



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Genetický vliv na množství parazitů v orgánech myši po infekci
*Leishmania major***

**Genetic influence on parasite load in mouse organs after *Leishmania
major* infection**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: doc. Marie Lipoldová, CSc.

Konzultant práce: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.

Kateřina Průšová

Kladno, květen 2018

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Akademický rok: 2017/2018

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Kateřina Průšová**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Genetický vliv na množství parazitů v orgánech myši po infekci Leishmania major**
Téma anglicky: Genetic Influence on Parasite Load in Mouse Organs after Leishmania Major Infection

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Předmětem bakalářské práce bude zmapování genů, které ovlivňují množství parazitů v orgánech myši po infekci parazitem *Leishmania major*.

V obecné části práce budou probírána témata, která úzce souvisejí s touto problematikou. Probíraná témata budou: způsoby detekce množství patogenního mikroorganismu

v organismu hostitele na modelu infekce parazitem *L. major*; a mapování a identifikace genů určujících vnímavost k onemocnění na modelu genetické kontroly vnímavosti k parazitu *L. major*.

Praktická část práce bude pojednávat o zvládnutí metod izolace DNA a RNA, DNA typizace, PCR, testu PCR-ELISA, elektroforézy, statistických metod analýzy a dalších. S pomocí těchto metod určí studentka kontrolu množství parazitů v orgánech myši infikovaných *L. major*. Zvládne statistické metody určení vazby, analýzu genetických sekvencí s cílem nalezení polymorfismů a kandidátních genů a jejich validace.

Seznam odborné literatury:

- [1] LIPOLDOVÁ, Marie a Peter DEMANT, Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis, *Nature Reviews Genetics*, číslo 7(4), 2016, 294-305 s., ISSN 1471 - 0056
[2] KOBETS, T., BADALOVÁ, J., GREKOV, I., HAVELKOVÁ, H., SVOBODOVÁ, M., LIPOLDOVÁ M., *Leishmania* parasite detection and quantification using PCR-ELISA, *Nat Protoc*, číslo 5(6), 2010, 1074-1080 s., ISSN 1754-2189
[3] HAVELKOVÁ, H., BADALOVÁ, J., SVOBODOVÁ, M., VOJTÍŠKOVÁ, J., KUREY, I., VLADIMIROV, V., DEMANT, P., LIPOLDOVÁ M., Genetics of susceptibility to leishmaniasis in mice: four novel loci and functional heterogeneity of gene effects, *Genes Immun*, číslo 7(3), 2006, 220-233 s., ISSN 1466-4879

Zadání platné do: 13.09.2019

Vedoucí: doc. Marie Lipoldová, CSc.

Konzultant: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.

.....
vedoucí katedry / pracoviště

.....
děkan

V Kladně dne 25.10.2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Genetický vliv na množství parazitů v orgánech myši po infekci *Leishmania major* vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 18.05.2018

.....
Kateřina Průšová

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala paní docentce Marii Lipoldové, CSc. za odborné vedení mé práce a také za možnost vypracování praktické části bakalářské práce v laboratoři Oddělení molekulární a buněčné imunologie ÚMG AV ČR. Také bych velmi ráda poděkovala paní RNDr. Taťáně Jarošíkové, CSc. za její rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům ze skupiny Laboratoře buněčné a molekulární imunologie za jejich cenné rady, poskytnuté informace a také za jejich podporu během mého působení v jejich skupině.

V neposlední řadě patří dík celé mé rodině za jejich podporu nejen při vypracovávání bakalářské práce, ale během celého studia.

Práce byla vypracována s grantovou podporou GAČR 16-22346S.

Abstrakt

Práce se zaměřuje na metody molekulární biologie a jejich využití během výzkumu infekce prvoky rodu *Leishmania*. Tito protozoální parazité způsobují infekční nemoc zvanou leishmanióza. Podle projevu onemocnění rozlišujeme leishmaniózu viscerální, kožní a kožně-slizniční. Vzhledem ke stále narůstajícímu počtu nakažených je snaha pochopit patofyziologii tohoto onemocnění aktuální.

Teoretická část se zabývá infekčním onemocněním vyvolaným leishmaniemi a jeho podobami, pozornost je také věnována životnímu cyklu *L. major* a způsobu nákazy tímto prvokem. Práce je především zaměřena na vliv genů při rozvoji infekce *L. major* a také na genetický vliv na výsledný fenotypový projev, v teoretické části jsou zmíněny způsoby mapování těchto kandidátních genů. Vnímavost nejen k infekčním onemocněním je řízena několika geny, které zodpovídají za odlišný průběh onemocnění u jedinců téhož druhu. K mapování těchto genů je vhodné využití modelových organismů, které mají přesně definovaný genom a které také umožňují cílené křížení. Pro naši studii jsme zvolili model myši.

Cíleným křížením je možné připravit myší kmeny vhodné k experimentálnímu použití. Jedná se například o inbrední myší kmeny, které jsou geneticky identické a homozygotní v celém rozsahu, nebo kmeny rekombinantní kongenní. Série rekombinantních kongenních kmenů vzniká křížením inbredních kmenů, kdy je genom dárcovského kmene rozdělen mezi 20 rekombinantních kongenních kmenů. Každý kmen tak nese různý a náhodný soubor 12,5 % genů kmene dárcovského na pozadí 87,5 % genů kmene základního.

Mimo v teoretické části zmíněných metod lokalizace genů je mapování genů věnována také praktická část, ve které je provedena vazebná analýza pomocí statistických metod. Během mapování kandidátních genů byly použity myši F2 generace vzniklé křížením vnímavého inbredního kmene BALB/c a rekombinantního kongenního kmene CcS-11. Po statistickém zpracování vazebné

analýzy se potvrdil vliv lokusu *Lmr5* na množství parazitů ve slezině a vliv lokusu *Lmr20* na množství parazitů v lymfatických uzlinách myši po infekci *L. major*.

Klíčová slova

Leishmania; leishmanióza; modelový organismus; genetické mapování;
kandidátní gen

Abstract

The work focuses on methods of molecular biology and their application in the course of *Leishmania* protozoa infection research. These protozoal parasites cause infectious disease called leishmaniasis. Depending on the manifestation of the disease, we identify visceral, cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Due to the growing number of infected, the effort to understand the pathophysiology of this disease is relevant and topical.

The theoretical part deals with infectious disease caused by leishmania and its forms, attention is also paid to the life cycle of *L. major* and to the way of infection by this protozoan. The work is focused mainly on influence of genes on development of *L. major* and also on genetic influence on the resulting phenotypic manifestation. In the theoretical part, the ways of mapping these candidate genes are mentioned. Sensitivity not merely to infectious disease is controlled by several genes that are responsible for the different course of disease in individuals of the same species. To map these genes, it is appropriate to utilize model organisms that hold a precisely defined genome and which also allow targeted crossbreeding. For our study, we chose the mouse model.

By method of systematic and deliberate crossbreeding, mouse strains suitable for experimental use can be prepared. These are, for instance, inbred mouse strains that are genetically identical and homozygous in their entirety, or recombinant congenic strains. A series of recombinant congenic strains originates from the crossbreeding of inbred strains, while the genome of the donor strain is divided between 20 recombinant congenic strains. Each strain thus carries a different and random set of 12,5 % of the donor strain genes in the background of 87,5 % of the base strain genes.

In addition to the theoretical part of the methods of gene localization, also practical part is devoted to gene mapping. There is binding analysis performed

using statistical methods. During the mapping of the candidate genes, F2 generation mice originating from crossbreeding of the susceptible inbred strain BALB/c and the recombinant congenic strain CcS-11 were used. After statistical processing of the binding analysis, effect of the *Lmr5* locus on the amount of parasites in the spleen of the examined mice and the effect of the *Lmr20* locus on the amount of parasites in the lymph nodes of the monitored mice after *L. major* infection were proved and confirmed.

Keywords

Leishmania; leishmaniasis; model organism; genetic mapping; candidate gene

Obsah

1	Úvod	11
2	Současný stav	13
2.1	<i>Leishmania</i>	13
2.1.1	Leishmaniózy Nového světa	13
2.1.2	Leishmaniózy Starého světa	15
2.2	<i>Leishmania major</i>	16
2.2.1	Životní cyklus <i>Leishmania major</i>	16
2.3	Myš jako modelový organismus	18
2.3.1	Inbrední kmeny	20
2.3.2	Rekombinantní kongenní kmeny	20
2.4	Mapování genů	21
2.4.1	Metoda kandidátních genů.....	23
2.4.1.1	Mapování QTL.....	25
2.4.1.2	Vazebná analýza QTL	26
2.4.1.3	QTL analýza	27
2.5	Detekce množství patogenů v organismu hostitele	28
2.5.1	ELISA	28
2.5.2	PCR-ELISA	30
2.6	Metody použité k určení kontroly množství parazitů v orgánech myší infikovaných <i>L. major</i>	31
2.6.1	Izolace nukleových kyselin.....	31
2.6.2	Měření koncentrace a čistoty izolované DNA	34
2.6.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	35

2.6.4	Restrikční endonukleázy	36
2.6.5	Elektroforéza nukleových kyselin	37
3	Cíl práce.....	39
4	Metodika	40
4.1	Izolace DNA proteinázou K.....	40
4.2	Izolace RNA.....	41
4.3	Stanovení integrity nukleových kyselin.....	42
4.4	PCR reakce.....	42
4.5	Restrikční štěpení.....	44
4.6	Elektroforéza na agarózovém gelu	44
4.7	PCR-ELISA	45
4.8	DNA typizace.....	47
4.9	Statistická analýza	48
5	Výsledky.....	49
5.1	Výsledky kvantifikace množství parazitů v orgánech základních myších kmenů po infekci <i>L. major</i>	51
5.2	Výsledky mapování genů kontrolující množství parazitů v orgánech myši po infekci <i>L. major</i>	54
6	Diskuze.....	59
7	Závěr.....	65
8	Seznam použitých zkratk.....	66
9	Seznam použité literatury.....	68
10	Seznam použitých obrázků	74
11	Seznam použitých tabulek.....	75

1 ÚVOD

Prvoci rodu *Leishmania*, v České republice označováni jako ničivky, jsou původci infekčního onemocnění leishmaniózy. I když je pro leishmanie typický výskyt především na území tropického a subtropického pásma, je otázka výzkumu těchto původců infekčního onemocnění aktuální i v našich zeměpisných podmínkách. Výskyt parazitů není totiž omezen pouze na exotická území, ale můžeme se s nimi setkat také na jihu Evropy v zemích jako jsou Španělsko, Francie či Chorvatsko.

I přes tento celosvětový výskyt nejsou lidé o parazitech rodu *Leishmania* a jimi působeného onemocnění příliš informovaní. Rozvinutá forma viscerální infekce kala-azar je přitom druhá nejsmrtelnější parazitická choroba světa, v případech neléčené viscerální formy dochází ve více než 95 % k úmrtí jedince (1).

Důraz na výzkum leishmanióz je kladen také vzhledem k faktu, že prozatím neexistuje žádná účinná vakcína, která by zabránila vzniku infekce. Je tedy třeba porozumět nejen fenotypovým projevům infekce, ale také mechanismu působení parazitů na hostitelský organismus. Citlivost či odolnost vůči infekci parazity rodu *Leishmania* je ovlivňována genetickými faktory. Otázkou genetického vlivu na množství parazitů v orgánech modelového organismu jsme se zabývali během naší práce.

Pro studium genetické kontroly na množství parazitů po infekci leishmanií byly zvoleny myší modelové organismy. Použití myšího modelu ve výzkumech bylo umožněno především po osekvenování a prostudování myšího genomu. Na základě těchto výzkumů bylo zjištěno, že myší geny vykazují k lidskému genomu 99% homologii. Díky tomu je možné studovat působení některých genů při vzniku lidských onemocnění a také experimentální testování některých účinků genů na myších modelových organismech.

Znalost genomu a množství cíleného křížení umožňují vytvoření geneticky shodných a definovaných inbredních kmenů. Od nich je dále možné odvození kmenů kongenních či rekombinantních kongenních. Rekombinantní kongenní kmeny jsou pak výborným nástrojem k odhalení kauzálních genů. Vznikají křížením dvou inbredních kmenů, kmene základního a kmene dárcovského. Genom dárcovského kmene je rozdělen mezi 20 rekombinantních kongenních kmenů tak, že každý z nich nese různý a náhodný soubor 12,5 % genů tohoto kmene na pozadí 87,5 % genů kmene základního.

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 *Leishmania*

Leishmania je protozoální parazit třídy *Kinetoplastida*, čeledi *Trypanosomatidae*, který infikuje mononukleární fagocyty obratlovců a způsobuje nemoc zvanou leishmanióza (2).

Touto nemocí je v současnosti nakaženo asi 12 miliónu lidí po celém světě a toto číslo stále narůstá – každoročně přibudou zhruba 2 milióny nových případů nákazy. Několik stovek miliónů na 5 kontinentech světa je k tomu neustále ohroženo potenciální infekcí leishmaniemi. Jako endemické se označují pouze země, ve kterých se vyskytují parazité způsobující onemocnění lidí. Z tohoto důvodu není Austrálie zahrnována mezi endemické oblasti, i když zde došlo ke kutánní infekci červených klokanů způsobené nově popsáním druhem leishmanií (2; 3).

Podle endemického výskytu můžeme leishmaniózy, infekce způsobené parazity *Leishmania*, dělit na leishmaniózy Starého světa a leishmaniózy Nového světa. Dalším možným dělením leishmanióz je forma onemocnění, kterou prvoci způsobují a které nese jméno podle orgánu napadeného parazity: kožní, viscerální, kožně-slizniční leishmanióza (4).

