzduchu cca 10 minut a poté se rozpustila ve vodě ošetřené diethylpyrokarbonátem (30 až 100 µl). Doba sušení a množství přidané vody záleželo na velikosti pelety. Výsledná koncentrace RNA se změnila spektrofotometricky na Nanodropu.

4.2.3 Odstranění genomové DNA

Do mikrokumavky se pipetovala reakční směs o celkovém objemu 20 µl, která se skládala z 2 µl reakčního pufru pro DNázu, 2 µl DNázy I, vzorku získaného v kap. 4.2.2. s výslednou koncentrací RNA 500 ng/µl a ultračisté vody. Reakční směs se nejdříve inkubovala 30 minut při 37 °C, pak se teplota zvýšila na 75 °C po dobu 10 minut, aby došlo k inaktivaci enzymu a vzorek se nechal nakonec zchladit. Výsledná koncentrace RNA byla změřena na Nanodropu.

4.2.4 Reverzní transkripce

Do mikrokumavky se nejdříve napipetoval 1 µl 0,1 mM Oligo(dT), pak vzorek získaný v kap. 4.2.3. s výsledným množstvím RNA ve směsi 4000 ng a nakonec se přidala ultračistá voda tak, aby výsledný objem reakční směsi odpovídal 12,5 µl. Následně se reakční směs inkubovala 5 minut při 65 °C a pak se nechala schladit na ledu. K reakční směsi se přidal Master mix (Tab. 4) o celkovém objemu 7,5 µl. Vzniklá směs, o celkovém objemu 20 µl, se nechala nejdříve inkubovat 50 minut při 42 °C a pak se nechala zahřívát na teplotu 65 °C po dobu 20 minut, aby došlo k inaktivaci enzymu. Vzorek se doplnil do konečného objemu 200 µl.

Integrita vzniklé cDNA se ověřovala pomocí metody 3': 5'assay (kap 4.2.5.1) a metody založené na RIN hodnotě (kap. 4.2.5.2).

Tabulka 4: Master mix pro reverzní transkripci (7,5 μ l na 1 vzorek).

5x First-Strand pufr	4 μ l
0,1 M DTT	2 μ l
10 nM dNTP mix	1 μ l
SuperScript II reverzní transkriptáza	0,5 μ l

4.2.5 Stanovení integrity RNA

4.2.5.1 Metoda 3': 5' assay

Nejdříve se připravil Master mix (Tab. 5), zvláště pro 3' a 5' konec, pomocí komerčního kitu (qPCR SYBR Green I Core kit). Specifické dvojice primerů pro oba konce byly navrženy pro gen kódující glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (GAPDH) a jsou uvedeny v kap. 4.1.8.

Tabulka 5: Master mix pro 3': 5' assay (16 μ l pro 1 vzorek).

Ultračistá voda	10,3 μ l
10x pufr	2,0 μ l
50mM MgCl ₂	1,4 μ l
5 mM dNTP	0,8 μ l
Forward primer (5 μ M)	0,4 μ l
Reverse primer (5 μ M)	0,4 μ l
SYBR Green I	0,6 μ l
Hotgoldstar polymeráza	0,1 μ l

Do mikrotitrační destičky se napipetovalo postupně 16 μ l Master mixu pro 3' a 5' konec zvláště, pak se do každé jamky přidaly 4 μ l cDNA (v duplikátu) získané v kap. 4.2.4. a do posledních dvou jamek se pipetovaly 4 μ l ultračisté vody (negativní kontrola). Destička se uzavřela pomocí plastové fólie, promíchala se a nechala se centrifugovat. Poté se mikrotitrační destička vložila do qPCR cykléru s nastaveným teplotním programem (Tab. 6).

Tabulka 6: Teplotní program pro PCR cykly.

95 °C	1 cyklus	10 min
95 °C 60 °C 72 °C	40 cyklů	15 s 20 s 20 s
65 °C – 95 °C	zvyšování o 0,3 °C každých 15 s	

Po skončení programu se vyhodnotily amplifikační křivky, křivky tání a hodnoty Ct. Pro výpočet poměru 3' konce a 5' konce se použila metoda „comparative Ct“:

$$\Delta Ct = Ct(3') - Ct(5')$$

$$3': 5' = 2^{(-\Delta Ct)},$$

kde Ct(3') je hodnota 3' konce a Ct(5') je hodnota 5' konce genu. Vypočítané hodnoty, které by se měly pohybovat od 1 do 10, udávají kvalitu cDNA (Nolan et al. 2006, Schmittgen a Livak 2008).

4.2.5.2 Metoda RIN (RNA integrity number)

Pro přípravu celé metody se použil komerční kit (Agilent RNA 6000 Nano Kit) a elektroforetický bioanalyzátor Agilent 2100 Bioanalyzer.

RIN hodnota udává integritu RNA a hodnoty se pohybují od 1 do 10, kdy vysoce kvalitní vzorky se blíží hodnotě 10. Tato hodnota se vypočítává porovnáním 18S a 28S rRNA vzorků (Schroeder et al. 2006).

4.2.6 Návrh primerů

Pro DHRS7B a DHRS7C gen byly navrženy specifické dvojice primerů pomocí online dostupných nástrojů. Pro generování primerů byl použit nástroj Primer-BLAST (Internet 16) a sekvence se dále ověřila pomocí nástroje mfold (Zuker 2003, Internet

17) kvůli tvorbě nežádoucích sekundárních struktur. Sekvence navržených primerů je uvedena v kap. 4.1.8.

4.2.7 Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR)

Master mix (Tab. 7) se připravil pomocí komerčního kitu (qPCR SYBR Green I Core kit) a pipetovalo se 16 μ l připraveného mixu do mikrotitrační destičky. Použily se specifické primery, které jsou uvedené v kap. 4.1.8.

Tabulka 7: Master mix pro qPCR (16 μ l pro 1 vzorek).

Ultračistá voda	10,3 μ l
10x reakčního pufru	2,0 μ l
50mM MgCl ₂	1,4 μ l
5 mM dNTP	0,8 μ l
Forward primer (5 μ M)	0,4 μ l
Reverse primer (5 μ M)	0,4 μ l
SYBR Green I	0,6 μ l
Hotgoldstar polymeráza	0,1 μ l

K prvním 16 jamkám se postupně přidaly 4 μ l 8 bodové kalibrační řady v duplikátu (kap. 4.2.1). Do ostatních jamek se přidaly 4 μ l cDNA získané v kap. 4.2.4 a do posledních dvou jamek se místo cDNA pipetovaly 4 μ l ultračisté vody (negativní kontrola). Destička se uzavřela pomocí plastové fólie, promíchala se a nechala se centrifugovat. Následně se mikrotitrační destička vložila do qPCR cykléru s nastaveným teplotním programem (Tab. 8).

Tabulka 8: Teplotní program pro PCR cykly.

95 °C	1 cyklus	10 minut
95 °C 60 °C 72 °C	40 cyklů	15 s 20 s 20 s
65 °C – 95 °C	zvyšování o 0,3 °C každých 15 s	

Po skončení qPCR se vyhodnotily křivky tání, amplifikační křivky a hodnoty Ct.

4.2.8 SDS-PAGE elektroforéza

4.2.8.1 Příprava gelů

Gel se naléval mezi dvě skla: elektroforetické sklo pro přípravu gelu o tloušťce 0,75 mm a krycí sklo. Nejdříve se připravil roztok pro přípravu separačního gelu (Tab. 9), promíchal se a ihned se nalil mezi skla asi do $\frac{3}{4}$ výšky. Gel se převrstvil nasyceným isobutanolem a nechal se polymerovat alespoň 30-40 minut.

Tabulka 9: Návod na přípravu 0,75 mm separačního gelu (12,7%).

Ultračistá voda	1,6 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,25 ml
10% SDS	50 µl
30% roztok akrylamidu	2,1 ml
10% APS	50 µl
TEMED	2,5 µl

Po ztuhnutí gelu se slila horní vrstva isobutanolu a gel se propláchl ultračistou vodou. Gel se opatrně osušil filtračním papírem. Následovně se připravil roztok na přípravu zaostřovacího gelu (Tab. 10), promíchal se a ihned se nalil mezi skla, dokud hladina nedosáhla horního okraje krycího skla. Mezi skla se vložil hřebínek a gel se nechal polymerovat minimálně 90 minut.

Tabulka 10: Návod na přípravu 0,75 mm zaostřovacího gelu (4%).

Ultračistá voda	953 μ l
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	1,25 ml
10% SDS	50 μ l
30% roztok akrylamidu	2,1 ml
10% APS	50 μ l
TEMED	2,5 μ l

4.2.8.2 Příprava pozitivních kontrol a vzorků

Pozitivní kontroly byly připraveny na Katedře biochemických věd, Faf UK (PharmDr. Hana Štambergová, Ph.D.). Jedná se o *Sf9* mikrosomy obohacené o DHRS7B nebo DHRS7C rekombinantní protein. Vzorky se připravily homogenizací lidských tkání z člověka 3.

Jako vzorky byly použity lyzáty jednotlivých tkání v množství 50 μ g proteinu. Koncentrace jednotlivých tkání člověka č. 3 je uvedena v Tab. 11. Jako pozitivní kontroly bylo použito 5 μ g *Sf9* mikrosomů s DHRS7B ($c = 14,46$ mg/ml) a 1, 2 a 10 μ g *Sf9* mikrosomů s DHRS7C ($c = 11,09$ mg/ml). Ke vzorkům se přidal vzorkový pufr s ME (Tab. 2) v poměru 1:4 Vzorky se vložily do předeřátého termomixéru (95°C) a nechaly se vařit 3 - 4 minuty. Před aplikací se vzorky krátce stočily v centrifuze.

Tabulka 11: Koncentrace proteinů v homogenátech tkání člověka č. 3.

tkáň	koncentrace (mg/ml)	tkáň	koncentrace (mg/ml)
játra	20,5	slinivka	9,1
kosterní sval	13,8	srdce	15,1
ledvina	15,4	štítná žláza	10,0
mozek	14,5	tenké střevo	7,6
nadledvina	10,6	tlusté střevo	6,7
plíce	4,5	varlata	12,5
prostata	3,9	žaludek	9,3
slezina	18,9		

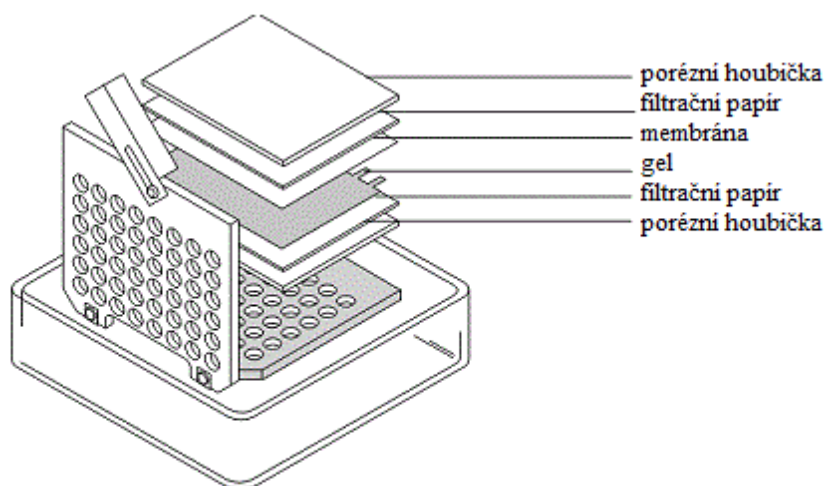
4.2.8.3 Elektroforéza

Připravený gel (kap. 4.2.8.1) se umístil do elektroforetické vany a vnitřní prostor cely se naplnil elektrodoým puřem pod horní okraj krycího skla. Do první jamky se nanesy 3 μ l hmotnostního markeru a dále pokračovaly vzorky a DHRS7B a DHRS7C pozitivní kontroly. Jamky se opatřně doplnily elektrodoým puřem po okraj krycího skla. Do vany se doplnil elektrodoý puř po rysku a systém se uzavřel víkem. Nakonec se aparatura připojila ke zdroji stejnosměřného napětí. Nejdřív se na přístroji nastavilo konstantní napětí 100V po dobu 10-20 minut, dokud se vzorky nedostaly na okraj separačního gelu. Napětí se přenastavilo na hodnotu 170 V po dobu cca 75 minut, dokud se vzorky nedostaly na okraj gelu. Po skončení elektroforézy se gel opatřně vyjmul ze skel a odstranila se vrstva zaostřovacího gelu.