2.1.1 Leishmaniózy Nového světa

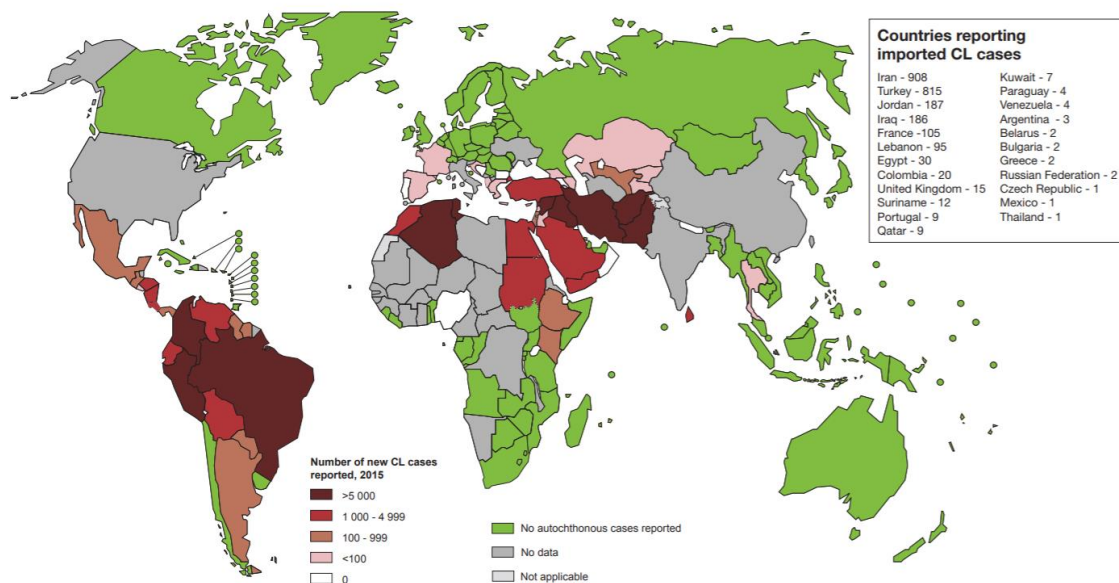
Neotropické leishmaniózy využívají jako rezervoár lesní hlodavce či jiné savce tropického pásma. Vyskytují se ve třech formách - ve formě kožní, kožně-slizniční a viscerální (4).

Kožní infekci, jejíž původce představuje 12 ze 14 amerických druhů leishmanií, způsobuje ve Venezuele a Dominikánské republice *L. braziliensis*. Dalšími zástupci neotropických leishmanií jsou ku příkladu *L. mexicana*, již působené většinou

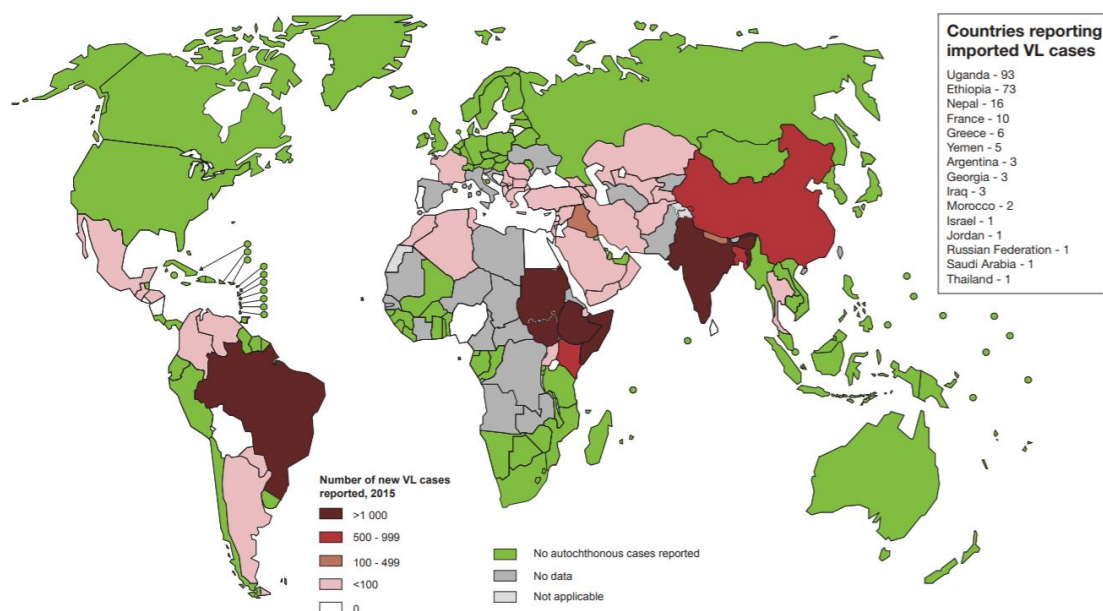
nekomplikované léze se spontánně hojí, *L. amazonensis* nebo *L. panamensis*. Jelikož kožní postižení zpravidla nebolí, vyhledávají nemocní lékařskou pomoc pozdě (4).

Kožně-slizniční onemocnění můžeme prokázat od Nikaraguy po Brazílii a ve většině případů ji způsobuje *L. braziliensis*. V souvislosti s infekcí *L. braziliensis* je i chronické destruktivní onemocnění, kdy může dojít až k totální destrukci chrupavky nosní přepážky (4).

L. Chagasova, tedy *L. chagasi*, vyskytující se v severovýchodní Brazílii, je odpovědná za viscerální leishmaniózy. Běžnými příznaky onemocnění jsou horečka, hubnutí a slabost. Během infekce dochází k akumulaci makrofágů v napadených orgánech a k sekundární hyperplazii buněk, která se dále projeví jako splenomegalie či hepatomegalie (4).



Obrázek 1: Světový výskyt kožní leishmaniózy z roku 2015 (5)



Obrázek 2: Světový výskyt viscerální leishmaniózy z roku 2015 (5)

2.1.2 Leishmaniózy Starého světa

V zemích takzvaného Starého světa se setkáváme se dvěma formami onemocnění: leishmaniózou viscerální a leishmaniózou kutánní neboli kožní (6).

Viscerální leishmanióza, v některých zemích též nazývaná kala-azar („černá nemoc“), je v zemích Starého světa nejčastěji spojována s původci *L. donovani* a *L. infantum*. Viscerální forma onemocnění obvykle začíná bez jakéhokoliv viditelného poškození kůže. Příznaky jsou pouze nespecifické a zahrnují například nepravidelnou vysokou horečku, kašel, ztrátu hmotnosti či anémii (6).

Klasická forma kala-azaru, tedy rozvinutá forma viscerální leishmaniózy, je nejtěžší formou tohoto onemocnění a druhá nejsmrtelnější parazitická choroba světa. Infekce vyžaduje včasnou léčbu, jinak obvykle končí smrtí. Viscerální leishmaniózy často přerůstají v epidemie, obzvláště v oblastech rozvojových zemí, kde lidé trpí podvýživou a oslabenou imunitou (7).

Kožní infekce jsou nejčastěji spojeny s druhy *L. major* a *L. tropica*. Při nákaze těmito protozoi dochází k vytvoření kožního vředu či k jinému poškození pokožky

bez doprovodu horečky. V některých neobvyklých případech, především u osob s poruchou imunitního systému, se infekce *L. major* a *L. tropica* mohou vyvinout do difuzní kožní leishmaniózy (6). Infekce *L. tropica* může rovněž napadat orgány a způsobovat systémová onemocnění (8).

Během difuzní kožní leishmaniózy dochází ke vzniku uzlovitých a plakových lézí roztroušených nejprve po obličeji, později se ale léze objevují na různých částech kůže s výjimkou dlaní, plosek nohou a kštice (4). Bližší specifikaci *Leishmania major* je věnována následující kapitola.

2.2 *Leishmania major*

Leishmania major je nejvýznamnějším zástupcem leishmanií způsobujících kožní patologii člověka, u myši ale dochází k systémovému poškození připomínající infekci způsobenou *L. donovani*. Leishmaniózy patří mezi zoonózy - k lidské nákaze dochází při přenosu parazitů ze zvířecích rezervoárů přes hmyzí vektor, jímž je nejčastěji *Phlebotomus* nebo také *Lutzomyia*. Rezervoárem většiny druhů leishmanií (stejně tak u *L. major*) jsou hlodavci a psovití, u některých druhů (jako například *L. tropica*) dochází k přenosu z infikovaného člověka na člověka, opět však skrze hmyzí vektory. Tento přenos se nazývá antropozoonóza (9).

2.2.1 Životní cyklus *Leishmania major*

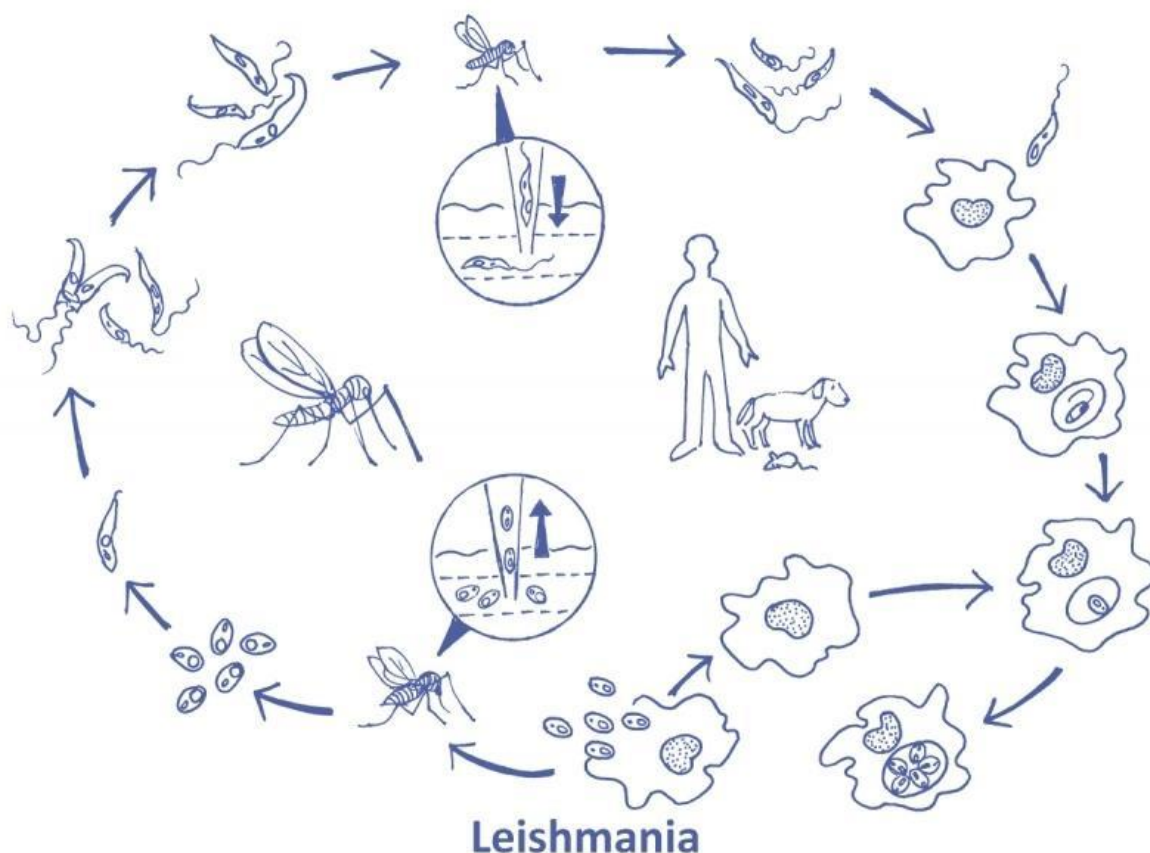
Biologický cyklus *L. major* zahrnuje dvě morfologicky i fyziologicky rozdílná stádia: 15-20 μm dlouhé extracelulární stádium promastigota a menší, 3-5 μm dlouhé, stádium amastigota (4; 9).

K vývoji promastigotních forem dochází ve střevě přenašeče, mušky rodu *Phlebotomus*. Uvnitř samiček dvoukřídlého hmyzu může docházet k dalšímu množení promastigotů podélným dělením. Díky krátkému bičíku jsou buňky pohyblivé, mohou tedy migrovat do sosáku přenašeče a mohou tak být

přeneseny na hostitele. Metacyklická promastigotní forma je pro člověka infekční, při sání krve přenašečem se parazité dostávají o krve obratlovců (tedy i člověka) jako promastigoté a invadují makrofágy (4; 9).

Uvnitř cytoplazmy napadených mononukleárních fagocytů dochází k transformaci promastigotních forem ve formy amastigotní. V této nepohyblivé fázi jsou díky adaptaci na kyselé prostředí schopny přežít i uvnitř fagolysosomu. Amastigotní formy dále rostou, replikují se, až pokud infikovaná buňka praskne a ony se mohou šířit dále a infikovat jiné, doposud zdravé, hostitelské buňky (4; 9).

K uzavření cyklu dochází po nasátí krve s infikovanými makrofágy, které obsahují amastigoty. Uvnitř přenašeče dochází ke změně amastigotů v promastigotní formu a následně také k transformaci promastigotní formy v infekční formu metacyklickou (4; 9).



Obrázek 3: Životní cyklus *Leishmanie* (10)

Jelikož jsou monocytární makrofágy přítomné ve všech tkáních, mohou amastigotní leishmanie, které jsou jejich součástí, snadno poškodit jakoukoliv z tělesných funkcí. *L. major* však u člověka běžně způsobuje pouze kožní onemocnění. Kožní postižení se obvykle vyskytuje v oblastech snadno přístupných flebotomům jako je například obličej, krk či končetiny. Infekce *L. major* se projeví jako vlhký vřed, několik takto vzniklých vředů může splynout a tak může dojít k vytvoření vícenásobných vředů. I když dojde po několika měsících k vyhojení vředů, mohou na jejich místě zůstat jizvy či trvalé změny pigmentace pokožky (11).

Důležité poznatky o reakci hostitele na infekci leishmanií poskytují studie na myších modelech. Pomocí následného genetického mapování tak lze získat komplexní poznatky o interakcích mezi parazitem a hostitelem. Také je možno odhalit geny, které ovlivňují výsledek infekce, a vliv těchto genů na různé složky imunitního systému. Velkým přínosem ve studiu leishmanií je použití myšního modelu pro analýzu infekce *L. major*, která v myši vyvolává systémové onemocnění připomínající infekci *L. donovani*, ke studiu život ohrožující viscerální formy onemocnění (2).