4.2.9 Western blotting

4.2.9.1 Příprava blotu a blotování

Blot se skládal z 6 vrstev: 2 x porézní houbička, 2 x filtrační papír membrána a gel. Vrstvy se skládaly do speciální kazety v pořadí porézní houbička, filtrační papír, gel, membrána, filtrační papír, porézní houbička (Obr. 13).



Obrázek 13: Blotovací sendvič: Popis skládání blotu od katodového (černého) konce v pořadí: porézní houbička, filtrační papír, membrána, gel, filtrační papír a porézní houbička (upraveno z Internet 18).

Před samotným skládáním se každá vrstva namočila do blotovacího pufru a gel se nechal ekvilibrovat minimálně 10 minut. Velikost membrány a filtračních papírů odpovídala rozměrům gelu. Nejdříve se PDVF membrána aktivovala v methanolu (1 min), poté se důkladně promyla destilovanou vodou a následně se ekvilibrovala v blotovacím pufru. S membránou se manipulovalo pouze s pinzetou s tupým koncem. Blotovací sendvič se skládal od katodového konce kazety podle předchozího schématu (Obr. 13). Celá kazeta se vložila do blotovací vany a blotovací pufr se doplnil po rysku. Vana se umístila do chladicí místnosti (4 °C) v nádobě s ledem. Western blotting byl proveden při konstantním proudu 90 mA po dobu 16 hodin.

Po 16 hodinách se blot vyjmul z přístroje a membrána se položila do nádoby s TBS-T pufrem. Tužkou se označil molekulový marker. Kontrola přenesení proteinů z gelu na membránu se detkovala pomocí barvení Ponceau S (kap. 4.2.9.2).

4.2.9.2 Kontrola přenosu proteinů na membránu

Na membránu se nalil roztok 0,1% Ponceau S (Tab. 12) a nechal se působit do té doby, než se membrána obarvila růžovou barvou (cca 1 minutu). Následovně se pozadí membrány odbarvilo pomocí 10% kyseliny octové (Tab. 12) a tím se zviditelnily růžové pruhy, které značily přítomnost proteinů na membráně. Následovně se barva odstranila důkladným promytím v TBS-T pufru.

Tabulka 12: Pracovní roztoky pro kontrolu přenosu proteinů na membránu.

10% kyselina octová	<u>10,1 ml kyseliny octové</u> doplnit do 100 ml ultračistou vodou
Barvicí roztok 0,1% Ponceau S	0,1 g Ponceau S <u>100 ml ultračisté vody</u> uchovávat při laboratorní teplotě

4.2.9.3 Navázání protilátek

Po vymytí Ponceau S se membrána blokovala pomocí blokovacího mléka po dobu 90 min na orbitální třepačce (80 rpm) při laboratorní teplotě. Membrána se důkladně promyla 3x TBS-T pufrům a 30 minut se nechala na třepačce (pufr se každých 10 minut vyměnil). Na membránu se aplikoval roztok primární protilátky (ředění Tab. 13 a 14) a nechal se inkubovat 2 hodiny při laboratorní teplotě. Protilátka z membrány se následně opláchla 3x TBS-T pufrům a 30 minut se nechala na třepačce (pufr se každých 10 minut vyměnil). Poté se membrána inkubovala s roztokem sekundární protilátky (ředění Tab. 13 a 14) po dobu 90 minut na orbitální třepačce při laboratorní teplotě. Nakonec se membrána omyla od sekundární protilátky 3x TBS-T pufrům a 30 minut se nechala na třepačce (pufr se každých 10 minut vyměnil).

Tabulka 13: Ředění protilátek pro DHRS7B.

Primární protilátka	protilátka přidána do 5% mléka v poměru 1 : 2000 v/v uchovávat při teplotě – 20 °C
Sekundární protilátka	protilátka přidána do 5% mléka v poměru 1 : 4000 v/v uchovávat při teplotě – 20 °C

Tabulka 14: Ředění protilátek pro DHRS7C.

Primární protilátka	protilátka přidána do 3% mléka v poměru 1 : 2000 v/v uchovávat při teplotě – 20 °C
Sekundární protilátka	protilátka přidána do 3% mléka v poměru 1 : 2000 v/v uchovávat při teplotě – 20 °C

4.2.9.4 Chemiluminiscenční detekce

Následující detekční postup probíhal v temné komoře při bezpečném světle. Membrána se osušila od TBS-T pufru a položila se na plastovou fólii. Na celý povrch membrány se aplikoval detekční systém (Tab. 15) smíchaný v poměru 1:1 a nechal se inkubovat 5 minut. Inkubovaná membrána se osušila od detekčního systému a vložila se mezi dvě vrstvy folie. Membrána se vložila do osvitové kazety a na její aktivní stranu se položil fotofilm. V osvitové kazetě se fotofilm nechal exponovat po potřebnou dobu, která závisela na intenzitě svitu detekčního systému, od 1 do 45 minut. Fotofilm se ponořil do vývojky (Tab. 15) a nechal se vyvíjet do té doby, než se na fotofilmu objevily pruhy (asi 1 minutu). Poté se fotofilm důkladně opláchnul v destilované vodě a ponořil se do ustalovače (Tab. 15). Nakonec se fotofilm důkladně omyl v destilované vodě a nechal se oschnout ve svislé poloze.

Tabulka 15: Pracovní roztoky pro detekční systém.

Detekční systém	roztok A smíchat s roztokem B v poměru 1:1 celkový objem vypočítat dle rovnice (ml): $\text{šířka membrány} \times \text{výška membrána} \times 0,05$
Ustalovač	15 ml Fomafixu 75 ml ultračisté vody
Vývojka	6 ml Fomadonu LQN 84 ml ultračisté vody

5 Výsledková část

5.1 Stanovení exprese na úrovni mRNA

5.1.1 Příprava vzorků

RNA byla nejdříve izolována ze všech dostupných tkání člověka č. 6 - 9 a následně přepsána do cDNA. Po odstranění zbytků genomové DNA, byla čistota cDNA ověřena porovnáním absorbance při 260 a 280 nm. U všech vzorků byl poměr A260/280 vyšší než 1,8 a proto všechny vzorky byly použity pro další měření.

U člověka č. 1 - 3 a 5 byla provedena izolace RNA, prepis do cDNA a odstranění zbytků genomové DNA před začátkem studie a tato cDNA byla uchována při - 80 °C. U těchto vzorků byl rovněž změřen poměr A260/280 , který byl vyšší než 1,8 a tyto vzorky byly použity pro další měření.

5.1.2 Ověření integrity cDNA

Integrita cDNA byla stanovena u všech vzorků pomocí metody 3': 5'assay a pouze u některých vzorků byla doplněna o RIN hodnotu. U metody 3': 5'assay se za dostatečně kvalitní cDNA považovaly vzorky s hodnotami od 1 do 10. Metoda založená na RIN hodnotě byla použita pouze u novějších vzorků a to u člověka č. 6 - 9. Za dostatečně kvalitní cDNA se považovaly vzorky, u kterých se hodnota RIN pohybovala v rozmezí hodnot 5 - 10. Vzorky, které splňovaly alespoň jedno z uvedených kritérií (Tab. 16, 17 a 18), byly použity pro stanovení množství mRNA. Vzorky, u kterých obě hodnoty převyšovaly daná kritéria, nebyly použity pro qPCR. U těchto vzorků se předpokládalo, že pravděpodobně došlo k degradaci RNA.

Tabulka 16: Výsledky měření kvality cDNA pomocí metody 3' : 5' assay. Dostatečně kvalitní vzorky člověka č. 1 - 3 a 5 (muži) jsou označeny zeleně.

	člověk 1	člověk 2	člověk 3	člověk 5
tkáň	3' : 5' poměr	3' : 5' poměr	3' : 5' poměr	3' : 5' poměr
játra	2,82	*	5,35	7,25
ledvina	1,63	1,75	4,89	3,7
mozek	3,22	*	3,89	2,27
nadledvina	*	2,13	3,05	2,33
příče	3160,79	*	16,45	575,97
prostata	3,58	16,17	16,52	*
sítnice	143,72	2,59	*	83,94
slezina	*	*	4,38	7,91
slinivka	*	17,30	3,18	23,70
srdce	*	*	9,45	*
štítná žláza	35,29	*	4,52	2,86
tenké střevo	*	20,94	2696,52	97,86
tlusté střevo	159,05	5,5	92,81	34076,82
varlata	3,93	3,42	2,45	1,94
žaludek	*	5,2	21,40	5,13
Celkem použito	5	6	9	8

* vzorky, které nebyly dostupné

Tabulka 17: Výsledky měření kvality cDNA pomocí metody 3' : 5' assay a metody založené na RIN hodnotě. Dostatečně kvalitní vzorky člověka č. 6, 7 a 9 (muži) jsou označeny zeleně.

tkáň	člověk 6		člověk 7		člověk 9	
	RIN hodnota	3': 5' poměr	RIN hodnota	3': 5' poměr	RIN hodnota	3': 5' poměr
játra	2,6	6,42	5,6	8,29	4,5	9,16
kosterní sval	6,9	9,17	7,7	9,93	8,3	1,28
ledvina	3,3	16,34	2,4	40,24	N	4,3
mozek	4,6	2,35	4,7	3,72	5,3	3,50
nadledvina	3,2	6,52	3	47,82	N	36,60
plíce	3,7	135,07	2,5	2591,87	N	18,15
prostata	5,6	131,21	2,9	14,76	2,4	23,9
sítnice	3,7	61834,58	3,1	43,82	5,2	106,56
slezina	2,5	0,32	2,5	23,18	2,3	9,89
slinivka	2,5	46,52	2,3	7,41	2,5	3,7
srdce	5,2	26,06	3,3	10,41	N	2,5
štítná žláza	7	2,94	7,1	7,02	N	241,68
tenké střevo	2,8	112,5	2,5	275,05	2,6	9,02
tlusté střevo	2,3	23,13	2,5	37,70	2,7	31,12
tuk podkožní	6,5	22,81	2,9	246,51	7,7	10,84
tuk viscerální	6,1	37,55	6,1	387,43	6,6	945,18
varle	5,8	54,18	2,7	89,74	N	55,16
žaludek	2,6	16,23	1,7	36,40	2,2	5,97
Celkem použito	11		7		10	

N - nezměřeno

Tabulka 18: Výsledky měření kvality cDNA pomocí metody 3' : 5'' assay a metody založené na RIN hodnotě. Dostatečně kvalitní vzorky člověka č. 8 (žena) jsou označeny zeleně.