2.3 Myš jako modelový organismus

Zkoumání patofyziologie onemocnění přímo na člověku není z etického hlediska vždy vhodné a možné. V těchto případech lze ke zjištění vztahu mezi genetickou výbavou jedince a vniklým onemocněním použít vhodný modelový organismus. Jedná se o laboratorní zvíře, které vykazuje určitou homologii osekvenovaného genomu s genomem zkoumaným, tedy lidským. Příkladem klasických modelů je například muška *Drosophila melanogaster*, která byla použita T. H. Morganem při objevu role chromozomů v dědičnosti, nebo savčí model myši *Mus musculus*, která byla použita coby modelový organismus i v našem případě (12).

Záznamy o výzkumu myší pocházejí již ze 17. století, kdy William Harvey použil laboratorní myš jako modelový organismus k podrobnému popisu krevního oběhu.

Také Gregor Mendel uvažoval o myších coby objektech ke zkoumání dědičnosti, ale vzhledem k námitkám biskupa a obtížnosti získávání myší v prostředí kláštera, zvolil jako předmět výzkumu hrách. Zřejmě první příklad genetické studie provedené na myším modelu pochází z roku 1902, kdy francouzský biolog Lucien Cuénot zkoumal u myší barvu srsti k dokázání poměru dědičnosti (13).

I v současné době vědci či výzkumníci často využívají zvířat jako modelových organismů ke komplexnímu porozumění lidských reakcí. Na základě projektu sekvenování lidského genomu HUGO a sekvenování celého myšího genomu organizované MGSC (Mouse Genome Sequencing Consortium) byla zjištěna značná shoda mezi oběma genomy. Přibližně 99% myších genů má ortolog v lidském genomu. Ve skutečnosti je jen 300 genů jedinečných pro každý organismus. Toto zjištění podporuje použití myších modelů pro studium genetického základu lidských onemocnění a také pro testování nových možností jejich léčby (14; 15).

Jelikož mají myši vysokou reprodukční schopnost (doba gravidity se pohybuje v rozmezí 18–22 dní a při jednom vrhu se může narodit až 20 mláďat), je možné získat velké množství jedinců. Také lze u myšího modelu zkoumat velké množství generací, což je u člověka značným limitním faktorem. Jako další příklad laboratorních zvířat se schopností rychlé reprodukce můžeme uvést například mušky či červy. Na rozdíl od těchto organismů je ale myš vhodnějším organismem pro studium komplexních biologických systémů, jako je imunitní, endokrinní, nervový, kardiovaskulární či kosterní systém (16).

Opakované křížení vede k produkci geneticky shodných kmenů, tato jednotnost umožňuje přesnější experimenty a také jejich opakování. Tyto identické inbrední kmeny a jejich deriváty, jako jsou kmeny kongenní či rekombinantní kongenní kmeny, jsou vhodné pro studium genetického vlivu na lidská onemocnění (13,14).

2.3.1 Inbrední kmeny

Jedná se o myši kmeny odvozené od jediného rodičovského páru. Po 20 a více výhradně příbuzenských kříženích, kříženích bratr-sestra, vznikají myši geneticky identické a homozygotní v celém rozsahu. Podmínka celkové homologie není splněna v případě, kdy by homologie vedla k letalitě organismu (14).

Existují stovky inbredních kmenů, které představují bohatství nejen genetické, ale také fenotypové a značná část těchto kmenů musí být ještě zkoumána. Nová strategie věnující se této rozmanitosti je založena na sběru fenotypových dat běžných inbredních kmenů napříč řadou disciplín. Takovýto katalog fenotypových informací umožňuje vyšetřovatelům mimo jiné zvolit vhodné kmeny jako progenitory v kříži pro identifikaci QTL (14).

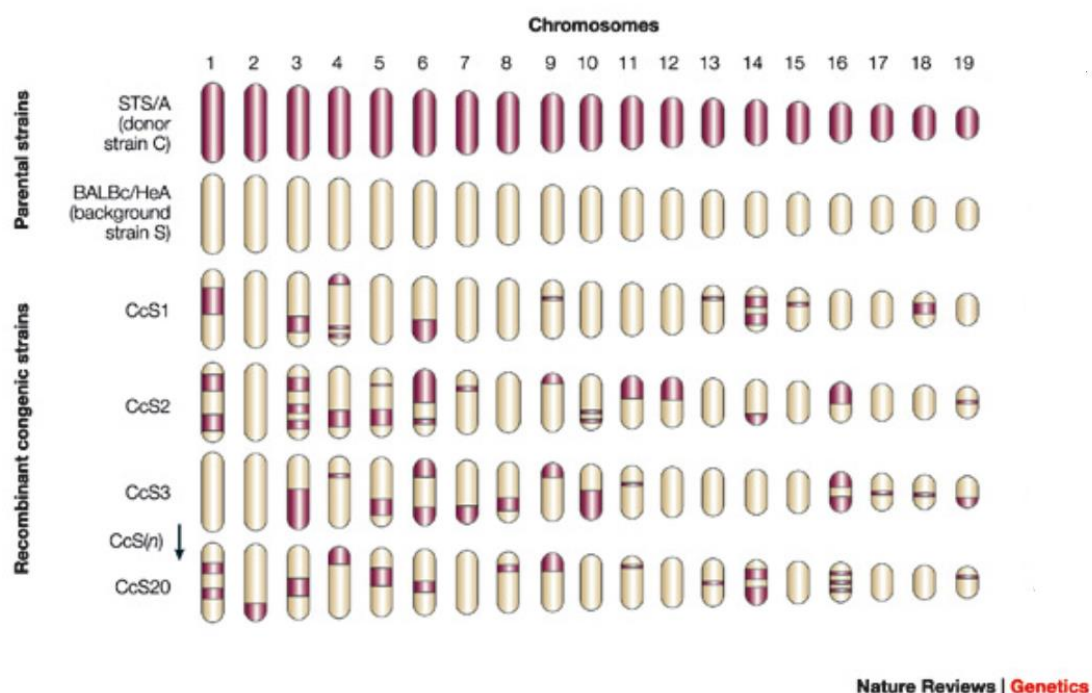
Deriváty inbredních kmenů, jako jsou například kongenní nebo rekombinantní inbrední kmeny, poskytují prostředky pro identifikaci lokusových polymorfismů, potvrzují vliv těchto polymorfismů na fenotypový projev a umožňují zaměření kauzálního genu, které může být následně potvrzeno knockout myši (14).

2.3.2 Rekombinantní kongenní kmeny

Rekombinantní kongenní kmeny (RCS) byly zavedeny jako inbrední populace, kdy každý kmen nese jinou náhodnou podmnožinu genů od rodičovského dárce a zbylé geny druhého rodičovského páru tvoří pozadí (17).

RCS vznikají křížením dvou inbredních kmenů, které se liší ve fenotypovém projevu. První kmen, kmen A, tvoří genetické pozadí, zatímco druhý kmen B je dárce, donorem. Jedinci F1 generace vzniklí křížením AxB jsou dvakrát zpětně zkříženi s rodičovským inbredním kmenem A. Mezi potomky vzniklých tímto zpětným křížením dochází k opakovanému páření bratr-sestra, po celkem 20 kříženích vzniká výsledný rekombinantní kongenní kmen (17).

Každý ze vzniklých rekombinantních kmenů nese rozdílnou náhodnou podskupinu 12,5% genů dárcovského kmene a zbylých 87,5% tvoří geny pozadí. Spolu s náhodným křížením dochází také k náhodnému rozdělení nevázaných genů, které se podílejí na kontrole multigenního znaku. Tímto způsobem se multigenní znak transformuje na sérii jediných genových vlastností, v nichž může být každý gen studován jednotlivě (17).



Obrázek 4: Genomy rekombinantních kongenních kmenů (18)

2.4 Mapování genů

Citlivost k infekčnímu onemocnění je většinou kvantitativním znakem, na výsledném fenotypovém projevu se tedy podílí větší množství (komplex) genů malého účinku. Sledovaná vlastnost se mění v závislosti na distribuci alel v populaci a genových interakcích. V případě aditivního účinku genů pak fenotypový projev odpovídá součtu působení jednotlivých alel. Projev vlastnosti je také ovlivňován prostředím (14).

K nalezení kandidátních lokusů a genů u lidí bylo vyvinuto několik strategií detekce jako například: metoda kandidátních genů, vazebná analýza a asociační mapování, nebo analýza založená na modulech (19).

Vazebná analýza může být založena na přístupu, kdy je sledováno předávání znaků z generace na generaci nebo mohou být studie zaměřeny na širší rodinu. V případě sourozeneckých párů se jedná o studie vazby bez modelu. Cílem genomové studie vazby je určit vzorce společné segregace zkoumaných znaků a polymorfních znaků jako jsou SNP (jednonukleotidové polymorfismy) či STR (krátké tandemové repetice) k identifikaci lokusů a následně i konkrétních genů, které kontrolují rozvoj analyzovaných vlastností (20).

V asociačních studiích se testuje každá z předpokládaných kauzálních variant, která by mohla být spojena s daným onemocněním. Prohledávání celého genomu k identifikaci variant kandidátních genů v případě onemocnění by znamenalo značné náklady na sekvenování celých genomů velkého množství patientských vzorků. Proto je v současné době tento přístup většinou omezen pouze na sekvenaci funkční části kandidátních genů. Tento alternativní přístup využívá soubory sekvenčních variant SNP či STR, které v genomu slouží jako genetické markery k detekci vztahu mezi konkrétní genovou oblastí a onemocněním (20).

K dalšímu posunu v oblasti lidské genetiky došlo na začátku 21. století zahájením projektu HapMap. Cílem výzkumu bylo vytvoření haplotypové mapy lidského genomu a popsat společné vzorce genetické variability člověka. Tato charakterizace byla provedena na základě typování asi 4 milionů jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v DNA afrického, asijského a evropského původu. Následné výpočty vazební nerovnováhy mezi těmito znaky a konstrukce komplexních map SNP haplotypů se staly základem pro genomové asociační studie komplexních znaků. HapMap tak umožňuje mimo jiné mapování a identifikaci genů či genetických variant, které se uplatňují při vzniku onemocnění (20).

Strategie založená na modulech se zaměřuje na hodnocení interakcí a regulačních vztahů mezi jednotkami biologického systému. Biologické prvky sdílející společné rysy jsou uspořádány v modulech, které jsou konstruovány na základě biologických znalostí nebo na základě výpočetních algoritmů. Biologické prvky modulu se mezi sebou navzájem ovlivňují a interagují mezi sebou jako součásti sítě. Znalost interakcí genů takovéto sítě umožňuje hledání nových genů, které jsou asociovány s těmito moduly. Následuje ověření získaných informací funkční analýzou (20).

Tradiční metoda kandidátních genů je do značné míry omezena předpokládanými znalostmi fyziologických, biochemických a funkčních aspektů možných kandidátů. Kandidátní geny jsou geny se známou biologickou funkcí přímo či nepřímo ovlivňující vývojové procesy vyšetřovaných znaků nebo onemocnění. Tento vliv lze následně potvrdit vyhodnocením v asociační analýze. Během asociační analýzy se testují funkce specifických polymorfismů (SNP či STR markerů) v kandidátních genech nebo genetických místech nacházejících se blízko kandidátních genů a jejich korelace s fenotypem. Tyto studie mohou být založeny buď na studiu populace či na základě zkoumání rodin (20).

2.4.1 Metoda kandidátních genů

Genetické studie kandidátních genů uplatňují řadu strategií křížení a vzhledem k některým již zmíněným omezením v oblasti lidských genetických studií se často používají myší modely. Produkce F2 hybridů mezi inbredními kmeny umožňuje mapování lokusů, které se podílejí na kontrole kvantitativních znaků. Vzhledem k nízkému počtu rekombinací je rozlišení mapování spíše nízké i na vzdory velkému počtu potomků v analyzované populaci F2. Pokročilým intercrossem, kdy dochází ke křížení mezi získanými hybridy F2 generace s inbredními kmeny a kdy je také zabráněno křížení bratr x sestra, lze problém nízkého rozlišení překonat. Akumulace rekombinací během tohoto křížení snižuje vazbovou nerovnováhu a poskytuje tak vysoké mapové rozlišení (20).

Při jiné chovné strategii dochází dle protokolu ke křížení bratr x sestra náhodně vybraných F2 hybridů po dobu nejméně 20 generací. Protokol tak poskytuje rekombinantní inbrední kmene, kdy každý z nich nese jinou náhodnou 50% část genomu každého rodičovského kmene v homozygotním stavu. Srovnání fenotypů rekombinantních inbredních kmenů bylo úspěšně použito během mapování komplexních znaků kontrolovaných geny se silným účinkem (19).

Další strategie je založená na snížení množství genomu donorového kmene vzhledem ke genomu kmene, který tvoří genetické pozadí. Tato strategie byla aplikována u rekombinantních kongenních kmenů (RCS). Křížící protokol poskytuje kmene, z nichž každý nese náhodnou 12,5% část genomu dárcovského rodičovského kmene na pozadí genomu druhého rodičovského kmene. Vliv takovýchto segmentů je pak samostatně studován u F2 hybridů mezi vybranými RCS a rodičovským kmenem tvořící pozadí (19).

Jiným příkladem využívaných kmenů jsou kmene kongenní. Tyto kmene jsou produkovány několikanásobným zpětným křížením, které je selektivní pro daný lokus. Metoda umožňuje charakterizace tohoto místa bez vlivu epistatických genů, které mohou ovlivnit výsledný fenotyp (19).

Přesné mapování genů v případě znalosti kandidátního lokusu je možné použitím panelů transgenních myší, kterým byly vneseny kvasinkové umělé chromozomy (YAC). Tyto chromozomy slouží jako vektory s vysokou klonovací kapacitou, je tedy umožněno klonování genomových segmentů dlouhých až 1 000 kb. Dalšími možnými klonovacími vektory jsou uměle vyrobené bakteriální chromozomy (BAC), které mají sice nižší klonovací kapacitu o velikosti do 300 kb, ale jsou stabilnější než YAC (19).

K posouzení role jednotlivých kandidátních genů jsou používané kmene transgenní pro jediný gen. Pokud je funkce tohoto sledovaného genu cíleně

vyřazena, jedná se o tzv. knock-out gen. Myši nesoucí vyřazený gen, tedy knock-out myši, pocházejí z buněčných embryonálních kmenů, ve kterých byl sledovaný gen narušen. V případě, kdy porušení funkce genu vede k embryonální letalitě, může být cílový gen vyřazen podmíněně pouze ve vybraných orgánech či buňkách, nebo dokonce až v určité etapě vývoje. Vyhodnocení funkce vyřazeného genu se provádí na základě odlišného fenotypového projevu. Pokud se sledovaný znak liší u myši nesoucí vyřazený gen a u myši stejného vrhu, poté je rozdílný fenotyp způsoben porušením cílového genu. Takto upravené myši modely umožňují studovat především geny predisponující nemoci u lidí (19).

Další možností rekombinace u myšního modelu je využití lokálně specifického rekombinantního systému Cre/lox. Enzym Cre rekombináza, topoizomeráza I odvozená z P1 bakteriofága, v DNA rozpoznává specifické sekvence o délce 34 párů bází nazývané lox místa. Enzym umožňuje vyštěpení jakékoliv DNA sekvence mezi dvěma lox místy orientovanými ve stejném směru, anebo převrací jakékoliv DNA sekvence mezi dvěma lox místy orientovanými obráceným směrem. Cre/lox systém tak umožňuje komplexní přeuspořádání DNA u transgenních myší (21).

Enzym je také často používán pro knock-out a knock-in studie. Jakákoliv DNA sekvence umístěná mezi dvěma tandemovými opakováními loxP může být vyříznuta pro vytvoření delečního mutanta nebo plazmid obsahující jediné loxP místo může projít inzertem specifickým začleněním do genomu obsahujícího loxP za vzniku inserčního mutanta (21).

2.4.1.1 Mapování QTL

Na vzniku infekčního onemocnění se podílí tzv. QTL (Quantitative Trait Loci). Jedná se o úsek DNA, který má vztah s variacemi fenotypu. Mapování těchto chromozomových oblastí je vzhledem k jejich nízké penetraci u lidí poněkud obtížné. Identifikace genu této oblasti je ale umožněna vzhledem ke značné homologii mezi lidskými a myšími chromozomy (obsahujícími orthologní geny).

Mapování genu v modelovém organismu tedy usnadní předpovědět lokalizaci genu u člověka. Myši modely infikované parazity rodu *Leishmania* jsou proto vhodnými modely k odhalování QTL. Detekovaly již na 30 QTL kontrolujících vnímavost k *L. major* – ku příkladu lokus *Lmr8* (leishmaniasis resistance 8) ovlivňující sérovou hladinu IgE a proliferaci splenocytů infikované myši, nebo lokus *Lmr14* kontrolující splenomegalii, hepatomegalii, sérový INF γ a sérový IL-12 (9; 22).

Během genetického mapování se k detekci kvantitativních genů nejčastěji používají jako molekulární markery SNP (jednonukleotidové polymorfismy) nebo také markery STR (krátké tandemové repetice). Jedná se o přirozené variace sekvencí, nukleotidů, které se dále zkoumají v souvislosti s fenotypovým projevem v nově vznikajících populacích. Umístění polymorfismů v genomu je známé na základě genetických map či známé sekvence analyzovaného genomu. Dodnes byly identifikovány tyto markery u více než 100 inbredních myších kmenů, tato data jsou s novými objevy pravidelně stahována do online databází a usnadňují tak genetické mapování (14).

2.4.1.2 Vazebná analýza QTL

Základem QTL mapování je výběr dvou vhodných inbredních kmenů parentální linie. Tyto rodičovské kmeny se pro sledovaný znak geneticky liší. Spolu s distribucí znaku při produkci F1 linie sledujeme také distribuci molekulárních markerů. Myši vzniklé heterozygotní F1 linie jsou pak vzájemně křížené za vzniku F2 generace, kdy toto křížení vede ke vzniku tří možných genotypů pro každý marker. Dalším způsobem získání F2 generace je zpětné křížení jedinců F1 generace s jedním z rodičů, což vede k produkci potomstva s dvěma možnými genotypy každého markeru (14; 23).

Další krok zahrnuje fenotypizaci a genotypizaci vzniklého potomstva. Nejprve se co nejpřesněji analyzuje měnící se fenotypový projev u každého z potomků. Po následné genotypizaci lze určit, zda potomek gen pro daný znak nese či nikoliv

a jelikož se jedná o kvantitativní znaky, může být stanovena také jejich hodnota. Při následné genotypizaci lze zjistit, který ze dvou rodičovských inbredních kmenů předává svou alelu specifického lokusu potomkům vzniklým zpětným křížením nebo potomkům F2 (F1x F1) generace. Cílem QTL analýzy je tedy identifikovat genomové oblasti obsahující alelické variace, které jsou spojeny s fenotypovými změnami. Pro detekci kandidátních genů by měl jeden z rodičovských inbredních kmenů nést alelu vyvolávající onemocnění (14; 23).

Po nalezení QTL je třeba oblast zúžit, aby mohl být izolován a identifikován požadovaný gen. Jedním z možných postupů je analýza haplotypů, jelikož QTL bude právě v oblasti, kde mají rodičovské kmeny odlišné haplotypy (24). Velkou pomocí při identifikaci genů, které jsou základem lokusů kvantitativních znaků (QTL), je mozaiková struktura myšního genomu. Jako většina variací mezi myšimi kmeny je primárně odvozená od myších poddruhů *Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus* (14).

2.4.1.3 QTL analýza

QTL analýza je statistická metoda, která čerpá ze dvou zdrojů informací. Prvním zdrojem jsou fenotypová data, která slouží jako měřítko vlastností, druhým typem informací jsou data genotypová, jako tato data obvykle slouží molekulární markery. Cílem metody je identifikace a charakterizace regionů kvantitativních znaků (23).

Z velkého množství křížení získáme informace o příslušných fenotypech a genotypech, tyto informace jsou kombinovány v jedné regresní QTL analýze. Během QTL analýzy dochází ke statistickému vyhodnocení informací. Markery, které jsou ve vazbě s QTL ovlivňujícím sledovaný znak jsou segregovány častěji spolu s analyzovanou vlastností, zatímco markery bez vazby ke stanovanému znaku nevykazují žádnou spojitost se zkoumaným fenotypem (23).

Rodičovské kmeny jsou kříženy s cílem produkce F1 generace, jejíž potomci jsou pak kříženi mezi sebou nebo jsou zpětně kříženi s jednou z rodičovských linií. Potomci křížení obsahují různé frakce genomu rodičovských linií. Zaznamenává se fenotyp každého z rekombinantních jedinců, stejně tak i genotypy markerů, které se mezi rodičovskými kmeny liší. Statistické techniky vyhodnocují pravděpodobnost, že značka nebo interval mezi dvěma markery jsou spojeny s QTL ovlivňujícím znak, zatímco současně kontroluje vliv ostatních markerů na znak. Výsledky takové analýzy jsou znázorněny jako graf statistického testu na pozici chromozomální mapy v rekombinantních jednotkách centimorgan (cM) (23).

2.5 Detekce množství patogenů v organismu hostitele

Metody detekce parazitů zahrnují mikroskopii, buněčné kultury, imunodetekce a techniky založené na DNA. Metody buněčných kultur jsou spolu s mikroskopií ale velmi pomalé a pracné, zvláště pokud jde o analytické zpracování velkého počtu vzorků. Metody imunodetekce založené na odhadu hladin protilátek proti parazitům *Leishmania* nejsou přesným obrazem množství parazitární zátěže, jelikož vztah mezi přítomností protilátek a množstvím parazitů závisí na individuální reaktivitě a celkovém zdravotním stavu hostitelského organismu (25).

Za účelem překonání těchto omezení byly navrženy DNA metody detekce a kvantifikace parazitů, těmito metodám a dílčím krokům analýzy bude věnována praktická část práce. Používaná metoda PCR-ELISA je levnější než PCR v reálném čase, má vysokou citlivost a umožňuje detekci i malých rozdílů v množství parazitů. Tato metoda je ale komplikovaná a namáhavá, jelikož vyžaduje PCR reakci a následnou hybridizaci amplifikovaných úseků nukleové kyseliny (26).

2.5.1 ELISA

Imunologické metody jsou založené na vysoce specifické reakci mezi antigenem a protilátkou namířenou proti epitopu tohoto cizího agens. „Enzyme-linked

immunosorbent assay“, zkráceně ELISA, využívá k detekci této specifické interakce enzym, jímž je označena jedna z reagujících složek. Detekční systém tvoří substrát, který reaguje s kovalentně navázaným enzymem. Působením enzymu na substrát dochází buď k jeho barevné změně, anebo k odštěpení produktů, které s další přidanou látkou vytváří barevnou reakci. ELISA testy jsou používány jednak k detekci protilátek, ale také pro důkaz přítomnosti antigenu (27).

Sérologické testy jsou běžně prováděny v tekutém prostředí ve zkumavce. ELISA metoda se provádí na pevném nosiči, kterým je nejčastěji mikrotitrační destička. Využívá tak schopnosti proteinů vázat se na povrch umělých hmot (27).

Metoda existuje v řadě uspořádání. Tzv. „sendvičové metody“ jsou nejčastěji používány při průkazu specifických protilátek. Na dno mikrotitrační destičky se naváže známý antigen a v dalším kroku se přidá sérum testované na přítomnost protilátky proti navázanému antigenu. Tato specifická protilátka v séru tvoří s navázaným antigenem imunokomplex a v dalším kroku je detekována protilátkou proti druhově specifickým imunoglobulinům konjugovanou enzymem. K vizualizaci dochází nejčastěji po přidání substrátu. Mezi jednotlivými kroky je nutné plotny promývat, aby se tak odstranily nespecificky navázané látky (27).

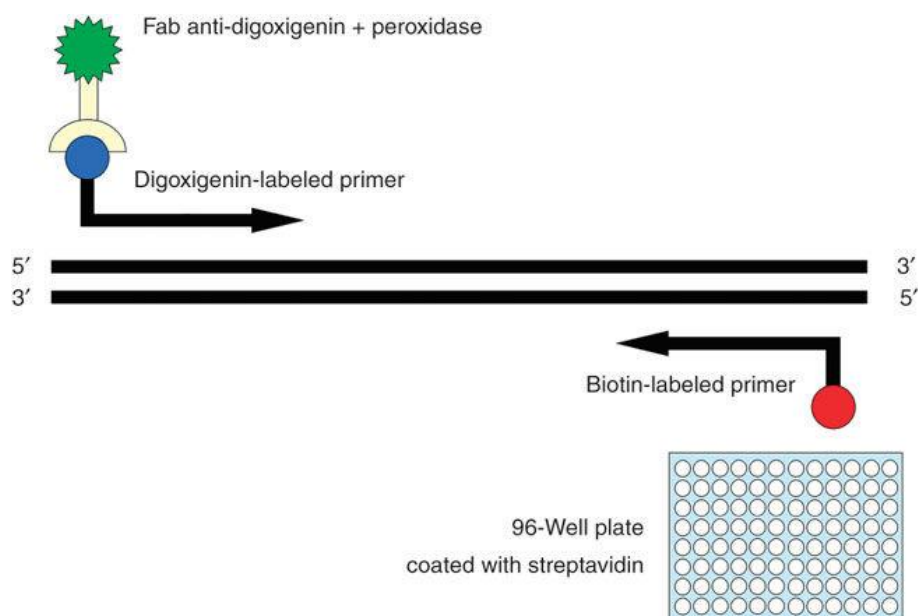
V případech průkazu přítomnosti antigenu je možné také použít „sendvičovou metodu“. V prvním kroku se ale na stěny plotny nenavazují antigeny, ale specifické protilátky pro hledaný antigen. V dalším kroku se opět přidává sérum či jiná tekutina testovaná na přítomnost antigenu. Vazba mezi protilátkou navázanou na stěnu mikrotitrační destičky a vyvázaným antigenem se detekuje další protilátkou, která reaguje s tímto antigenem (avšak se liší rozpoznávacím místem) a která je konjugovaná s enzymem. K vizualizaci dochází po přidání substrátu (27).

2.5.2 PCR-ELISA

PCR-ELISA je imunodetekční metoda umožňující kvantifikovat produkt PCR reakce přímo po imobilizaci amplifikované biotinylované DNA na mikrotitrační destičce. Oproti běžnému provedení ELISA metody je namísto proteinu detekována nukleová kyselina. PCR-ELISA vykazuje vysokou specifickou a citlivost, také analytická doba je kratší a detekční limit značně nižší (25).

Celá metoda zahrnuje 3 kroky: amplifikaci, imobilizaci a následnou detekci nukleové kyseliny. V prvním kroku je analyzovaný gen amplifikován pomocí PCR v přítomnosti digoxigenin-11-dUTP (DIG-dUTP). PCR produkty značené DIG-dUTP se pak budou vázat ke specifickým oligonukleotidovým sondám, které jsou na jejich 5' konci označeny biotinem. Následně je analyzovaný gen imobilizován na dně mikrotitrační destičky potažené streptavidinem, který tvoří spolu s biotinem komplex. Tato silná afinita avidin-biotin umožňuje specifické vyvázání produktů PCR s daným specifickým genem. Po imobilizaci je nutná detekce biotinylované DNA, k té dochází po přidání konjugátu anti-DIG-peroxidázy a přes substrát ABTS (2,2'-azino-di-3-ethylbenzotiazolin sulfonát). Výsledkem je modrozelené zbarvení obsahu jamek, které je možné měřit spektrofotometrem (25).

Jiný způsob průkazu produktu PCR-ELISA je možné za použití fluoresceinové sondy a její detekci antifluoresceinových protilátek konjugovaných s křenovou peroxidázou (25).



Obrázek 5: Schéma metody PCR-ELISA (26)

2.6 Metody použité k určení kontroly množství parazitů v orgánech myši infikovaných *L. major*

2.6.1 Izolace nukleových kyselin

Práci s nukleovými kyselinami (NK) předchází jejich extrakce z buněk. V prvním kroku izolace NK živočišné buňky dochází k narušení buňky cytoplazmatické membrány a uvolnění vnitřního obsahu buněk. U rostlinných buněk je třeba kromě cytoplazmatické membrány také narušení integrity buněčné stěny. Podle výchozího materiálu je tedy třeba zvolit vhodné detergenty k dezintegraci. U živočišných buněk lze lyzi indukovat jemnějšími metodami, ku příkladu neiontovými detergenty jako je SDS. Na rozdíl od toho u rostlinných buněk dochází často i k mechanickému porušení. Z uvolněného buněčného obsahu je třeba získat nukleové kyseliny bez příměsí látek, které by bránily dalším úpravám a analýze (28).