tkáň	člověk 8	
	RIN hodnota	3' : 5' poměr
děloha	6,4	3,52
játra	6,1	7,38
kosterní sval	6,9	80,46
ledvina	3	8,54
mléčná žláza	2,5	17,15
mozek	6,7	3,66
nadledvina	6,4	55,32
příce	2,7	30,29
sítnice	3,3	1,02
slezina	2,9	5,55
slinivka	2,4	32,00
srdce	6,4	14,53
štítná žláza	8,8	4,68
tenké střevo	2,9	22,11
tlusté střevo	2,8	54,92
tuk podkožní	2,3	157,45
tuk viscerální	5,4	1941,66
vaječníky	7,4	2,41
žaludek	2,4	58,31
Celkem použito		11

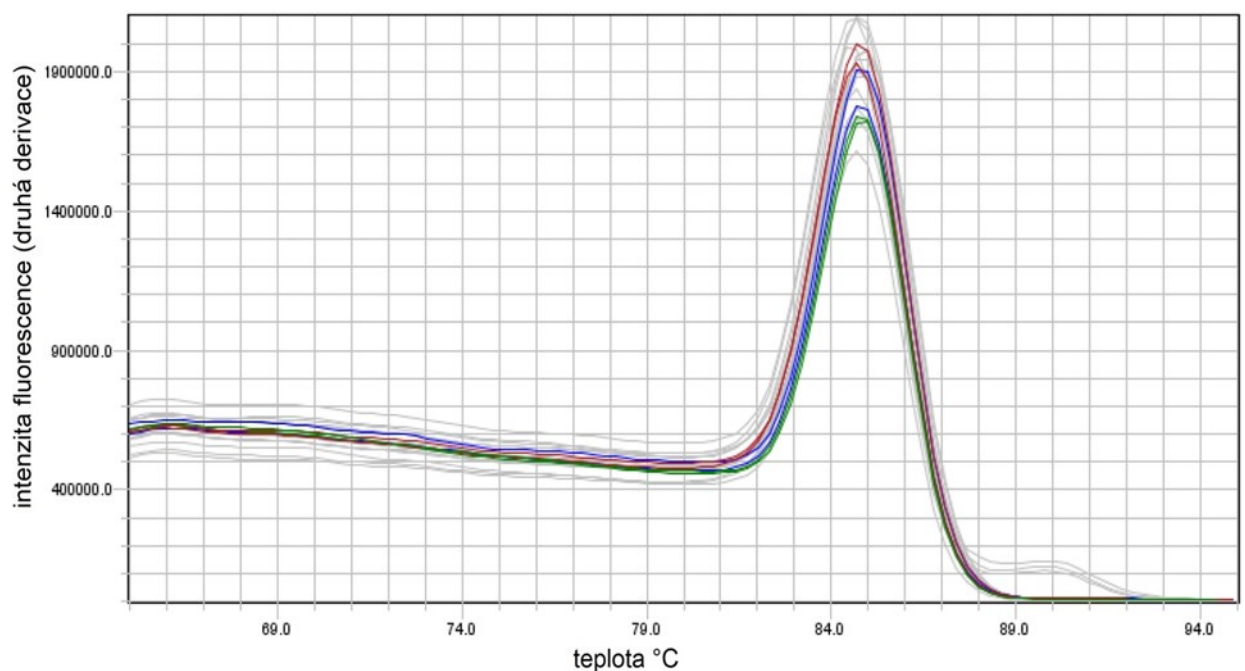
5.1.3 Kvalitativní PCR v reálném čase

Stanovení exprese mRNA enzymu DHRS7B a DHRS7C byla stanovena pomocí kvalitativní PCR v reálném čase pomocí fluorescenčního barviva SYBR GREEN I. U každého měření byly vyhodnoceny amplifikační křivky, křivky tání, ověřovala se správnost výsledků a specifita navržených primerů.

5.1.3.1 Ověření specifity primerů

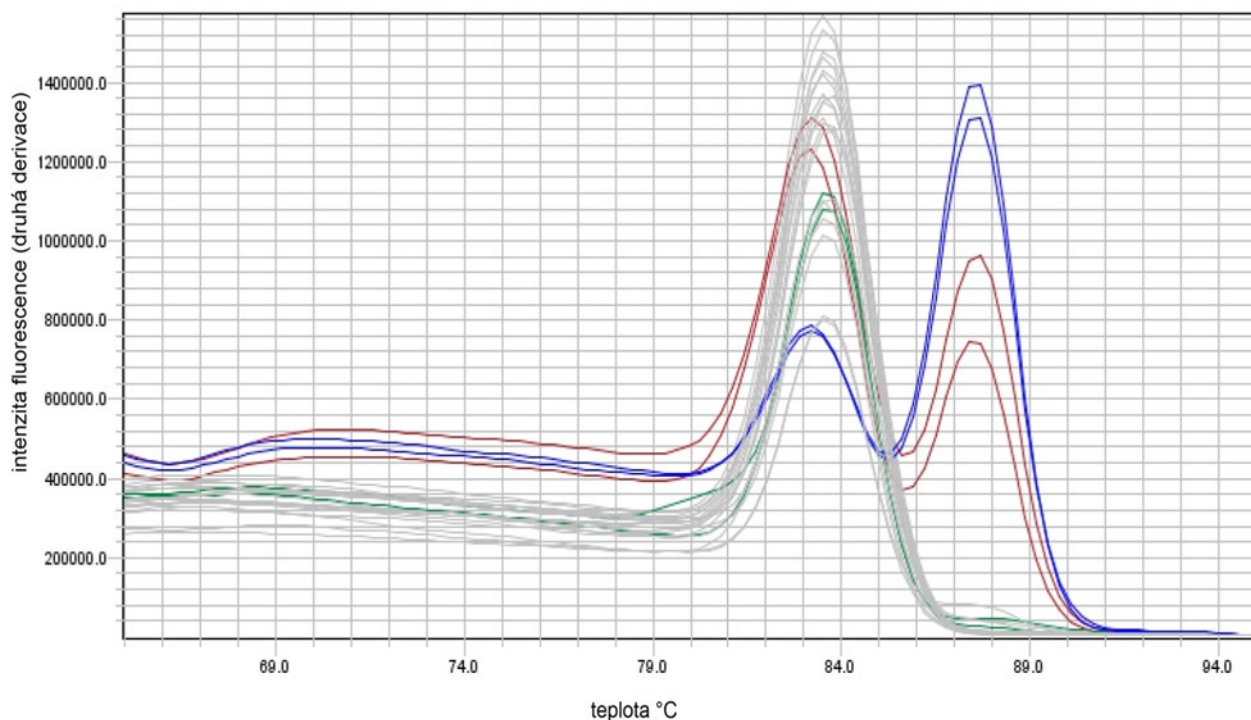
Nejdříve se u DHRS7B a DHRS7C primerů ověřila jejich specifita pomocí analýzy křivek tání vybraných vzorků. V případě přítomnosti výhradně specifického produktu by měl být zaznamenán u křivky tání pouze jeden vrchol, který koresponduje s tvorbou jednoho produktu.

Křivka tání u vzorků s použitím první sady DHRS7B primerů disponovala pouze jedním vrcholem (Obr. 14). Tím byla potvrzena přítomnost pouze jednoho produktu, u kterého se T_m pohybovala mezi 84 – 85 °C.

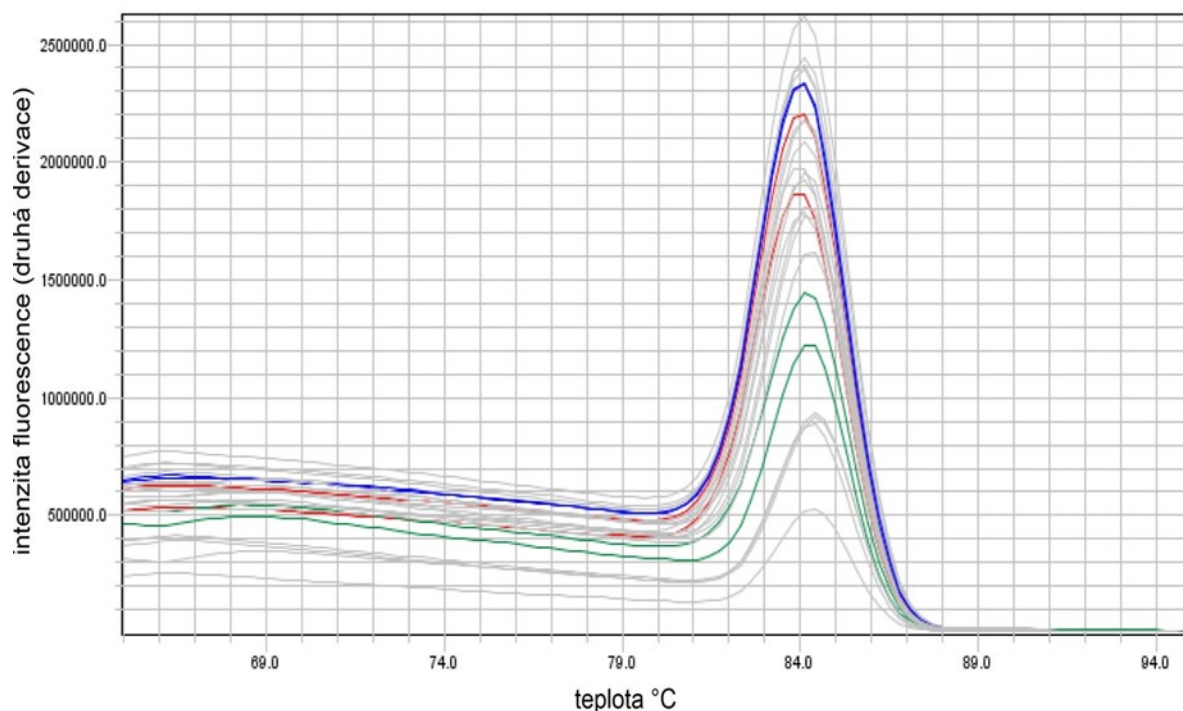


Obrázek 14: Křivka tání znázorňující závislost intenzity fluorescence (druhá derivace) jednotlivých vzorků na teplotě s použitím první sady DHRS7B primerů. Šedá barva označuje standardy, zelená barva označuje srdce člověka č. 6, červená barva označuje mozek člověka č. 6 a modrá barva označuje prostatu člověka č. 6.

První sada DHRS7C primerů generovala tvorbu dvou produktů s odlišnou T_m , jak je vidět na křivce tání (Obr. 15). Tato sada primerů uvedená v kap. 4.1.8 jako DHRS7C Forward 1 a DHRS7C Reverse 1 nebyla použita ke stanovení množství mRNA. Z uvedených důvodů byla navržena druhá sada primerů, která je uvedena v kap. 4.1.8 jako DHRS7C Forward 2 a DHRS7C Reverse 2. Křivky tání u vybraných vzorků s použitím druhé sady DHRS7C primerů disponovaly pouze jedním vrcholem, jak je vidět na Obr. 16. Tím byla ověřena přítomnost pouze jednoho produktu, u kterého se T_m pohybovala mezi 84 – 85 °C. Druhá sada primerů byla následně použita k stanovení množství mRNA.



Obrázek 15: Křivka tání znázorňující závislost intenzity fluorescence (druhá derivace) jednotlivých vzorků na teplotě s použitím první sady DHRS7C primerů. Šedá barva označuje standardy, zelená barva označuje játra člověka č. 6, červená barva označuje mozek člověka č. 6 a modrá barva označuje štítnou žlázu člověka č. 6.

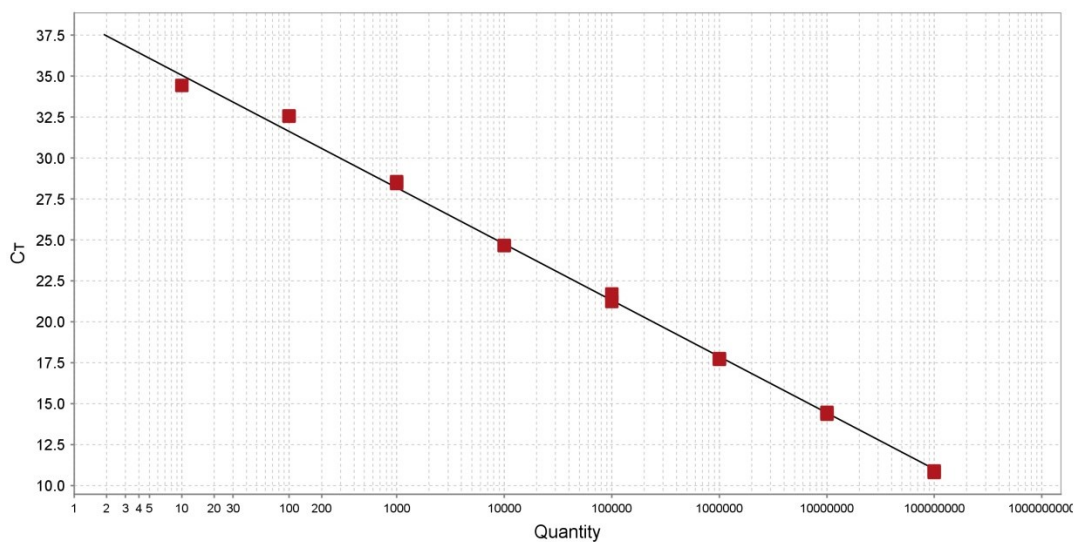


Obrázek 16: Křivka tání znázorňující závislost intenzity fluorescence (druhá derivace) jednotlivých vzorků na teplotě s použitím druhé sady DHRS7C primerů. Šedá barva označuje standardy, zelená barva označuje játra člověka č. 6, červená barva označuje mozek člověka č. 6 a modrá barva označuje štítnou žlázu člověka č. 6.

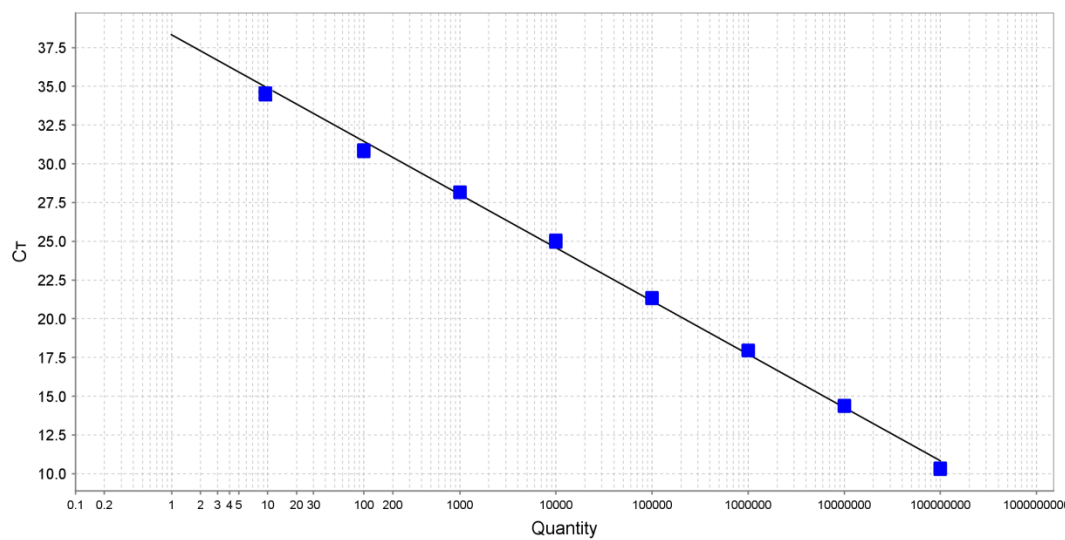
5.1.3.2 Ověření validity výsledků

Ověření validity výsledků proběhlo po každém jednotlivém měření analýzou kalibračních křivek. U každé kalibrační křivky se posuzoval korelační koeficient, sklon křivky a také byla ověřena efektivnost reakce.

Efektivita qPCR reakce by se měla pohybovat mezi 90 - 110 %. Korelační koeficient by měl odpovídat hodnotám mezi 0,98 - 1. Sklon křivky by měl být lineární s hodnotami pohybujícími se mezi -3,2 a -3,5. Pro úplnost jsou uvedeny kalibrační křivky enzymů DHRS7B (Obr. 17) a DHRS7C (Obr. 18), které splňovaly dané parametry a tím byla potvrzena správnost a reprodukovatelnost výsledků.



Obrázek 17: Kalibrační křivka znázorňující závislost Ct hodnot na množství transkriptů standardů enzymu DHR57B se sklonem křivky -3,431, korelačním koeficientem 0,995 a efektivitou 95,481%.



Obrázek 18: Kalibrační křivka znázorňující závislost Ct hodnot na množství transkriptů standardů enzymu DHR57C se sklonem křivky -3,432, korelačním koeficientem 0,997 a efektivitou 95,458 %.

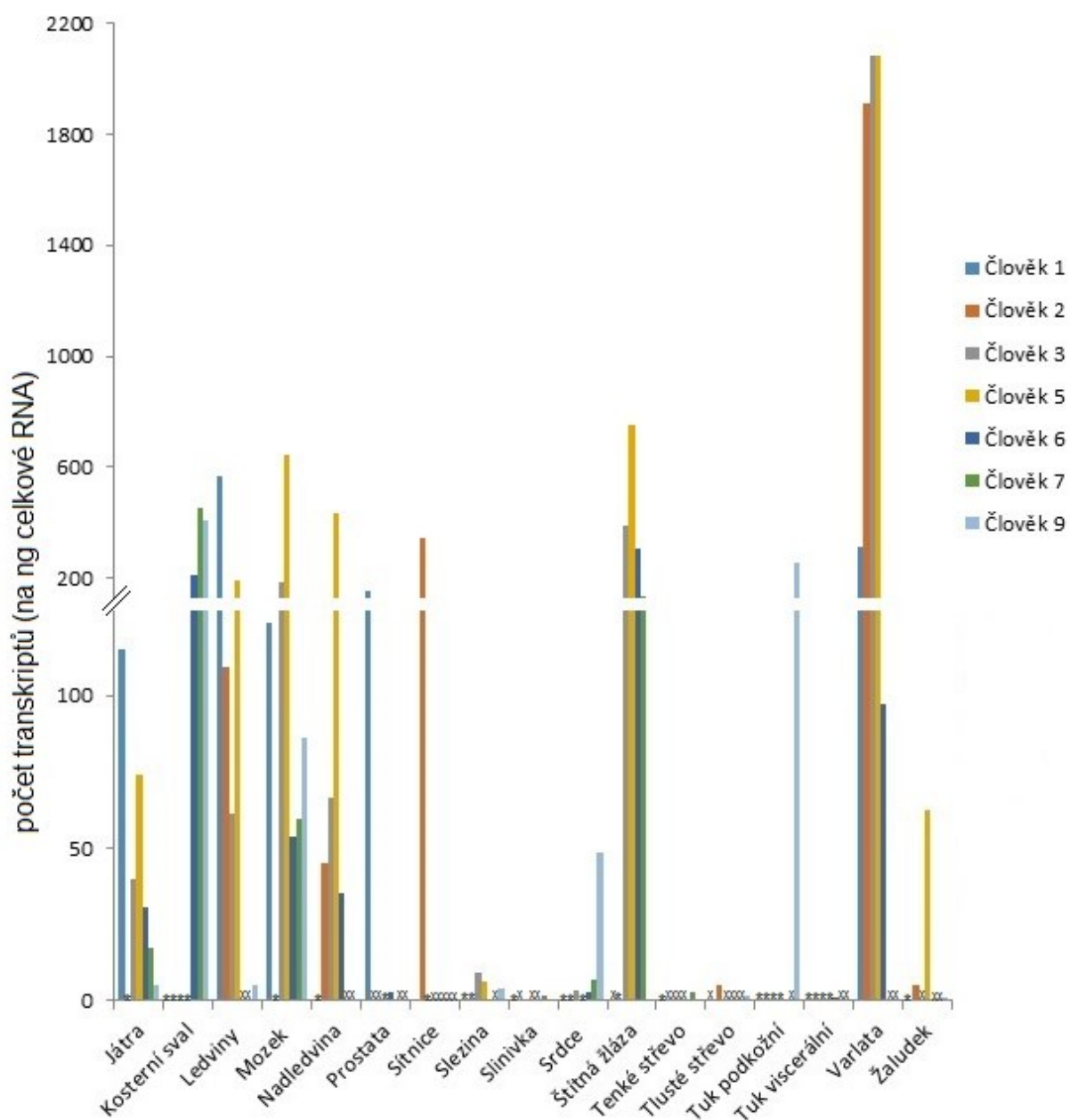
5.1.4 Vyhodnocení mRNA ve tkáních

Expres mRNA se vyhodnocovala metodou absolutní kvantifikace. Z každého měření byly vyhodnoceny hodnoty Ct vzorků, které odpovídaly množství transkriptů

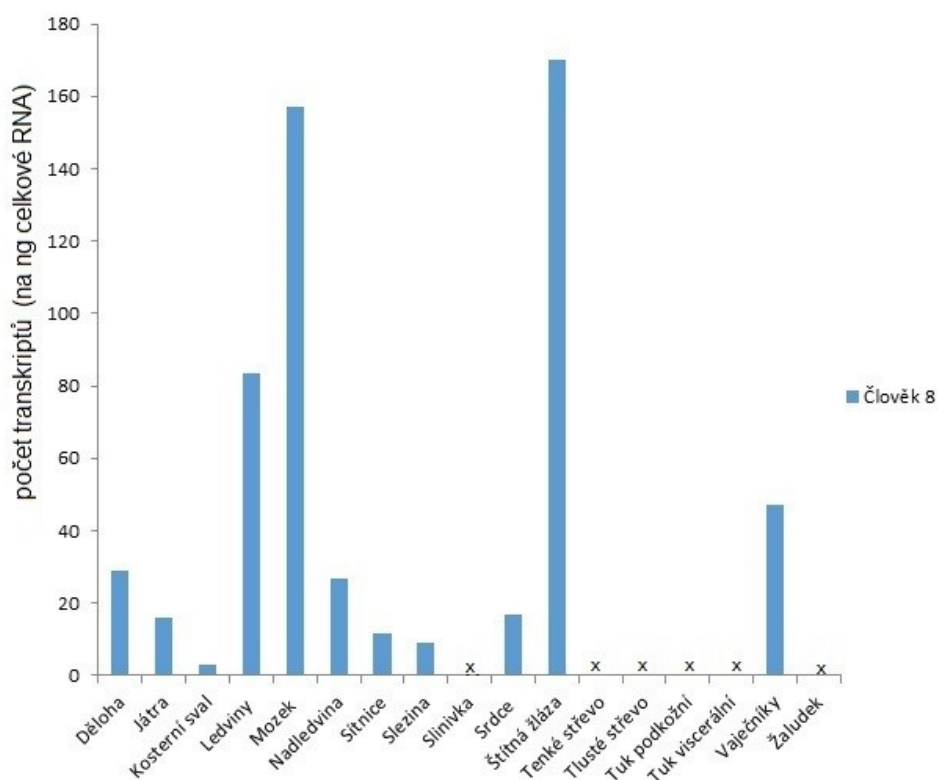
enzymů DHRS7B a DHRS7C v jednotlivých tkáních. Hodnoty Ct vzorků byly získány z přímky lineární regrese, která byla sestrojena z osmi bodů kalibrační řady. Hodnoty Ct vzorků byly dále přepočteny na množství transkriptů na ng celkové RNA v jednotlivých vzorcích.