Předpokladem ke správné práci s nukleovými kyselinami je tedy izolace analyzované DNA či RNA v dostatečném množství a v dostatečné čistotě. K izolaci nukleových kyselin se používá celá řada metod založených na rozdílné rozpustnosti biomakromolekul či na jejich adsorpci na pevný podklad. Dále jsou aplikovány

metody ultracentrifugace, kdy dochází k rozdělení a ustálení molekul v gradientních roztocích na základě vznášivé hustoty či rychlosti sedimentace částic (28).

První způsob izolace nukleových kyselin využívá rozdílné rozpustnosti biologických makromolekul. Během izolace volíme vhodné činidlo, které způsobí precipitaci nukleových kyselin. Takto vzniklý precipitát je možné oddělit působením odstředivého pole centrifugy (28).

Jako vhodná precipitační činidla k izolaci nukleových kyselin se jeví alkoholy, příkladem je fenol-chloroformová extrakce, srážení nukleových kyselin ethanolem či isopropanolem. Extrakce fenolem umožňuje například selektivní izolaci RNA nebo DNA podle zvoleného pH srážecího roztoku. Při použití neutrálního nebo alkalického pufru zůstávají ve vodní fázi DNA, zatímco po použití fenolu kyselého je součástí supernatantu pouze RNA (28).

Schopnost nukleových kyselin přilnout na povrchu různých materiálů, jejichž základ tvoří oxid křemičitý, v přítomnosti chaotropních solí využívají adsorpční metody. Chaotropní soli jsou sloučeniny, které narušují nativní strukturu nukleových kyselin. Prostřednictvím iontů dochází k vytvoření můstku, kdy se na silikamateriál váže fosfátová kostra nukleové kyseliny. Nejčastěji používanými chaotropními solemi jsou guanidinové soli nebo jodid sodný (28).

Po navázání nukleových kyselin jsou kontaminanty odstraněny promývacími kroky za použití chloroformu a poté dochází k centrifugaci. Izolace je ukončena uvolněním nukleových kyselin z podkladu po přidání roztoku s nízkou iontovou silou, například po přidání vody nebo elučního pufru (28).

Během centrifugace dochází k oddělení částic v tekutém mediu v odstředivém poli. Při diferenciální centrifugaci se oddělí částice směsi na základě rozdílných rychlostí sedimentace, tyto separační kroky se opakují při postupném zvyšování

otáček. Zatímco zonální centrifugace se používá spíše pro hrubou separaci a izolaci složek lyzovaného obsahu buněk, zonální centrifugace umožňuje i separaci jednotlivých typů nukleových kyselin (28).

Základem separace makromolekul či částic podobných vlastností je použití tzv. gradientního roztoku ve zkumavce na místo roztoku homogenního. Koncentrace takového gradientního roztoku od povrchu ke dnu zkumavky narůstá a brání tak nárůstu rychlosti sedimentace částic během centrifugace. Nejčastěji se pro přípravu gradientních roztoků používají látky, které jsou inertní k analyzovaným částicím, například sacharóza nebo glycerol. Složky výchozí směsi v tomto gradientu sedimentují v závislosti na velikosti, tvaru a hustotě různou rychlostí a dávají tak vzniku oddělených zón (28).

Podle dosažených podmínek během zonální centrifugace rozeznáváme centrifugaci izokinetickou a izopyknickou (28).

Izokinetické centrifugace lze dosáhnout tehdy, pokud při zonální centrifugaci zvolíme vhodné podmínky – například homogenní roztok v centrifugační zkumavce nahradíme gradientním roztokem. Jedná se nejčastěji o sacharózový roztok, jehož koncentrace směrem ke dnu zkumavky narůstá a který tak eliminuje vliv vzrůstajícího odstředivého zrychlení směrem od osy otáčení. Centrifugace částic při konstantní rychlosti sedimentace lze využít k podrobnější charakterizaci sedimentovaných částic (28).

Během izopyknické centrifugace dochází k separaci částic podle jejich hustoty. Při nejjednodušším provedení tvoří gradientní roztok sama analyzovaná media. Částice analyzovaných látek se pohybují oběma směry, dokud nedosáhnou takové polohy, která odpovídá jejich hustotě. Izopyknická separace se využívá nejen k izolaci částic, ale může být použita také k jejich podrobnější charakterizaci (28).

2.6.2 Měření koncentrace a čistoty izolované DNA

Čistotu a koncentraci izolované nukleové kyseliny si lze ověřit spektrofotometrickým měřením za pomoci přístroje spektrofotometru či nanospektrofotometru. Při spektrofotometrickém měření dochází k interakci elektromagnetického záření s částicemi vzorku a následné absorpci světla z tohoto zdroje záření. Množství pohlceného světla se nazývá absorbance (29).

Čisté nukleové kyseliny absorbují světlo v oblasti ultrafialového záření a maximální absorpci vykazují zhruba při 260 nm. Toto absorpční maximum je dáno především přítomností bází tvořících kostru nukleových kyselin. Při stejné vlnové délce absorbují také bílkoviny, které bývají nejčastějšími kontaminanty izolované DNA. Zatímco nukleové kyseliny absorbují nejlépe při vlnových délkách 260 nm, bílkoviny vykazují nejvyšší absorbanci při 280 nm. Ke stanovení čistoty izolovaných nukleových kyselin lze tedy využít těchto znalostí (29).

Nejčastěji se používá poměr absorbancí pro obě absorpční maxima, tedy A_{260} a A_{280} . Poměr pro izolovanou DNA by se měl pohybovat v rozmezí 1,6 a 1,8, pro izolovanou RNA je tento poměr zhruba 2. Pokud je získaný poměr menší, jedná se zřejmě o kontaminaci proteiny. Naopak vyšší hodnota může svědčit o znečištění organickými látkami, které byly použity během izolačního procesu (29).

Koncentraci purifikované DNA lze odhadnout měřením absorbance při vlnové délce 260 nm, za předpokladu lineární závislosti obou veličin. Jedná se ale spíše o orientační údaj, jelikož způsob stanovení není příliš selektivní a výsledná hodnota může být zkreslena přítomností proteinů či fenolu v roztoku analyzované nukleové kyseliny. Mimo to také měřením absorbance nezískáváme informaci o integritě molekuly (28).

2.6.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je amplifikační metoda, která byla zavedena v roce 1985 Kary B. Mullisem. Objev metody znamenal velký přínos nejen pro molekulární biologii. PCR postup umožňuje získat namnožený požadovaný a specifický úsek genomové DNA, aniž by docházelo ke klonování ve vektorech (28).

Princip PCR je založen na schopnosti denaturace a následné hybridizace denaturovaných řetězců se specifickými oligonukleotidy (primery) a amplifikace zvoleného úseku. Celý tento proces se odehrává v zařízení nazývaném termocyklér, který umožňuje změny teplot v krátkých časových intervalech (28).

V prvním kroku reakce dochází k denaturaci nukleové kyseliny vlivem vysoké teploty (asi 90–95 °C) (28).

V dalším kroku procesu dochází k připojení primerů specifických k sekvenci amplifikované DNA. Tato hybridizační reakce probíhá při nižší teplotě, než je denaturační proces, jelikož vysoká teplota vede ke zpomalení, nebo dokonce i k inhibici hybridizační reakce. Naopak použití nízkých teplot vede k nespécifickému párování úseku DNA s použitými primery a tedy i k znečištění produktu PCR metody (28).

Navázané primery ohraničují specifický úsek nukleové kyseliny, který je v dalších krocích amplifikován a umožňují zahájení syntézy nových řetězců DNA-polymerázou. Vzhledem k vysoké teplotě během denaturačního procesu je třeba během reakce použít termostabilní polymerázy, nejčastěji používaná je Taq DNA polymeráza izolovaná z termofilního mikroorganismu *Thermus aquaticus*. Optimální teplota enzymu je kolem 70 °C, tedy elongace řetězců probíhá v teplotním rozmezí 65–75 °C (28).

Opakováním tohoto procesu, denaturace, hybridizace a elongační fáze, dochází k exponenciálnímu zmnožení ohraničeného úseku cílové molekuly. Vzniká 2^n ampliconů, kdy n je počet cyklů. Počet cyklů se obvykle pohybuje od 25 do 35 cyklů, konkrétní počet je ale především závislý na výchozí koncentraci templátové DNA (28).

Mimo klasického provedení PCR metody existuje i celá řada jejich modifikací. Příkladem je kvantitativní PCR (qPCR), která umožňuje prostřednictvím detekce fluorescenčního signálu přímou kvantifikaci vznikajícího PCR produktu během probíhající reakce. Po skončení PCR reakce není tedy nutné detekovat a kvantifikovat PCR produkt elektroforézou. Reverzní neboli zpětná PCR (RT-PCR) zas umožňuje amplifikovat i molekuly RNA. RNA musí být ale před zahájením samotné PCR reakce převedena na cDNA, jelikož RNA nemůže sloužit jako templát. Tento přepis je uskutečněn za účasti zpětné transkriptázy. Následně dochází k amplifikaci vzniklé cDNA běžným postupem (28).

2.6.4 Restrikční endonukleázy

Restrikční endonukleázy jsou enzymy přirozeně produkované bakteriemi chránící je před cizorodými molekulami DNA. Ochrana spočívá v endonukleázové aktivitě těchto enzymů. Enzymy vyhledávají v molekule DNA specifické sekvence, která mají nejčastěji podobu palindromů. Na těchto místech provádí restriktázy štěpení molekuly nukleové kyseliny. Aby nedocházelo k poškození vlastní DNA hostitelské buňky, je její vlastní DNA chráněna před účinkem enzymu pomocí metylace (30).

Vlastní restrikce probíhá hydrolytickým štěpením fosfodiesterových vazeb mezi nukleotidy uvnitř či v blízkosti cílového místa. Výsledkem štěpení jsou tzv. restrikční fragmenty. Jedná se o definované segmenty DNA, které lze od sebe oddělit ku příkladu elektroforézou (30).

Restrikční endonukleázy jsou klíčovými enzymy molekulární biologie uplatňující se například u fyzikálního mapování DNA, při analýze genových polymorfismů, kde umožňují rozpoznat odlišnosti v sekvencích stejného genu u různých jedinců a v neposlední řadě umožňují detekovat změny v molekulách DNA (30).

2.6.5 Elektroforéza nukleových kyselin

Během elektroforetické metody separace dochází k pohybu nabitých molekul v elektrickém poli. Fosfátové skupiny nukleových kyselin udělují molekule negativní náboj, proto se nukleové kyseliny pohybují v elektrickém poli ke kladně nabitě elektrodě (28).

Elektroforetické dělení probíhá většinou na gelovém nosiči, který nejčastěji tvoří polyakrylamid nebo agaróza. Podle velikosti separovaných fragmentů je třeba zvolit vhodný gel a také koncentraci použitého polymeru. Agarózový nosič lze použít pro separaci molekul o velikosti 100 pb až po 50 kb. Vzhledem k její snadné přípravě, rychlému průběhu separace a velkému frakcionačnímu rozsahu gelu, je její použití výhodnější než polyakrylamid, který se používá spíše k separaci menších molekul. Podle uspořádání gelu rozlišujeme horizontální a vertikální elektroforézu deskového uspořádání. Pokud se elektroforetický gel nachází uvnitř kapiláry, jedná se o elektroforézu kapilární (28).

Molekuly DNA se v gelu pohybují podle jejich elektroforetické pohyblivosti, čím rychleji se molekula v elektrickém poli pohybuje, tím menší je její velikost. Náboj není třeba brát vzhledem k jeho rovnoměrnému rozložení v úvahu, velikost náboje je na jednotku délky molekuly konstantní (28).

Klasický způsob elektroforetického dělení lze uplatnit pro molekuly do velikosti 50 kb, větší molekuly se pohybují stejnou rychlostí a nedochází k jejich rozdělení, jelikož uvíznou v síti gelu. Proto se k separaci větších molekul používá pulzní gelová elektroforéza, směr elektrického se na rozdíl od konvenční metody

pod určitým úhlem mění. Se změnou elektrického pole musí dojít také ke změně orientace molekul, k tzv. reorientaci molekul. Čas, za který dojde k přeorientování molekul v elektrickém poli, se nazývá reorientační čas. Výsledný pohyb větších molekul je vzhledem k delšímu reorientačnímu času pomalejší (28).

Ke stanovení velikosti molekuly DNA či jejich fragmentů lze použít srovnání jejich elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí hmotnostních standardů. Jako hmotnostní standardy slouží molekuly nebo fragmenty molekuly DNA o známé velikosti (28).

K vizualizaci poloh separovaných molekul je třeba zvolit vhodná barviva. Nejčastěji takto používaným barvivem je interkalační barvivo ethidiumbromid, který vytváří s analyzovanou DNA komplex absorbující ultrafialové záření. Ozářením gelu ultrafialovým světlem lze tento komplex detekovat jako proužky, polohy proužků molekul DNA o stejné velikosti jsou souhlasné a jejich intenzita je úměrná koncentraci DNA (28).

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zvládnout metody molekulární biologie a metody statistické analýzy a jejich pomocí určit kontroly množství parazitů v orgánech myši po infekci *Leishmania major*. K určení genetického vlivu na průběh infekce je třeba provést analýzu genetických sekvencí a pokusit se určit lokusy kandidátních genů, které množství parazitů ovlivňují. Detekci polymorfismů v sekvenci DNA je třeba potvrdit typizací vhodnými markery.

Výstupní data typizace a data získaná kvantifikací parazitů metodou PCR-ELISA následně analyzovat a vyhodnotit statistickými metodami.

4 METODIKA

4.1 Izolace DNA proteinázou K

DNA nacházející se v lyzátu buněk získaném po narušení cytoplazmatické membrány je třeba zbavit kontaminant jako jsou ku příkladu proteiny. K tomuto účelu mohou sloužit enzymy štěpící bílkoviny nazývané proteázy. Během této metody izolace použijeme proteinázu K patřící ke skupině proteázových enzymů.