5.1.4.1 Exprese mRNA enzymu DHRS7B

Expresa mRNA enzymu DHRS7B nebyla ve všech tkáních shodná a rozdílnost výsledků byla také viditelná mezi jednotlivými subjekty, jak je vidět na Obr. 19 a 20. Vysoká exprese byla zaznamenána zejména ve varlatech u člověka č. 2, 3 a 5, zatímco o něco slabší exprese byla viditelná i u člověka č. 1 a 6. O něco slabší exprese byla detekována také v kosterním svalu, ledvinách, mozku, nadledvinách, prostatě, sítnici, štítné žláze a podkožním tuku. V ostatních tkáních (děloha, játra, slezina, slinivka, srdce, tenké střevo, tlusté střevo, viscerální tuk, vaječníky a žaludek) byla viditelná pouze slabá exprese enzymu DHRS7B. Všechny dostupné tkáně nebyly podrobeny qPCR, protože jejich mRNA nebyla dostatečně kvalitní. Množství mRNA enzymu DHRS7B v jednotlivých vzorcích je uvedeno na Obr. 19 a 20 a v příloze 1, 2 a 3.



Obrázek 19: Graf znázorňující množství mRNA enzymu DHRS7B na ng celkové RNA ve vzorcích tkání člověka č. 1 - 3 a 5 -7 a 9 (muži), * - vzorky, které nebyly dostupné, X – vzorky, které nebyly podrobeny qPCR.

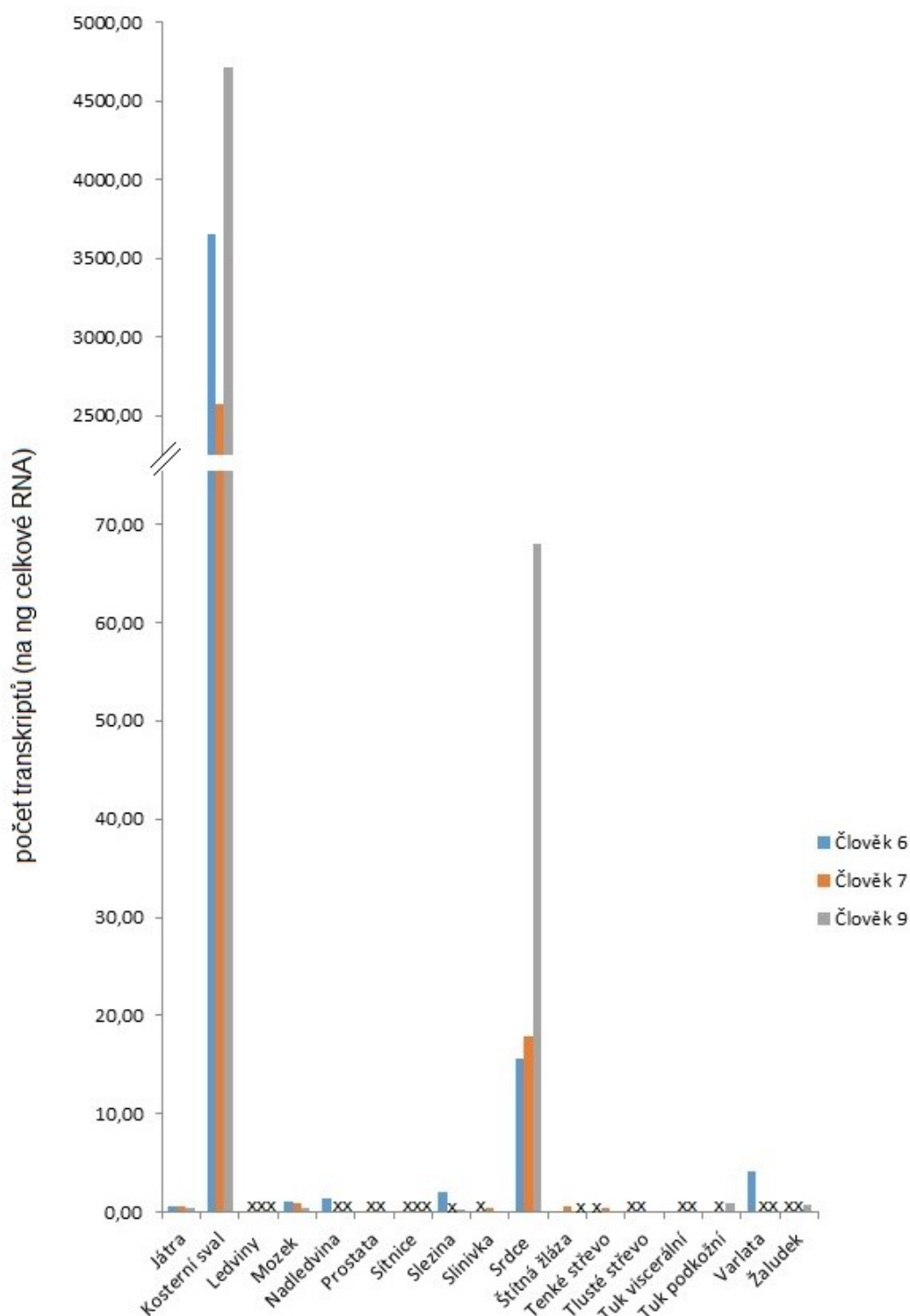


Obrázek 20: Graf znázorňující množství mRNA enzymu DHRS7B na ng celkové RNA ve vzorcích tkání člověka č. 8 (žena), X – vzorky, které nebyly podrobeny qPCR.

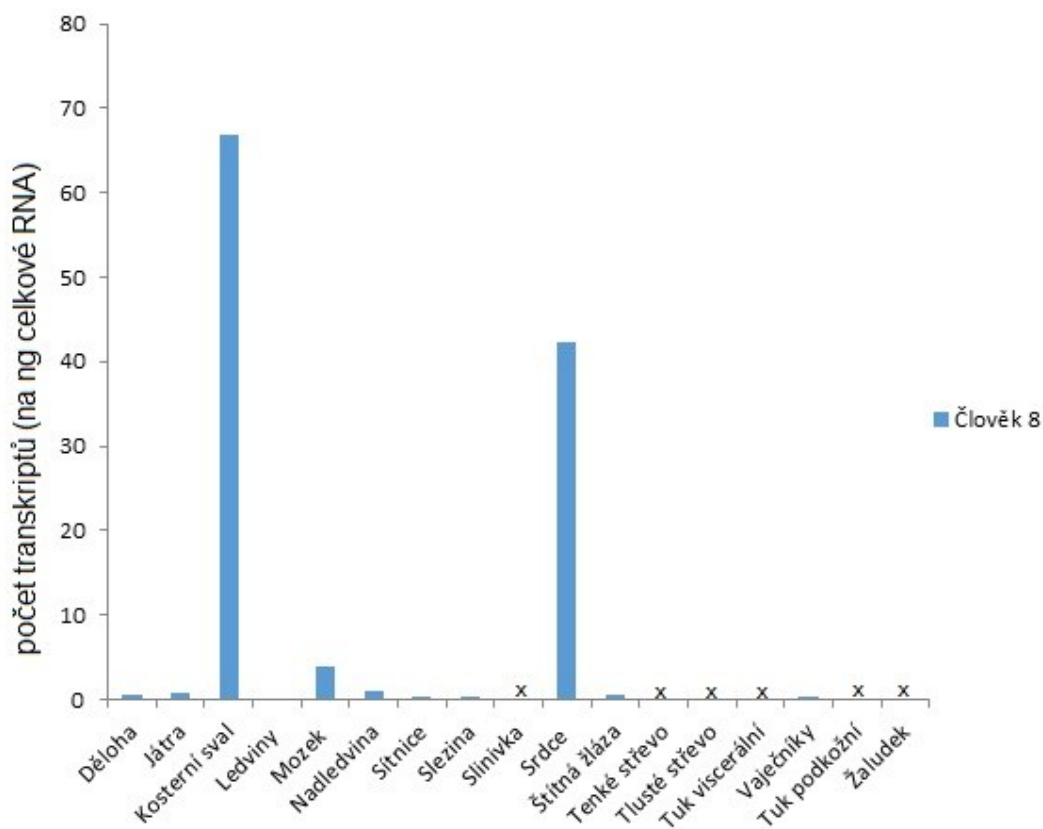
5.1.4.2 Expresse mRNA enzymu DHRS7C

Expresse mRNA enzymu DHRS7C byla změřena pouze u člověka č. 6 - 9. Expresse mRNA enzymu DHRS7C nebyla ve všech tkáních shodná a rozdílnost výsledků byla také viditelná mezi jednotlivými subjekty, jak je vidět na Obr. 21 a 22. Expresse DHRS7C byla velice významná ve vzorcích kosterního svalu v porovnáním s ostatními tkáněmi, jak je vidět na Obr. 21 a 22. Silná expresse byla viditelná zejména u člověka č. 6, 7 a 9, jen u člověka č. 8 byla expresse o poznání nižší. Expresse byla také zaznamenána v srdci a to ve výrazně nižší hladině než v kosterním svalu (Obr. 21) a v případě člověka č. 8 byla expresse téměř srovnatelná (Obr. 22). V ostatních tkáních (děloha, játra, ledviny, mozek, nadledvina, prostata, sítnice, slezina, slinivka, štítná žláza, tenké střevo, tlusté střevo, tuk podkožní, tuk viscerální, vaječníky, varlata a žaludek) byla hladina expresse velice slabá nebo žádná. Všechny dostupné tkáně nebyly podrobeny qPCR,

protože jejich mRNA nebyla dostatečně kvalitní. Množství mRNA u enzymu DHRS7C v jednotlivých vzorcích je uvedeno na Obr. 21 a 22 a v příloze 4 a 5.



Obrázek 21: Graf znázorňující množství mRNA enzymu DHRS7C na ng celkové RNA ve vzorcích tkání člověka č. 6 – 7 a 9 (muži), X – vzorky, které nebyly podrobeny qPCR.



Obrázek 22: Graf znázorňující množství mRNA enzymu DHRS7C na ng celkové RNA ve vzorcích tkání člověka č. 8 (žena), X – vzorky, které nebyly podrobeny qPCR.

5.2 Stanovení exprese na úrovni proteinu

5.2.1 Western blotting

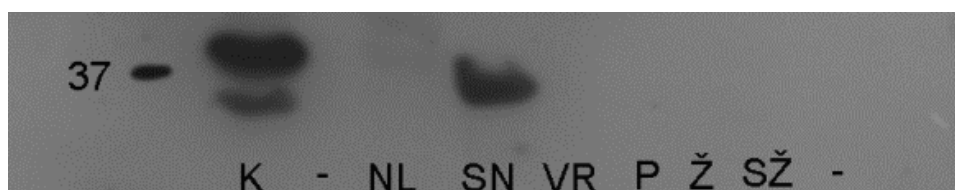
Exprese na úrovni proteinu se vyhodnocovala pomocí metody Western blotting s chemiluminiscenční detekcí. Jako vzorky bylo použito 15 homogenátů tkání člověka č. 3 (játra, kosterní sval, ledviny, mozek, nadledvina, plíce, prostata, slezina, slinivka, srdce, štítná žláza, tenké střevo, tlusté střevo, varlata, žaludek), které byly nejdříve separovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy spolu s hmotnostním markrem a následně byl proveden jejich přenos na PDVF membránu. Kontrola přenosu proteinů na membránu byla ověřena barvením pomocí Ponceau S. Po navázání protilátek byla na každém blotu viditelná pozitivní kontrola DHRS7B resp. DHRS7C, která ověřovala funkčnost metody a správnost výsledků.

5.2.1.1 Exprese enzymu DHRS7B

Expresa enzymu DHRS7B (Obr. 23 a 24) byla viditelná pouze v mozku a slinivce. V ostatních tkání (ledvina, játra, srdce, plíce, slezina, tenké střevo, tlusté střevo, kosterní sval, nadledvina, varlata, prostata, žaludek, štítná žláza) nebyla exprese pozorována. Molekulová hmotnost enzymu DHRS7C odpovídá 35 kDa. Molekulová hmotnost DHRS7B v rekombinantní formě, která je obsažená v pozitivní kontrole, je větší o cca 2,5 kDa vzhledem k přítomnosti afinitních značek FLAG a His10. Z časových důvodů byla exprese DHRS7B na úrovni proteinu testována pouze u člověka č. 3.



Obrázek 23: Blot č. 1: Expresa enzymu DHRS7B v 9 homogenátech tkání člověka č. 3 (50 μ g proteinu). K - pozitivní kontrola enzymu DHRS7B (5 μ g Sf9 mikrosomů s DHRS7B), M - mozek, L - ledvina, J - játra, S - srdce, PL - plíce, SZ - slezina, TN - tenké střevo, TL - tlusté střevo, KS - kosterní sval.



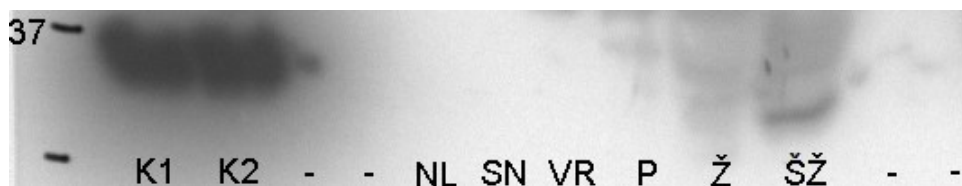
Obrázek 24: Blot č. 2 : Expresa enzymu DHRS7B v 6 homogenátech tkání člověka č. 3 (50 μ g proteinu). K - pozitivní kontrola enzymu DHRS7B (5 μ g Sf9 mikrosomů s DHRS7C), NL - nadledvina, SN - slinivka, VR - varlata, P - prostata, Ž - žaludek, SŽ - štítná žláza.

5.2.1.2 Exprese enzymu DHRS7C

Expresa enzymu DHRS7C (Obr. 25 a 26) byla detekována pouze v kosterním svalu, v srdci a ve štítné žláze. V ostatních tkáních (tlusté střevo, tenké střevo, slezina, plíce, játra, ledviny, mozek, nadledvina, slinivka, varlata, prostata, žaludek) nebyla zaznamenána exprese. Molekulová hmotnost enzymu DHRS7C odpovídá 35 kDa. Molekulová hmotnost DHRS7B v rekombinantní formě, která je obsažená v pozitivní kontrole, je větší o cca 2,5 kDa vzhledem k přítomnosti afinitních značek FLAG a His10. Z časových důvodů byla exprese DHRS7C na úrovni proteinu testována pouze u člověka č. 3.



Obrázek 25: Blot č. 1: Expresa enzymu DHRS7C v 9 homogenátech tkání člověka č. 3 (50 μ g proteinu). K - pozitivní kontrola enzymu DHRS7C (10 μ g Sf9 mikrosomů s DHRS7C), KS - kosterní sval, TL - tlusté střevo, TN - tenké střevo, SZ - slezina, PL - plíce, S - srdce, J - játra, L - ledvina, M - mozek.



Obrázek 26: Blot č. 2: Expresa enzymu DHRS7C v 6 homogenátech tkání člověka č. 3 (50 μ g proteinu). K1 - pozitivní kontrola enzymu DHRS7C (1 μ g Sf9 mikrosomů s DHRS7C), K2 - pozitivní kontrola enzymu DHRS7C (2 μ g Sf9 mikrosomů s DHRS7C), NL - nadledvina, SN - slinivka, VR - varlata, P - prostata, Ž - žaludek, ŠŽ - štítná žláza.

6 Diskuze

Mezi lidské SDR členy řadíme skupinu enzymů, které hrají roli v různých fyziologických dějích a patologických stavech. I když úroveň poznání některých lidských SDR enzymů je v současné době velice vysoká, existují zástupci, kteří jsou velice málo charakterizováni, jako DHRS7B a DHRS7C. Mezi málo prozkoumané vlastnosti obou enzymů patří i jejich tkáňová exprese.

Součástí této studie bylo stanovit expresi enzymu DHRS7B na úrovni mRNA v lidských tkáních. Naše výsledky nemůžeme porovnávat s jinou studií, protože exprese DHRS7B enzymu na úrovni mRNA doposud nebyla publikována u člověka ani u jiných živočišných druhů. Nejsilnější expresi DHRS7B jsme pozorovali ve varlatech a za nimi následovala o něco slabší exprese v kosterním svalu, ledvinách, mozku, nadledvinách, prostatě, sítnici, štítné žláze a podkožním tuku. V ostatních tkáních (děloha, játra, slezina, slinivka, srdce, tenké střevo, tlusté střevo, viscerální tuk, vaječníky a žaludek) byla viditelná pouze slabá exprese enzymu DHRS7B.

Mimo stanovení exprese DHRS7B na úrovni mRNA jsme se zabývali také detekcí tohoto enzymu v homogenátech lidských tkání. Expresse byla pozitivní v případě mozku a slinivky. Tyto poznatky jsme mohli porovnat se studií (Lodhi et al. 2012), která detekovala DHRS7B enzym v myších tkáních pomocí stejné metody jako v našem případě, a to pomocí metody Western blotting. Stejně jako Lodhi et al. (2012) jsme detekovali expresi v mozku. Ve studii (Lodhi et al. 2012) zaznamenali také pozitivní expresi v játrech, ledvinách, srdci, plicích, kosterním svalu, ale to je v rozporu s našimi výsledky, které tuto expresi nepotvrdily. V naší studii jsme pozorovali pozitivní expresi také ve slezině, ale tento výsledek jsme nemohli porovnat se studií (Lodhi et al. 2012), protože slezina nebyla součástí testovaných vzorků. Lodhi et al. (2012) detekovali pozitivní expresi také v hnědé tukové tkáni a bílé tukové tkáni. Rozdílnost mezi námi zjištěnými výsledky a Lodhi et al. (2012) mohou být způsobeny tím, že nebyly testovány lidské tkáně, ale tkáně získané z myší.

Expresse lidského enzymu DHRS7C na úrovni mRNA byla stanovena prozatím pouze v naší studii. Nejsilnější expresi jsme pozorovali v kosterním svalu a něco slabší exprese byla zaznamenána také v srdci. Námi naměřené výsledky jsme porovnávali s dalšími dvěma studii (Arai et al. 2017, Lu et al. 2012), kdy pro stanovení množství DHRS7C nebyly použity lidské tkáně, ale tkáně a orgány získané z myší. V případě

Arai et al. (2017) a Lu et al. (2012) byla použita také jiná metoda pro vyhodnocení získaných výsledků a to metoda relativní kvantifikace, kdy byla exprese DHRS7C enzymu vztažena k expresi referenčních genů, a to v případě Arai et al. (2017) byla exprese vztažena k expresi 18S RNA a v případě Lu et al. (2012) byla exprese vztažena k expresi GAPDH. V našem případě jsme použili metodu absolutní kvantifikace. Stejně jako Lu et al. (2012) a Arai et al. (2017) jsme zjistili, že nejsilnější exprese na úrovni mRNA byla detekována v kosterním svalu a za ním následovala o něco slabší exprese v srdečním svalu, kdy v případě Lu et al. (2012) byla exprese v srdečním svalu skoro srovnatelná s expresí v kosterním svalu, v případě Arai et al. (2017) byla exprese v srdci výrazně slabší a v našem případě byla rozdílnost v expresi nejsilnější a jen v případě člověka č. 8 byla exprese téměř srovnatelná. Ve studii Lu et al. (2012) byla také zaznamenána slabší exprese v kůži, ale to je v rozporu se studií Arai et al. (2017), kde hladina exprese v kůži velice slabá. Bohužel tento výsledek nebyl porovnán s naší studií, protože vzorky kůže nebyly součástí našich studovaných vzorků. V játrech, ledvinách, mozku, nadledvinách, slezině, tenkém střevu, tlustém střevu, tuku podkožní, tuku viscerální, varlatech a žaludku jsme detekovali pouze nízkou hladinu exprese DHRS7C a to souhlasilo s výsledky Arai et al. (2017), Lu et al. (2012). Velice slabou expresi jsme také naměřili v děloze, prostatě, sítnici, slinivce, štítné žláze a vaječnících.

Rozdílnost v porovnání hladiny exprese mezi naší studií a ostatními dvěma studii (Arai et al. 2017, Lu et al. 2012) může být způsobena použitím dvou různých metod kvantifikace, stejně jako rozdílnost v naměření hladiny exprese mezi Arai et al. (2017) a Lu et al. (2012) může být způsobena použitím dvou různých referenčních genů. Obecně je absolutní kvantifikace považována za mnohem vhodnější metodu při stanovení mRNA v různých tkáních, protože nám udává přesné množství mRNA ve vzorcích, které je vypočítané z kalibrační závislosti standardů. Zatímco relativní kvantifikace nám udává výsledek jako poměr exprese sledovaného genu vůči expresi referenčního genu (Schmittgen a Livak 2008). Referenční geny, jako GAPDH a 18S RNA, disponují rozdílnou expresí mRNA v různých tkáních, a proto tento způsob kvantifikace není tolik vhodný pro porovnání exprese mRNA v různých tkáních, jako absolutní kvantifikace. Rozdílné hladiny naměřených expresí v srdečním svalu mohou být také způsobeny mezidruhovými rozdíly, kdy se naše výsledky naměřené v lidských tkání mohou lišit v porovnání s výsledky Arai et al. (2017) a Lu et al. (2012) stanovovanými v myších tkání.

Kromě stanovení množství mRNA, se naše studie zabývala stanovením přítomnosti DHRS7C v lidských tkáních, podobně jako studie (Arai et al. 2017, Lu et al. 2012 a Treves et al. 2012), které se také zabývali také přítomnosti DHRS7C enzymu ve tkáních získaných z myši. Stejně jako všechny tři uvedené, tak i my jsme ke stanovení DHRS7C používali metodu Western blotting. Stejně jako Arai et al. (2017), Lu et al. (2012), Treves et al. (2012) jsme detekovali expresi DHRS7C v kosterním svalu. Rozdílnost v expresi byla zaznamenána u srdečního svalu, kdy stejně jako naše studie, tak Arai et al. (2017), Lu et al. (2012) jsme zaznamenali pozitivní výsledek a pouze studie (Treves et al. 2012) měla výsledek negativní. Lu et al. (2012) pozorovali také expresi v kůži, kterou nemůžeme porovnávat s naší studií ani s Treves et al. (2012), protože vzorky kůže nebyly součástí testovaných vzorků. Tento výsledek byl ale v rozporu s Arai et al. (2017), kde exprese v kůži nebyla pozorována. V naší studii jsme detekovali také expresi ve štítné žláze, ve které nebyla doposud exprese DHRS7C testována. V ostatních dostupných tkáních (tlusté střevo, tenké střevo, slezina, plíce, játra, ledviny, mozek, nadledvina, varlata, žaludek) jsme expresi nezaznamenali stejně jako Arai et al. (2017), Lu et al. (2012) a Treves et al. (2012) a velmi slabou expresi jsme také pozorovali ve slinivce a prostatě. Ve studii (Lu et al. 2012) byla také pozorována snížená exprese DHRS7C enzymu v lidských srdcích u pacientů trpících kardiomyopatií a ischemickou chorobou srdeční v porovnání s kontrolní skupinou pacientů, což by mohlo naznačovat určitou roli tohoto enzymu při rozvoji onemocnění srdce.