Lyzační pufr: 200 mM NaCl, 100 mM Tris-base, 5 mM EDTA, 0,2% SDS

Proteináza K (P-6556, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

Isopropanol

Tkáňová voda

V prvním kroku jsme si připravili roztok lyzačního pufru s proteinázou K. Na každou zkumavku připadalo 500 μ l lyzačního pufru a na každý ml tohoto pufru bylo použito 5 μ l enzymu. Do každé mikrozkušavky s myší tkání jsme přidali 500 μ l tohoto roztoku. Zkušavky jsme nechali inkubovat při 55 °C ve vodní lázni přes noc, kdy by tato inkubace měla probíhat při izolaci DNA z myšího ocasu nejméně 14 hodin. Při izolaci z jater či sleziny lze dobu inkubace zkrátit.

Po inkubaci jsme obsah zkumavek promíchali na vortexu a dali jej odstředit v centrifuze na 10 minut na 4 000 RPM při 4 °C (Centrifuge 5810 R, Eppendorf, SRN). Centrifugací se obsah zkumavky rozdělil na pelet obsahující kontaminanty a supernatant, ve kterém byla obsažena izolovaná DNA.

Během centrifugace jsme si nové mikrozkušavky naplnili 500 μ l isopropanolu. Po přelití supernatantu k isopropanolu se ve zkumavce objevil okem viditelný shluk DNA. Vytvořený shluk jsme přenesli inkubační špičkou do zkumavky s 500 μ l tkáňové vody. Množství tkáňové vody se odvíjí, stejně tak jako množství lyzačního pufru, od velikosti tkáňového řezu.

DNA v tkáňové vodě jsme nechali 1–2 dny rozpouštět v lednici.

4.2 Izolace RNA

Vzhledem k nestabilitě molekuly RNA a přítomnosti ribonukleázových enzymů štěpících RNA v mnoha tkáních, je třeba izolaci provádět pečlivě a precizně. Před zahájením práce je vhodné očistit pracovní plochu roztokem inhibující ribonukleázy.

DEPC-H₂O– roztok inhibující RNasy

TRI-Reagent (T9424, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Do mikrozkušavek jsme přenesli 1 ml vychlazeného Trisolu a vložili do něj myší tkáň (množství Trisolu se odvíjí od velikosti tkáně, ze které izolaci provádíme). Obsah zkumavek jsme homogenizovali po dobu zhruba 30 sekund a následně jsme jej po stejnou dobu chladili na ledu. Tento krok jsme opakovali celkem 3x.

Ke zhomogenizovanému obsahu jsme přidali 0,2 ml chloroformu (při zachování poměru 0,1 ml chloroformu na 0,5 ml Trisolu). Obsah jsme lehce protřepali rukou (10–20 sekund) s ohledem na to, aby nedošlo k zahřívání a mikrozkušavky jsme nechali stát při pokojové teplotě na ledu 2–3 minuty.

Následovala centrifugace po dobu 15 minut na 11 500 x G při 2–8 °C. Do nových mikrozkušavek typu eppendorf s 0,5 ml isopropanolu jsme přilili 0,75 ml vytvořeného supernatantu. Dbali jsme především na čistotu odebíraného obsahu, v případě možné kontaminace jsme odebrali objem nižší. Obsahy zkumavek jsme lehce promíchali a nechali jsme je stát 10 minut při pokojové teplotě.

Opět jsme zkumavky nechali centrifugovat na 10 minut při 11 x 500 G a teplotě 2–8 °C.

Otočením zkumavky jsme odlili vytvořený supernatant, pelet na dně zkumavek jsme zbavili zbylého isopropanolu. K sedimentu jsme napipetovali 1,5 ml vychlazeného ethanolu a obsah zkumavek jsme homogenizovali.

Mikrozkumavky jsme dali stočit na 5 minut do centrifugy při 11 500 x G, teplotě 2–8 °C. Mezitím jsme si připravili pracovní plochu v laminárním boxu, ve kterém jsme dále pracovali. Z centrifugovaných zkumavek jsme odlili supernatant a k peletu jsme přenesli 100 µl DEP-H₂O. Obsah jsme promíchali, 80 µl vzorku jsme přenesli do mikrozkumavky, 10 µl bylo použito na zkoušku RIN (RNA integrity number).

4.3 Stanovení integrity nukleových kyselin

Stanovení integrity izolovaných nukleových kyselin probíhalo na přístroji Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, USA). Princip analýzy spočívá v elektroforetickém dělení vzorků, které jsou nanášeny na čipy s kapilárami obsahujícími gel (RNA Nano Chip, Agilent Technologies, CA, USA). Pro kontrolu správného průběhu reakce je spolu se vzorky nanášen ladder. Vyhodnocení integrity eukaryotní RNA je prováděno na základě poměru mezi signály 18S a 28S ribozomální podjednotky. DNA integrita je také hodnocena podle výsledného elektroforeogramu, pouze vysoce neporušené molekuly migrují jako jediný fragment a jsou viditelné jako ostrý vrchol elektroforeogramu za vrcholem použitého ladderu (48 500 bp).

4.4 PCR reakce

Vzorky s DNA pro reakci PCR jsme naředili na koncentraci 10 ng/µl. Připravili jsme si PCR mix podle návodu.

5x PCR pufr:

250 mM KCl (Lachema, Brno, Česká republika)

50 mM TRIS-HCl, pH = 8,4 (73190, Serva, Heidelberg, SNR)

7,5 mM MgCl₂ (30391, Lachema, Brno, Česká republika)

1 mM dGTP, dATP, dTTP, dCTP (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

PCR mix pro 50 vzorků jsme si připravili odpipetováním příslušných objemů jednotlivých reagensů do mikrozkušavky a to:

18,3 µl primeru F (0,25 mM) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)

18,3 µl primeru R (0,25 mM) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)

216 µl 5x PCR total

266,4 µl TK H₂O

21 µl Red Taq DNA polymerázy (0,1 U/µl) (11615-036, Sigma-Aldrich, USA)

Výsledné koncentrace reagensů v roztoku jsou uvedeny v závorce.

Do jamek PCR destičky jsme odpipetovali 10 µl PCR mixu a následně přidali 10 µl naředěné DNA vzorků. Jamky se vzorky jsme uzavřeli víčky, aby nedošlo k jejich odpaření a PCR destičku jsme vložili do thermocycleru (PTC-220 DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Waltham, USA). V tom probíhala PCR reakce podle schématu:

Tabulka 1: Průběh polymerázové řetězové reakce

1)	Počáteční denaturace při teplotě 95,0 °C po dobu 3:00 minut
2)	Denaturace při teplotě 95,0 °C na 30 sekund
3)	Hybridizace při 55,0 °C po dobu 1:00 minuty
4)	Polymerace při teplotě 72,0 °C po dobu 1:00 minuty
5)	Opakování cyklu od kroku 2) 39x
6)	Polymerace při 72 °C po dobu 3:00 minut
7)	Ukončení reakce při 23 °C po dobu 2:00 minut

4.5 Restrikční štěpení

K restrikčnímu štěpení DNA dochází po přidání restrikčního mixu k izolovanému vzorku DNA. Restrikční mix se skládá z restrikčního enzymu a kultivačního media vytvářející podmínky potřebné pro aktivitu enzymu.

Na jeden vzorek je třeba:

0,5 μ l restrikčního enzymu (BioLabs, New England) - enzymy MseI (R0525S),
AluI (R0137S), BccI (R0704S), AleI (R0634S), BsaAI (R0531S) a MnlI (R0163S)

1,5 μ l CutSmart Buffer (B7204S, BioLabs, New England)

Do jednotlivých jamek destičky jsme si napipetovali 13 μ l vzorku a 2 μ l restrikčního mixu. Restrikce probíhala v termocycleru (PTC-220 DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Waltham, USA) při konstantní teplotě 37 °C. Čas reakce se odvíjí dle stáří použitého enzymu – od 4 hodin až po 18 hodin při použití staršího enzymu, kdy je třeba nechat restrikční štěpení probíhat přes noc.

4.6 Elektroforéza na agarózovém gelu

K rozdělení PCR produktů podle jejich velikosti lze využít elektroforetické dělení na agarózovém gelu, kdy se amplikony pohybují ve stejnosměrném elektrickém poli vzhledem k jejich náboji ke kladné elektrodě.

Na přípravu 1 l TBE pufru jsme použili:

108 g TRIS-base (Serva, Heidelberg, SRN)

55 g H₃BO₃ (Serva, Heidelberg, SRN)

40 ml 0,5M EDTA (pH = 8,0) (Serva, Heidelberg, SRN)

destilovaná voda

Čtyřprocentní agarózový gel jsme si připravili rozpuštěním 2,5 g agarózy MetaPhor (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, USA) a 1,25 g agarózy Sigma (Sigma – Aldrich, USA) ve 125 ml 0,5x TBE pufru a následným zahřátím v mikrovlnné troubě, dokud suspenze nezprůhlednila. Rozpuštěnou agarózu jsme nechali na 2–5 minut částečně vychladnout při pokojové teplotě. Poté jsme ke gelovému roztoku přidali 8 µl EtBr (Serva, Heidelberg, SRN). Gel jsme následně nalili do formy a vložili do něj hřebínek, jehož pomocí se v gelu vytvořili jamky. Gel jsme nechali tuhnout a uzrávat asi na 30–60 minut.

Po ztuhnutí gelu jsme jej vložili do horizontální aparatury na elektroforézu a zalili 0,5x TBE puftrem, dokud nebyl gel zcela ponořený. Do pufru v oblasti elektrod jsme pipetou přenesli 75 µl EtBr (cca 2/3 objemu k anodě a 1/3 ke katodě). V dalším kroku jsem do jamek gelu napipetovali vzorky a standardy. Do krajních pozic gelu jsme nanесли 3 µl standardu 50 bp a do zbylých jamek 10 µl vzorku. Nádobu s gelem jsme uzavřeli víkem a zapojili ji ke zdroji stejnosměrného napětí (GibcoBrl, Gaithersburg, USA) a napětí jsme nastavili na konstantní hodnotu 150 V. Elektroforetické dělení trvá nejčastěji 30–60 minut, jeho doba je úměrná velikosti dělicího se produktu. Po skončení elektroforézy jsme si výsledek elektroforetického dělení vyfotili pod UV světlem kamerou GeneGenius (Syngene, Cambridge, VB).

4.7 PCR-ELISA

Postupovali jsme podle protokolu (19).

Kvantifikace parazitů v orgánech myši byla provedena metodou PCR-ELISA, která amplifikuje a detekuje konzervativní sekvence v DNA parazitů. PCR-ELISA se skládá ze tří kroků – amplifikace, imobilizace a výsledné reakce. Na začátku je třeba připravit reakční směs. Vzhledem k vysoké citlivosti použitých primerů LOT: 1349J6 je třeba dbát na správnou koncentraci MgCl₂, která musí být 2 mM.

ELISA – promývací roztok:

2,5 ml Tween-20 roztok (St. Louis, Sigma-Aldrich, USA)

250 ml 20x PBS (Lachema, Brno, Česká republika)

Blokující pufr (8% FCS):

4 ml FCS (fetal bovine serum) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

46 ml 1x PBS (Lachema, Brno, Česká republika)

Na každý vzorek pro PCR o objemu 15 μ l případně:

0,1 μ l primeru (50 pmol/ μ l)

2 μ l 10x PCR pufru bez MgCl₂ (Sigma-Aldrich, P2317-1.5ML, St. Louis, USA)

0,8 μ l 50 mM MgCl₂ (2mM) (Sigma-Aldrich, M8266, St. Louis, USA)

0,1 μ l od každého 100 mM dNTP (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)

0,4 μ l Taq polymerázy (5 U/ μ l) (Invitrogen, 10342-020, ThermoFisher Scientific, California)

11,2 μ l dvakrát destilované vody

V závorce jsou uvedeny výsledné koncentrace reagensů v roztoku.

Do jamek destičky jsme napipetovali 15 μ l reakční směsi a 5 μ l vzorku DNA naředěné na 10 ng/ μ l. Připravili jsme si také pozitivní a negativní kontrolu. Jako pozitivní kontrola bylo použito 5 μ l parazitární DNA a jako negativní kontrola sloužila destilovaná voda. Jamky jsme překryli víčky a vložili do thermocycleru, kde probíhala klasická PCR reakce.

Jamky ELISA-destičky (Costar, Corning Incorporated, NY, USA) jsme potáhli 10 μ l streptavidinu (S4762, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) v 10 ml NaHCO₃ (Lachema, Brno, Česká republika) a nechali je v lednici přes noc inkubovat.

Další den jsme jamky čtyřikrát promyli promývacím roztokem. Po ověření produktů PCR reakce elektroforetickým dělením, které byly naředěny na 2% koncentraci (2 μ l PCR produktu a 98 μ l 2% FCS/PBS), jsme jimi naplnili destičku. Standardní křivku k vyhodnocení reakce jsme si připravili ředěním standardu dvojkovou řadou. Nejvyšší koncentraci standardu jsme připravili naředěním 4 μ l PCR produktu ve 196 μ l 2% FCS/PBS.

Po 2 hodinách inkubace při pokojové teplotě jsme destičku šestkrát promyli promývacím roztokem. Do jamek jsme napipetovali 100 μ l antidioxigenin-značených protilátek detekující Fab fragmenty a inkubovali je na 45–60 minut při pokojové teplotě.

K odstranění nespecificky navázaných látek jsme jamky osmkrát promyli promývacím roztokem. Poté jsme ke každé jamce odpipetovali 100 μ l ABTS substrátu (St. Louis, Sigma-Aldrich, USA) s H_2O_2 (Lachema, Brno, Česká republika) - 1 μ l 30% H_2O_2 na 1 ml ABTS substrátu. Po 5–15 minutách se objevila barevná reakce vhodná ke spektrofotometrickému měření. Na základě absorbance vzorku měřené pomocí spektrofotometru NanoDrop Spectrophotometer (ND-1000, Thermo Scientific) jsme kvantifikovali množství parazitů.