Jak bylo naznačeno, studium exprese enzymů DHRS7B a DHRS7C, byla prozatím omezena na myší tkáň, s výjimkou studie (Lu et al. 2012), která zkoumala změnu exprese DHRS7C v lidských srdcích. Naše poznatky, které ověřily nebo vyvrátily uvedené studie a také uvedly úplně nové výsledky, by mohly pomoci s budoucím výzkumem a objasněním tkáňové exprese obou enzymů.

7 Závěr

Prvním dílčím cílem této práce bylo izolovat mRNA ze vzorků lidských tkání. Izolace proběhla úspěšně ze všech dostupných tkání člověka č. 6 - 9. Ostatní tkáně byly izolovány před začátkem studie, vyjma vzorků člověka č. 4, které se nestanovovaly. Následně se nám podařilo ze všech izolovaných tkání odstranit zbytky genomové DNA a vzorky byly úspěšně přepsány do cDNA pomocí reverzní transkripce. Dalším dílčím cílem této práce byla stanovit u všech vzorků integritu cDNA pomocí metody 3': 5' assay. U některých vzorků bohužel došlo k degradaci RNA, a proto byly tyto vzorky vynechány ze studie.

Hlavním cílem této práce bylo stanovit expresi DHRS7B a DHRS7C na úrovni mRNA i na úrovni proteinu. K stanovení exprese na úrovni mRNA jsme použili metodu RT-qPCR s fluorescenční detekcí pomocí SYBR GREEN I. Podařilo se nám úspěšně vyhodnotit mRNA u všech dostupných tkání, u kterých byla splněna kritéria pro ověření integrity cDNA. V případě enzymu DHRS7B jsme stanovovali množství mRNA u člověka č. 1 - 3 a člověka č. 5 - 9, u enzymu DHRS7C jsme vyhodnocovali množství mRNA pouze u člověka č. 6 - 9. Přítomnost enzymů DHRS7B a DHRS7C v lidských tkáních jsme detekovali pomocí metody Western blotting s chemiluminiscenční detekcí. Bohužel tato metodika se potýkala s různými problémy při vyhodnocování, a proto z časových důvodů se nám podařilo vyhodnotit expresi pouze u člověka č. 3.

Nejsilnější expresi mRNA enzymu DHRS7B jsme pozorovali ve varlatech a o něco slabší exprese byla viditelná také v kosterním svalu, ledvinách, mozku, nadledvinách, prostatě, sítnici, štítné žláze a podkožním tuku. V ostatních testovaných tkáních (děloha, játra, slezina, slinivka, srdce, tenké střevo, tlusté střevo, viscerální tuk, vaječníky a žaludek) byla pozorovaná pouze slabá nebo žádná exprese. Přítomnost enzymu DHRS7B na úrovni proteinu byla pozorována pouze v mozku a slinivce, zatímco v ostatních tkáních (ledvina, játra, srdce, plíce, slezina, tenké střevo, tlusté střevo, kosterní sval, nadledvina, varlata, prostata, žaludek, štítná žláza) nebyla exprese detekována.

Expresi mRNA enzymu DHRS7C byla nejsilnější v kosterním svalu a výrazně slabší exprese byla detekována také v srdci. V ostatních tkáních (děloha, játra, ledviny, mozek, nadledvina, prostata, sítnice, slezina, slinivka, štítná žláza, tenké střevo, tlusté střevo, tuk podkožní, tuk viscerální, vaječníky, varlata a žaludek) byla exprese velice

slabá anebo žádná. Na úrovni proteinu byla pozorována detekce v kosterním svalu, srdci a štítné žláze. V ostatních tkáních (tlusté střevo, tenké střevo, slezina, plíce, játra, ledviny, mozek, nadledvina, slinivka, varlata, prostata, žaludek) nebyla exprese viditelná.

Pro charakterizaci a odhad funkce doposud málo studovaných enzymů, jako DHRS7B a DHRS7C, je znalost tkáňové exprese velice důležitá a tyto výsledky by mohly pomoci s rozvojem nových znalostí o těchto enzymech.

8 Seznam zkratek

AA	akrylamid
A	adenin
APS	persíran amonný
Asn	asparagin
ATP	adenosintrifosfát
bis-AA	N,N'-methylenbis(akrylamid)
BSA	hovězí sérový albumin
C	cytosin
Ct	cyklus prahu
DHRS7B	dehydrogenáza/reduktáza rodiny SDR člen 7B
DHRS7C	dehydrogenáza/reduktáza rodiny SDR člen 7C
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dATP	deoxyadenozintrifosfát
dCTP	deoxycytozintrifosfát
dGTP	deoxyguanozintrifosfát
dNTPs	deoxynukleotidy
dTTP	deoxytymidintrifosfát
ESI	ionizace elektrosprejem
FAS	syntáza mastných kyselin
Gly	glycin
G	guanin
GAPDH	glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza
HCl	kyselina chlorovodíková
HCNG	HUGO Gene Nomenclature Committ
PVDF	polyvinyliden fluorid
Lys	lysin
ME	2-merkptoethanol
MALDI	ionizace laserovou desorpcí v přítomnosti matrice
mRNA	mesengerová ribonukleové kyselina
NaCl	chlorid sodný
NAD	nikotinamidadenindinukleotid

NADP	nikotinamidadeninukleotidfosfát
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDB	protein data bank
qPCR	kvantitativní PCR v reálném čase
RT	reverzní transkripce
SDR	nadrodina dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem
SDR32C1	nadrodina dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem rodiny 32C člen 1
SDR32C2	nadrodina dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem rodiny 32C člen 2
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
Ser	serin
Taq	thermus aquaticus
Thr	threonin
T	thymin
Tm	teplota tání
TOF	analyzátor doby letu
TBS	tris buffered salin
TBS-T	tris buffered salin and TWEEN 20
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	tyrosin

9 Seznam použité literatury

- Alberts B. a kol.** (2008) *Molecular biology of the cell*, Garland Science, New York, 1392 stran, 5. vydání. ISBN 978-0-8153-4106-2.
- Arai S., Ikeda M., Ide T., Matsuo Y., Fujino T., Hirano K., Sunagawa K., Tsutsui H.** (2017) Functional loss of DHRS7C induces intracellular Ca²⁺ overload and myotube enlargement in C2C12 cells via calpain activation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 312, 29–39.
- Beck K. R., Kaserer T., Schuster D., Odermatt A.** (2017) Virtual screening applications in short-chain dehydrogenase/reductase research. *J Steroid Biochem Mol Biol*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.03.008>.
- Beránek M.** (2016) *Molekulární genetiky pro bioanalytiky*. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze, Praha, 194 stran, 1. vydání. ISBN 978-80-246-3224-7.
- Boušová I., Skálová L., Souček P., Matoušková P.** (2015) The modulation of carbonyl reductase 1 by polyphenols. *Drug Metab Rev*, 47, 520-533.
- Bhatia C., Oerum S., Bray J., Kavanagh K. L., Shafqat N., Yue W., Oppermann U.** (2015) Towards a systematic analysis of human short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): Ligand identification and structure–activity relationships. *Chem Biol Interact*, 234, 114-125.
- Bray J.E., Marsden B.D., Oppermann U.** (2009) The human short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) superfamily: A bioinformatics summary. *Chem Biol Interact*, 178, 99–109.
- Bustin S.** (2009) *A-Z of Quantitative PCR*. International University Line, 882 stran. ISBN 978-0-9636817-8-2.

Cibíček N., Vacek J. a kol. (2014) Principy a využití analytických metod v laboratorní medicíně. Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, 153 stran, 1. Vydání. ISBN 978-80-244-3951-8.

Dvořák Z., Pascussi J. M., Modrianský M. (2003) Approaches to Messenger RNA Detection – Comparison of Methods. *Biomed Pap*, 147(2), 131-135.

Dvořáková P., Hernychová L., Vojtěšek B. (2014) Analýza proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. *Klin Onkol*, 27, 104-109.

Graves P. R., Timothy A. J. H. (2002) Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66, 39-63.

Keller B., Meiera M., Adamski J. (2009) Comparison of predicted and experimental subcellular localization of two putative rat steroid dehydrogenases from the short-chain dehydrogenase/reductase protein superfamily. *Mol Cell Endocrinol*, 301, 43–46.

Jörnvall H., Landreh M., Östberg L.J. (2015) Alcohol dehydrogenase, SDR and MDR structural stages, present update and altered era. *Chem Biol Interact*, 234, 75-79.

Joshi M., Deshpande J. D. (2011) Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles And Application. *Int J Biomed Res*, 1, 81-97.

Lodhi I. J., Yin L., Jensen-Urstad¹ A. P. L., Funai¹ K., Coleman¹ T., Baird¹ J. H., Ramahi¹ M. K. E., Razani¹ B., Song¹ H., Fu-Hsu¹ F., Turk¹ J., Semenkovich C. F. (2012) Inhibiting Adipose Tissue Lipogenesis Reprograms Thermogenesis and PPAR γ Activation to Decrease Diet-induced Obesity. *Cell Metab*, 16, 189–201.

Lu, B., Tigchellar, W., Ruifrok, W. P., Gilst W. H., de Boer, R. A., Silljé, H. H. (2012) DHRS7C, a novel cardiomyocyte-expressed gene that is down-regulated by adrenergic stimulation and in heart failure. *Eur J Heart Fail*, 14, 5–13.

Mahmood T., Yang P. C. (2012) Western blot: Technique, theory, and trouble shooting, *N Am J Med Sci*, 4(9), 429–434.

Nádvorník R. Kurz Real-time PCR pro začátečníky. Brno, SEQme, 2016.

Němcová L. (2012) Přednášky z reprodukční biologie: Metody studia genové exprese. Laboratoř vývojové biologie. Ústav živočišné fyziologie a genetiky, Akademie věd České republiky.

Nolan T, Hands R. E., Bustin S. A. (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*, 1, 1559-1582.

Oppermann U. (2009) The SDR (Short-Chain Dehydrogenase/Reductase and Related) nomenclature initiative. *Chem Biol Interact*, 178, 94-98.

Persson B., Kallberg Y. (2013) Classification and nomenclature of the superfamily of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact*, 202, 111–115.

Persson B, Kallberg Y., Bray J.E., Bruford E., Dellaporta S.L., Favia A.D., Duarte R.G., Jörnvall H., Kavanagh K.L., Kedishvili N., Kisiela M., Maser E., Mindnich R., Orchard S., Penning T.M., Thornton J.M., Adamski J., Oppermann U. (2009) The SDR (Short-Chain Dehydrogenase/Reductase and Related) nomenclature initiative. *Chem Biol Interact*, 178, 94-98.

Pfaffl M.W., Hageleit M. (2001) Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett*, 23, 275-282.

Schmittgen T. D., Livak K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C-T method. *Nat Protoc* 3: 1101-1108.

Schroeder A., Mueller O., Stocker S., Salowsky R., Leiber M., Gassmann M., Lightfoot S., Menzel W., Granzow M., Ragg T. (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 7, 3.

Srbová E. (2013) Kvantifikace proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. Diplomová práce. Ústav biochemie. Přírodovědecká fakulta v Brně. Masarykova univerzita v Brně. Brno, 67 stran.

Šimůnek T. Přednášky z molekulární biologie: Separační a amplifikační metody v molekulární biologii, Základní přehled metod pro analýzu proteinů. Univerzita Karlova v Praze. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra biochemických věd. Akademický rok 2015/2016.

Škarydová, L., Wsól, V. (2012) Human microsomal carbonyl reducing enzymes in the metabolism of xenobiotics: well-known and promising members of the SDR superfamily. *Drug Metab Rev*, 44, 173–191.

Šmarda J., Došar J., Pantůček J., Růžičková V., Koptíková J. (2005) Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita v Brně, 1. vydání, Brno, 194 s. 1. vydání. ISBN 80-210-3841-1.

Šmehilová M. Přednášky z molekulární biologie: Principy a využití qPCR. Univerzita Palackého v Olomouci, Katedra biochemických věd, 2011.

Štambergová, H. (2013) Lidské membránově vázané karbonylreduktasy. Disertační práce. Katedra biochemických věd. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Univerzita Karlova v Praze. Hradec Králové, 120 stran.

Štambergová H., Škarydová L., Dunford J.E., Wsól V (2014) Biochemical properties of human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7. *Chem Biol Interact*, 207, 52–57.

Štambergová, H., Zemanová, L., Lundová, T., Malčková, B., Skarka, A., Šafr, M., Wsól, V. (2016) Human DHRS7, promising enzyme in metabolism of steroids and retinoids? *J Steroid Biochem Mol Biol*, 155, 112–119.

Treves S., Thurnheer R., Mosca B., Vuvkevic M., Bergamelli L., Voltan R., Oberhauser V., Ronjat M., Csernoch L., Szentesi P., Zorzato F. (2012) SRP-35, a newly identified protein of the skeletal muscle sarcoplasmic reticulum, is a retinol dehydrogenase. *Biochem J*, 441, 731–741.

Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3406-3415.

10 Internetové zdroje

Internet 1. *SDR - SDR (short-chain dehydrogenases/reductases)*. Online [cit. 2017-01-06]. Dostupné z: <<http://www.sdr-enzymes.org/>>

Internet 2. *Uniprot Knowledgebase - UniProtKB - Q6IAN0 (DRS7B_HUMAN)*. Online [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <<http://www.uniprot.org/uniprot/Q6IAN0>>

Internet 3. *Gene Cards -DHRS7B Gene (Protein Coding)*. Online [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DHRS7B>>

Internet 4. *Uniprot Knowledgebase - UniProtKB - A6NNS2 (DRS7C_HUMAN)*. Online [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <<http://www.uniprot.org/uniprot/A6NNS2>>

Internet 5. *Gene Cards - DHRS7C Gene (Protein Coding)*. Online [cit. 2017-02-20]. Dostupné z: <<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=DHRS7C&keywords=dhrs7c>>

Internet 6. *Lab guide-PCR*. Online [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: <<http://labguide.cz/metody/pcr/>>

Internet 7. *Homepage of Andy Vierstraete - Principle of the PCR*. Online [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: <<https://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>>

Internet 8. *Lab guide – Real-time PCR*. Online [cit. 2017-03-15]. Dostupné z: <<http://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>>

Internet 9. *Informační systém Masarykovy univerzity-Metody studia diverzity založené na extrakci nukleových kyselin*. Online [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps2014/mikrob_spol/web/pages/03-extrakce-kyselin.html/>

Internet 10. *Molecular Biology Web Book - Gel Electrophoresis*. Online [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch9C.htm>>

Internet 11. *Lab guide - Elektroforetická separace nukleových kyselin*. Online [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <<http://labguide.cz/metody/elektroforeticka-separace-nukleovych-kyselin/>>

Internet 12. *Molecular Biology Web Book - Blotting Methods and Applications*. Online [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch9D.htm>>

Internet 13. *Bio-Rad-Protein Blotting Guide*. Online [cit. 2017-03-23]. Dostupné z: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_2895.pdf>

Internet 14. *Lab guide - Western blot*. Online [cit. 2017-03-25]. Dostupné z: <<http://labguide.cz/metody/western-blot/>>

Internet 15. *Merck Millipore - Western Blot Protocols*. Online [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <<https://www.merckmillipore.com/CZ/cs/life-science-research/protein-detection-quantification/westernblotting/protocols/q9ib.qB.710AAAFBRP0RRkww.nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.cz%2F&bd=1>>

Internet 16. *Primer-Blast*. Online [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>>

Internet 17. *The mfold Web Server*. Online [cit. 2017-03-03]. Dostupné z: <<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>>

Internet 18. *Cell Biology and Biochemistry - Western blot*. Online [cit. 2017-01-25]. Dostupné z: <<http://www.radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Western.html>>

Internet 19. *Aktuální genetika - Úvod do proteomiky*. Online [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <<http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/proteomika.htm>>

11 Přílohy

Příloha 1: *Expres mRNA DHRS7B v lidských tkáních u člověka 1 - 3 a 5 (muži). Výsledek udán jako průměr ze tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka.*

tkáň	člověk 1 počet kopií DHRS7B/ng celkové RNA	člověk 2 počet kopií DHRS7B/ng celkové RNA	člověk 3 počet kopií DHRS7B /ng celkové RNA	člověk 5 počet kopií DHRS7B /ng celkové RNA
játra	115,27 ± 6,79	*	39,75 ± 1,33	73,96 ± 1,11
ledviny	569,04 ± 1,78	109,24 ± 0,04	61,35 ± 4,77	191,36 ± 2,98
mozek	123,76 ± 8,52	*	183,07 ± 14,00	645,63 ± 23,26
nadledvina	*	45,01 ± 3,08	66,86 ± 3,61	434,36 ± 10,96
plíce	-	*	-	-
prostata	149,77 ± 9,04	-	-	*
sítnice	-	341,30 ± 15,41	*	-
slezina	*	*	8,98 ± 1,34	6,13 ± 0,16
slinivka	*	-	0,14 ± 0,01	-
srdce	*	*	3,61 ± 0,73	*
štítná žláza	-	*	389,27 ± 14,24	750,30 ± 8,21
tenké střevo	*	-	-	-
tlusté střevo	-	5,24 ± 0,77	-	-
varlata	313,75 ± 12,79	1 913,85 ± 22,64	2 086,45 ± 1,24	2 162,45 ± 21,78
žaludek	*	5,27 ± 2,23	-	62,46 ± 3,43

- vzorky tkání, které nebyly podrobeny kvantitativnímu stanovení, protože podle metody 5' : 3' assay nesplňovaly požadovanou kvalitu

* vzorky tkání, které nebyly v době měření dostupné

Příloha 2: Exprese mRNA DHR57B v lidských tkáních u člověka 6, 7 a 9 (muži). Výsledek udán jako průměr ze tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka.

tkáň	člověk 6 počet kopií DHR57B/ ng celkové RNA	člověk 7 počet kopií DHR57B/ ng celkové RNA	Člověk 9 počet kopií DHR57B/ ng celkové RNA
játra	30,54 ± 13,44	17,26 ± 1,26	4,91 ± 1,48
kosterní sval	212,16 ± 70,31	450,97 ± 92,36	403,99 ± 28,25
ledviny	-	-	4,91 ± 0,69
mozek	53,74 ± 20,74	59,38 ± 16,97	86,31 ± 7,80
nadledvina	35,10 ± 15,99	-	-
plíce	-	-	-
prostata	2,80 ± 1,55	-	-
sítnice	-	-	-
slezina	0,34 ± 0,23	-	3,78 ± 1,08
slinivka	-	1,56 ± 0,38	0,15 ± 0,08
srdce	2,81 ± 0,71	7,02 ± 1,18	48,48 ± 28,37
štítná žláza	304,56 ± 113,99	130,49 ± 12,38	-
tenké střevo	-	2,98 ± 0,98	0,32 ± 0,08
tlusté střevo	-	-	1,44 ± 0,80
tuk podkožní	0,08 ± 0,04	-	255,05 ± 86,79
tuk viscerální	1,22 ± 0,73	-	-
varlata	97,47 ± 24,60	-	-
žaludek	-	-	0,91 ± 0,43

- vzorky tkání, které nebyly podrobeny kvantitativnímu stanovení, protože podle metody 5' : 3' assay a metody založené na RIN hodnotě nesplňovaly požadovanou kvalitu

Příloha 3: *Expres mRNA DHRS7B v lidských tkáních u člověka č. 8 (žena). Výsledek udán jako průměr ze tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka.*

tkáň	člověk 8 počet kopií DHRS7B/ ng celkové RNA
děloha	28,88 ± 10,94
játra	15,99 ± 6,04
kosterní sval	2,93 ± 1,35
ledviny	83,46 ± 33,91
mléčná žláza	-
mozek	157,25 ± 60,31
nadledvina	26,71 ± 6,48
plíce	-
prostata	-
sítnice	11,55 ± 4,26
slezina	9,05 ± 4,02
slinivka	-
srdce	16,90 ± 0,90
štítná žláza	170,29 ± 48,90
tenké střevo	-
tlusté střevo	-
tuk podkožní	-
tuk viscerální	-
vaječníky	47,10 ± 19,42
žaludek	-

Příloha 4: *Expres mRNA DHRS7C v lidských tkáních u člověka č. 6, 7 a 9 (muži). Výsledek udán jako průměr ze tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka.*

tkáň	člověk 6 počet kopií DHRS7C/ ng celkové RNA	člověk 7 počet kopií DHRS7C/ ng celkové RNA	člověk 9 počet kopií DHRS7C/ ng celkové RNA
játra	0,57 ± 0,16	0,56 ± 0,05	0,42 ± 0,16
kosterní sval	3652,22 ± 154,89	2575,16 ± 48,19	4709,98 ± 354,08
ledviny	-	-	-
mozek	1,09 ± 0,22	0,94 ± 0,15	0,48 ± 0,32
nadledvina	1,38 ± 1,24	-	-
prostata	0,04 ± 0,02	-	-
sítnice	-	-	-
slezina	1,99 ± 2,52	-	0,25 ± 0,13
slinivka	-	0,40 ± 0,10	0,04 ± 0,02
srdce	15,57 ± 1,24	17,89 ± 0,85	68,08 ± 1,31
štítná žláza	0,13 ± 0,10	0,54 ± 0,56	-
tenké střevo	-	0,46 ± 0,14	0,13 ± 0,05
tlusté střevo	-	-	0,05 ± 0,05
tuk viscerální	0,10 ± 0,02	-	-
tuk podkožní	0,09 ± 0,02	-	0,86 ± 0,15
varlata	4,21 ± 0,40	-	-
žaludek	-	-	0,74 ± 0,05

- vzorky tkání, které nebyly podrobeny kvantitativnímu stanovení, protože podle metody 5' : 3' assay a metody založené na RIN hodnotě nesplňovaly požadovanou kvalitu

Příloha 5: Exprese mRNA DHR57B v lidských tkáních u člověka č. 8 (žena). Výsledek udán jako průměr ze tří nezávislých měření ± směrodatná odchylka.

tkáň	člověk 8 počet kopií DHR57C/ ng celkové RNA
děloha	0,54 ± 0,19
játra	0,70 ± 0,21
kosterní sval	66,94 ± 6,09
ledviny	0,21 ± 0,01
mozek	3,90 ± 0,89
nadledvina	0,91 ± 0,20
sítnice	0,27 ± 0,22
slezina	0,26 ± 0,19
slinivka	-
srdce	42,23 ± 0,76
štítná žláza	0,64 ± 0,31
tenké střevo	-
tlusté střevo	-
tuk viscerální	-
tuk podkožní	-
vaječníky	0,40 ± 0,19
žaludek	-

- vzorky tkání, které nebyly podrobeny kvantitativnímu stanovení, protože podle metody 5' : 3' assay a metody založené na RIN hodnotě nespĺňovaly požadovanou kvalitu