4.8 DNA typizace

Při genetické typizaci se využívá odlišnost v sekvenci DNA. Abychom odhalili tyto genetické rozdíly jednotlivých kmenů, využili jsme polymorfismů, které se vyskytují převážně v nekódujících oblastech, jedná se o tzv. genetické značky. Nejčastěji se jako molekulární markery používají repetitivní sekvence STR, polymorfismus lze také detekovat restriční analýzou SNP, kdy lze detekovat sekvence lišící se pouze jedním nukleotidem.

Při použití STR markerů probíhá klasická PCR reakce, během níž se jako primery volí právě STR markery.

4.9 Statistická analýza

Získaná data jsme analyzovali v programu Statistica 13 (TIBCO Software Inc., USA). K analýze dat je třeba jejich normální rozdělení, toho je možné docílit transformací dat.

Genotypy, spolu s pohlavím a věkem, byly stálými faktory, jako náhodný faktor bylo analyzováno číslo experimentu. Jako validní se jevily markery, pro jejichž P hodnotu platí $P < 0,05$. Pro získání signifikantních hodnot genomu byly P hodnoty pro tyto markery přepočteny pomocí vzorce (31):

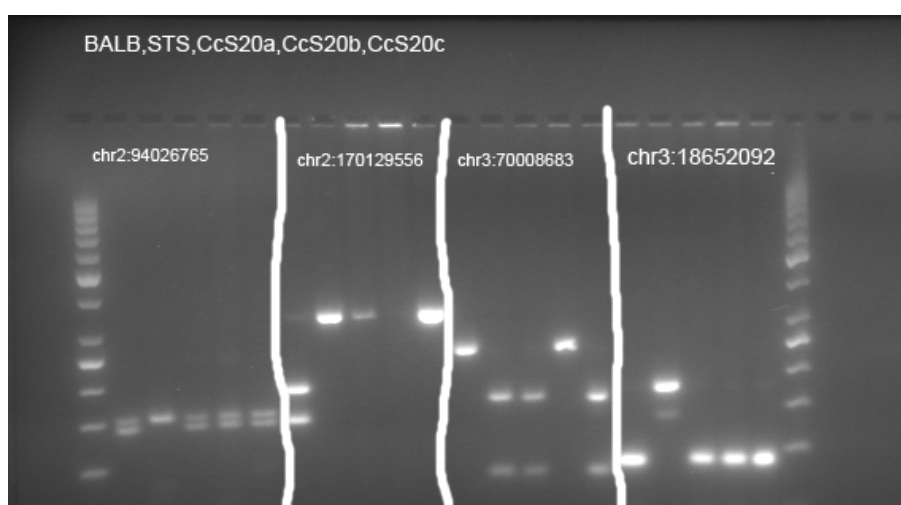
$$\alpha_{T^*} \approx [C + 2\rho Gh(T)]\alpha_T$$

kde α_{T^*} je korektní P hodnota, C je počet chromosomů segregujících během křížení mezi CcS-11 a BALB/c (pro CcS-11 x BALB/c je $C = 8$), $\rho = 1,5$ pro F_2 hybridy, $h(T)$ je hodnota získaná během statistické analýzy dat (F poměr) a α_T je P hodnota.

Výsledky statistické analýzy jsme zaznamenali do tabulky. Výsledky s P hodnotou nižší než 0,05 byly přepočteny podle uvedeného vzorce. Jako signifikantní byly označeny výsledky pro jejichž P hodnotu po korekci platí, že $P > 0,05$.

5 VÝSLEDKY

Při genetické typizaci se využívá odlišnost v sekvenci DNA. Využívá se polymorfismů vyskytujících se převážně v nekódujících oblastech. V praxi se nejčastěji jako molekulární markery využívají STR markery zachycující repetitivní sekvence a také SNP markery, kdy po provedení restriční analýzy můžeme detekovat i sekvence lišící se pouze v jednom nukleotidu. Snímek typizace pomocí SNP je uveden níže.



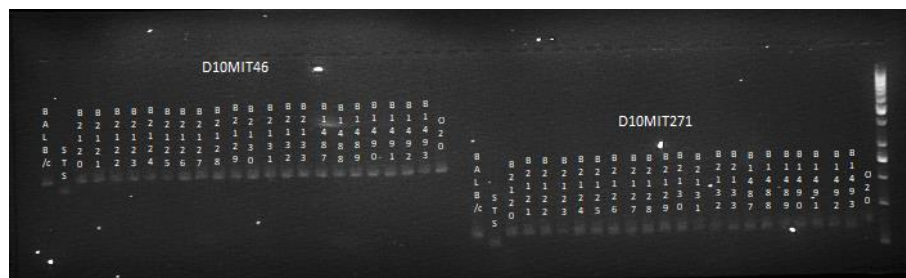
Obrázek 6: Snímek elektroforetického rozdělení fragmentů vzorků CcS20a, CcS20b a CcS20c použitím enzymů *MnII*, *AluI*, *BclI* a *MnII*

Na Obrázku 6 je zachycen výsledek elektroforézy vzorků CcS-20a, CcS-20b a CcS-20c po restrikci enzymy *MnII*, *AluI* a *BclI*. V prvních pozicích jsou kontrolní vzorky kmene BALB/c a STS, u kterých jsou patrné rozdíly v délkách restričních fragmentů. Podle nich jsme určili vzorky po restrikci enzymem *MnII* BALB/c původu. Restriční fragmenty po působení enzymů *AluI* a *BclI* ukazují u vzorku CcS-20a a CcS-20c na alely kmene STS. Vzorek CcS-20b vykazuje po restrikci enzymem *BclI* BALB/c původ, štěpné produkty enzymu *AluI* nejsou patrné, vzhledem k vyplavení vzorku během nanášení do jamky gelu.

Typizace jsme prováděli také pomocí mikrosatelitních markerů, které detekují repetitivní sekvence STR. Jedná se o polymorfismy vyskytující se napříč celým

genomem, a to především v euchromatinu eukaryotních buněk. Výsledek DNA typizace, která byla provedena v rámci paralelního pokusu laboratoře Oddělení molekulární a buněčné imunologie, je zachycen níže.

Jedná se o typizaci myšního kmenu 6354/XJ4 STR markery D10Mit46 a D10Mit271. Marker D10Mit46 ohraničuje sekvenční Chr10: 116384730-116384957 bp, marker D10Mit271 označující DNA sekvenční v místě Chr10: 124345946-124346062 bp. Spolu s kmenem XJ byly pro porovnání byly typizované základní kmeny BALB/c, STS a také kmen O20.

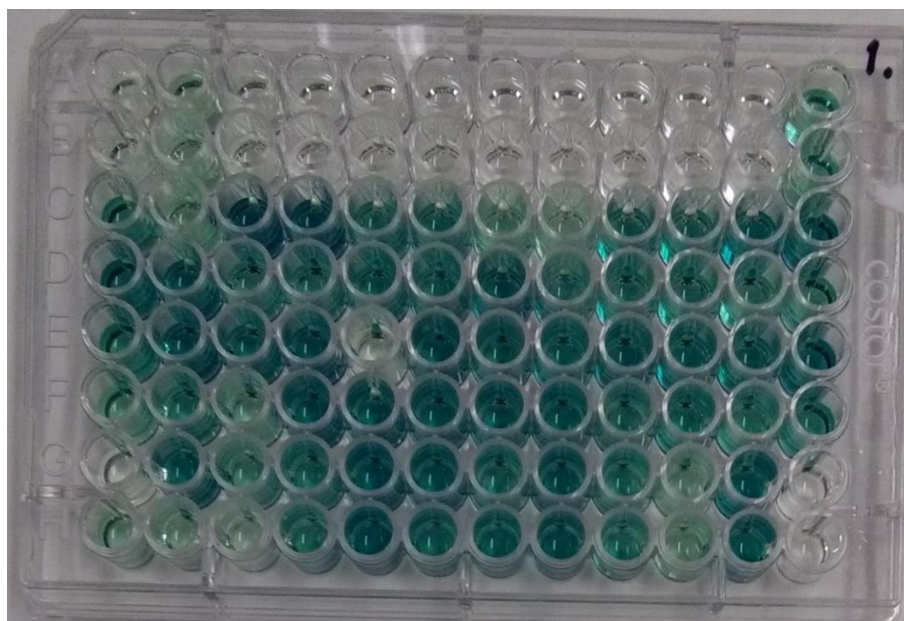


Obrázek 7: Snímek elektroforetického rozdělení fragmentů vzorků B2120-2133 a B1487-B1493 za použití markerů D10Mit46 a D10Mit271

Snímek elektroforetického dělení znázorňuje fragmenty DNA amplifikované markery D10Mit46 a D10Mit271. Při srovnání s kontrolními vzorky BALB/c a STS reprezentují všechny vzorky homozygoty se shodnou délkou fragmentů s alelou BALB/c. Také kmen O20 má délku fragmentu značenou markerem D10Mit46 shodnou s kmenem BALB/c, případně se může jednat o rozdíly menší než 6 pb a tyto rozdíly by pak mohly být detekovány elektroforetickým dělením s radioaktivním značením. Při značení markerem D10Mit271 je vzniklý fragment DNA kmene O20 kratší než fragmenty ostatních analyzovaných kmenů.

Dalším důležitým výchozím krokem během mapování genetické kontroly množství parazitů v orgánech myši je stanovení výsledného fenotypového projevu. Ke kvantifikaci množství parazitů v orgánech myši po infekci *L. major* jsme použili

metodu PCR-ELISA. Analyzovaná DNA byla z orgánů získána izolací proteinázou K, jejíž postup je, stejně jako postup metody PCR-ELISA, zmíněn v metodice práce.



Obrázek 8: PCR-ELISA detekující DNA parazitů v lymfatických uzlinách

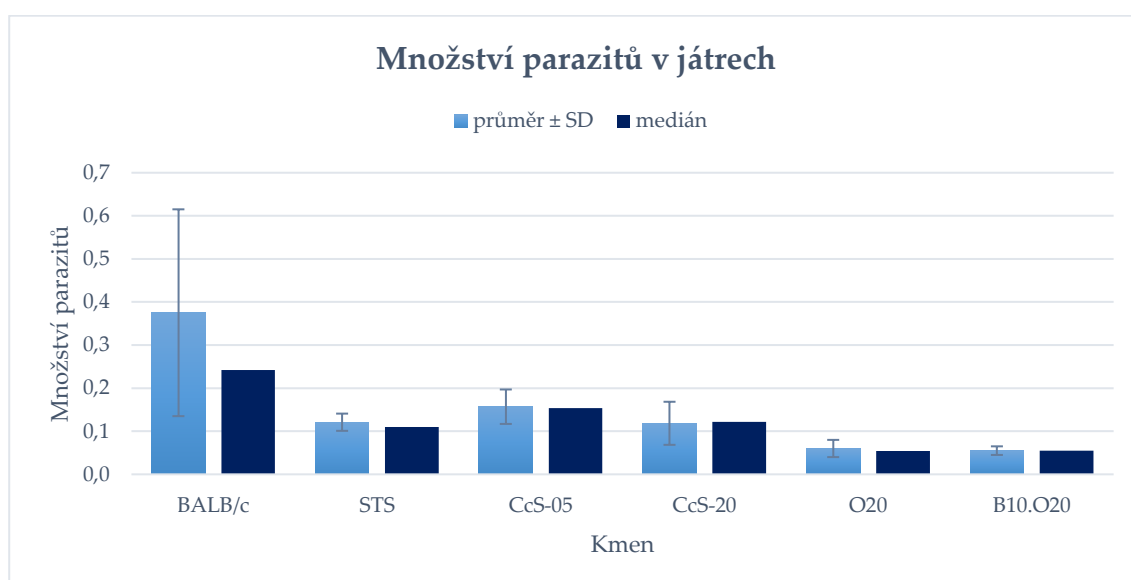
5.1 Výsledky kvantifikace množství parazitů v orgánech základních myších kmenů po infekci *L. major*

Detekci DNA parazitů v orgánech myší jsme provedli na základních kmenech, a to kmenech BALB/C (n=10), STS (n=10), CcS-05 (n=8), CcS-20 (n=11), O20 (n=8) a B10.O20 (n=13), kde n je počet analyzovaných myší. Mezi kmene citlivé k infekci způsobené parazity *Leishmania major* patří rekombinantní kongenní kmen B10.O20, který nese geny od kmene O20 na genetickém pozadí kmene B10 a také vysoce vnímavý kmen BALB/c. Rezistenci k infekci vykazují naopak kmene STS, O20 a kmen CcS-5. Kmen CcS-20 vykazuje střední odolnost.

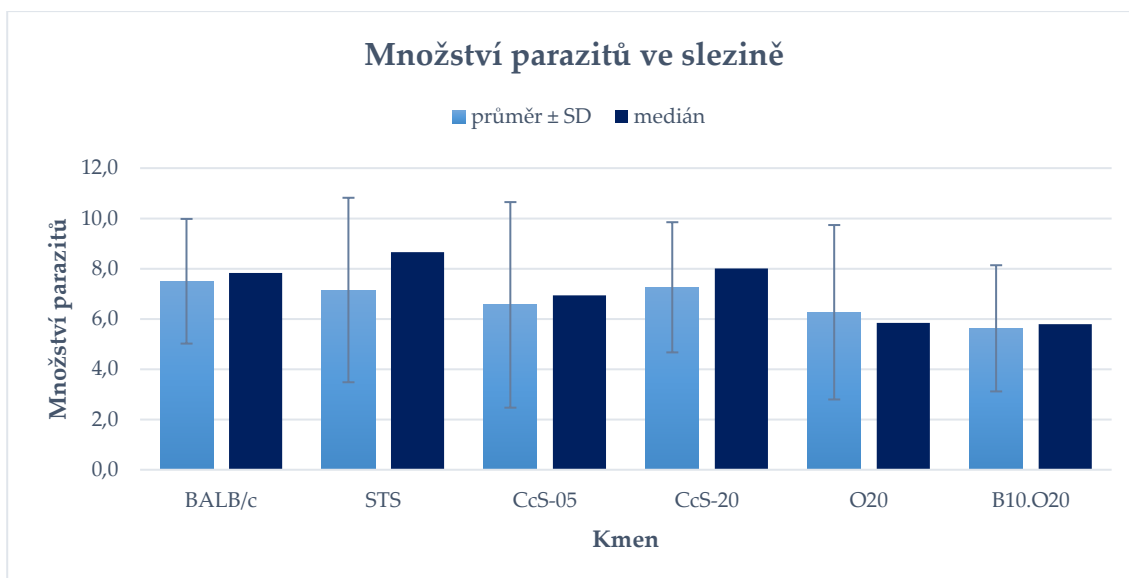
Ze získaných hodnot jsme spočetli aritmetický průměr jakožto statistický ukazatel. Výsledky analýzy množství parazitů v játrech, slezině a lymfatických uzlinách jsou shrnuty v Tabulce 2 a znázorněny ve formě grafů níže. Zkratkou SD je označena směrodatná odchylka.

Tabulka 2: Množství parazitů v orgánech základních kmenů po infekci *L. major*

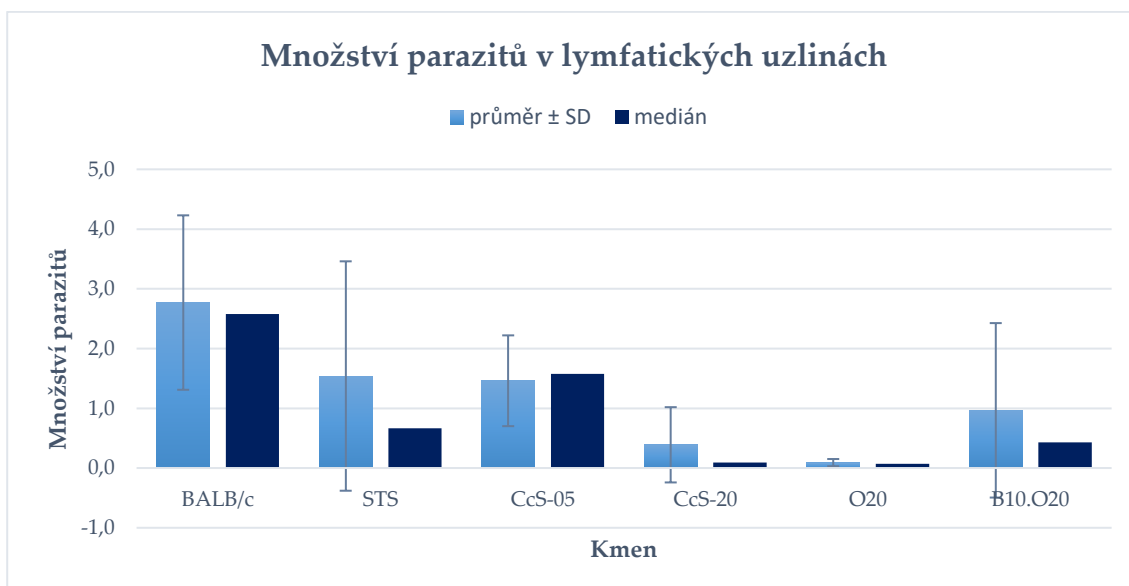
	Kmen					
	BALB/c	STS	CcS-05	CcS-20	O20	B10.O20
Množství parazitů v játrech (průměr ± SD)	0,375 ± 0,24	0,121 ± 0,02	0,157 ± 0,04	0,118 ± 0,05	0,06 ± 0,02	0,055 ± 4,8 × 10 ⁻³
Množství parazitů ve slezině (průměr ± SD)	7,499 ± 2,48	7,151 ± 3,67	6,559 ± 4,09	7,259 ± 2,59	6,266 ± 3,47	5,627 ± 2,51
Množství parazitů v lymfatických uzlinách (průměr ± SD)	2,77 ± 1,46	1,54 ± 1,92	1,46 ± 0,76	0,39 ± 0,63	9,1 × 10 ⁻² ± 0,06	0,97 ± 1,46



Obrázek 9: Graf množství parazitů v játrech jednotlivých myších kmenů po infekci *L. major*



Obrázek 10: Graf množství parazitů ve slezině jednotlivých myších kmenů po infekci *L. major*



Obrázek 11: Graf množství parazitů v lymfatických uzlinách jednotlivých myších kmenů po infekci *L. major*

Z grafického znázornění výsledků detekce množství parazitů v játrech, slezině a lymfatických uzlinách po infekci *L. major* je patrné, že největší množství parazitů bylo zachyceno u velmi citlivého kmene BALB/c. V případě detekce parazitů v játrech a ve slezině vykazoval druhý vnímavý kmen B10.O20 nejnižší počet parazitů.

V játrech a lymfatických uzlinách rezistentních kmenů a středně odolného CcS-20, bylo naměřeno menší množství parazitů, než u vysoce vnímavého kmene BALB/c. U výsledků detekce parazitů ve slezině se rozdíl v počtu parazitů detekovaných v orgánu značně stírá.

Na základě těchto výsledků lze tedy říci, že množství parazitů v orgánech myši je zřejmě geneticky ovlivněno. Jelikož se však jedná o základní kmeny, nikoliv o F2 generaci, nelze na těchto výsledcích provést mapování kandidátních genů a provést statistickou analýzu vazby.

5.2 Výsledky mapování genů kontrolující množství parazitů v orgánech myši po infekci *L. major*

K určení kontroly množství parazitů v orgánech myši po infekci *L. major* a ke statistickému zpracování byly použity data experimentu (Distinct genetic control of parasite elimination, dissemination, and disease after *Leishmania major* infection) analyzujícího počty parazitů ve slezinách, uzlinách a játrech a detekujícího hladiny IFN γ , IL-12 a IL-4 v séru u F2 kříženců mezi kmeny BALB/c a CcS-11.

Získaná data jsme analyzovali v programu Statistica 13 (TIBCO Software Inc., USA). K analýze dat bylo třeba jejich normální rozdělení, toho jsme docílili transformací dat. U sleziny byla data transformována $x = \log(a) + 5$, data lymfatických uzlin byla transformována $x = \log(a \times 100)$, kde písmenem *a* označena výchozí hodnota.

Nejprve jsme provedli statistickou analýzu každého genu zvlášť a to na myších samicích, které vykazovaly vyšší signifikanci. Poté byla provedena analýza také u samců a analýza obou pohlaví.

Výsledky statistické analýzy jsou zaznamenány v Tabulce 3. Zkratkou NS jsou označeny nesignifikantní výsledky, tedy výsledky s $P > 0,05$. Jako signifikantní byly

po přepočtu označeny výsledky s opravenou P hodnotou vyšší než 0,05. Písmenem C je v Tabulce 3 označena přítomnost alely kmene BALB/c, S označuje přítomnost alely kmene STS a n označuje počet myší.

Tabulka 3: Analýza vazby genů, které ovlivňují množství parazitů ve slezině a v lymfatických uzlinách kmene CcS11

Fenotyp	Analyzovaná skupina	Marker	Genotyp			P hodnota	Opravená P hodnota
			CC	CS	SS		
Množství parazitů ve slezině	Obě pohlaví	D10Mit12	5,67 ± 1,33 (n=57)	5,12 ± 1,31 (n=144)	5,00 ± 1,40 (n=77)	1,91 × 10 ⁻⁴	1,04 × 10 ⁻²
		D10Mit46	5,65 ± 1,29 (n=59)	5,17 ± 1,32 (n=144)	4,89 ± 1,4 (n=75)	3,96 × 10 ⁻³	NS
	Samice	D10Mit12	5,19 ± 1,36 (n=30)	4,42 ± 1,19 (n=66)	4,26 ± 1,04 (n=45)	2,53 × 10 ⁻⁴	1,37 × 10 ⁻²
		D10Mit46	5,02 ± 1,26 (n=26)	4,42 ± 1,19 (n=67)	4,26 ± 1,09 (n=48)	9,37 × 10 ⁻³	NS
	Samci	D10Mit12	6,20 ± 1,11 (n=27)	5,71 ± 1,14 (n=78)	6,04 ± 1,19 (n=32)	0,179	NS
		D10Mit46	6,15 ± 1,09 (n=33)	5,72 ± 1,12 (n=77)	6,01 ± 1,19 (n=27)	7,58 × 10 ⁻²	NS
Množství parazitů v lymfatických uzlinách	Obě pohlaví	D1Mit403	5,93 ± 1,21 (n=67)	5,94 ± 1,18 (n=164)	5,53 ± 1,12 (n=66)	1,93 × 10 ⁻⁴	6,22 × 10 ⁻³
		D10Mit46	6,16 ± 1,02 (n=56)	5,86 ± 1,18 (n=147)	5,54 ± 1,28 (n=75)	6,99 × 10 ⁻³	NS
		D19Mit51	5,96 ± 1,14 (n=77)	5,87 ± 1,18 (n=130)	5,71 ± 1,25 (n=79)	0,156	NS
	Samice	D1Mit403	5,32 ± 1,13 (n=35)	5,16 ± 1,09 (n=68)	4,87 ± 0,83 (n=36)	2,13 × 10 ⁻³	6,22 × 10 ⁻²
		D10Mit46	5,59 ± 1,02 (n=24)	5,12 ± 0,98 (n=68)	4,89 ± 1,10 (n=47)	4,38 × 10 ⁻³	NS
		D19Mit51	5,54 ± 0,96 (n=36)	4,96 ± 1,02 (n=58)	4,99 ± 1,08 (n=45)	2,72 × 10 ⁻³	NS
	Samci	D1Mit403	6,63 ± 0,94 (n=29)	6,59 ± 0,82 (n=79)	6,36 ± 0,94 (n=27)	0,259	NS
		D10Mit46	6,59 ± 0,80 (n=32)	6,49 ± 0,95 (n=77)	6,69 ± 0,67 (n=26)	0,892	NS
D19Mit51		6,35 ± 1,19 (n=39)	6,65 ± 0,66 (n=63)	6,62 ± 0,74 (n=33)	0,934	NS	
		D8Mit85	6,47 ± 0,74 (n=32)	6,84 ± 0,55 (n=44)	6,58 ± 0,88 (n=19)	4,92 × 10 ⁻²	NS

Pro markery D10Mit12 a D10Mit46, které u výsledků sleziny pro samice a pro obě pohlaví splňují podmínku $P < 0,05$, byla následně provedena statistická analýza vzájemné interakce a vlivu na výsledný fenotyp. Tento postup jsme opakovali také pro další markery uvedené v Tabulce 3. Některé z těchto markerů měly P hodnotu pouze hraniční či nesignifikantní. I pro tyto markery byla provedena analýza ke zjištění, zda některý z dalších markerů nezesílí vliv jinak nevýznamného markeru.

Analýza byla opět, vzhledem k velkému vlivu pohlaví, zpočátku prováděna na myších samicích, poté byla statistika provedena u samců a u obou pohlaví. Výsledky této analýzy jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 4: Analýza kontroly množství parazitů v orgánech myši kombinací markerů

Fenotyp	Analyzovaná skupina	Markery	P hodnota	Opravená P hodnota
Množství parazitů ve slezině	Obě pohlaví	D10Mit12*D10Mit46	$6,65 \times 10^{-2}$	NS
	Samice	D10Mit12*D10Mit46	NS	NS
	Samci	D10Mit12*D10Mit46	NS	NS
Množství parazitů v lymfatických uzlinách	Obě pohlaví	D8Mit85*D10Mit46	$1,43 \times 10^{-3}$	NS
		D10Mit46*D19Mit51	$2,21 \times 10^{-2}$	NS
		D1Mit403*D10Mit46*D8Mit85	$4,33 \times 10^{-2}$	NS
	Samice	D8Mit85*D10Mit46	$2,44 \times 10^{-2}$	NS
		D10Mit46*D19Mit51	NS	NS
		D1Mit403*D10Mit46*D8Mit85	$3,01 \times 10^{-2}$	NS
	Samci	D8Mit85*D10Mit46	$3,22 \times 10^{-2}$	NS
		D10Mit46*D19Mit51	NS	NS

Při analýze vzájemné interakci genů je třeba nejprve vyloučit možnost vzájemné vazby. K vyloučení možnosti vazby mezi geny a k zamezení případně falešně

pozitivních výsledků jsme si mohli v databázi Mouse Genome Informatics (přístupné na internetové adrese www.informatics.jax.org) vyhledat pozici těchto genů.

Po přepočtu získaných hodnot vzorcem uvedeným v metodice statistické analýzy na straně 48 však vykazovali interakci pouze geny označené markery D8Mit85 a D10Mit46 a to pouze při analýze na pohlaví nezávislé. Po korekci *P*-hodnoty interakcí pro celý genom, kdy je třeba výslednou hodnotu vynásobit dvěma, byla vzájemná interakce vyloučena.

6 DISKUZE

Cílem práce bylo seznámení se s metodami molekulární biologie s cílem nalezení genetické kontroly množství parazitů v orgánech myši infikované *L. major*. Mým úkolem bylo, mimo jiné, naučit se pomocí metody PCR-ELISA, která detekuje specifické konzervativní DNA sekvence v genomu leishmanií, určit množství parazitů v orgánech myši po infekci tímto parazitem. Použitím vhodných mikrosatelitních markerů měly být analyzovány genetické sekvence s nalezením polymorfismů DNA. Na základě získaných dat byla následně provedena statistická analýza určení vazby a byly určeny kandidátní lokusy.

Pro DNA typizaci jsme použili STR markery, které zachycují krátké tandemové repetice napříč celým genomem a jejichž podoby jsou mezi jedinci velmi variabilní. I přes narůstající popularitu SNP markerů se zdá použití těchto mikrosatelitních markerů během zachycování polymorfismů jednodušší. STR markery jsou totiž oproti SNP markerům, pro které existuje pouze omezené množství alel (obvykle dvě pro jeden lokus), vysoce polymorfní. Také vzhledem k snadné amplifikaci PCR stačí jen malé množství templátové DNA. Další výhodou použití právě těchto mikrosatelitních markerů během typizace je vznik větších a snáze detekovatelných ampliconů. Oproti práci s SNP markery, které jsou sice stálejší a existuje pro ně méně mutací, odpadá při typizaci krok s restričním štěpením a toto provedení je tedy rychlejší a také levnější. Při analýze velkého počtu vzorků (v našem případě 300) je tedy vhodnější použití STR markerů (32).

Během práce s STR markery je však třeba dbát na rozdíly délky ampliconů, které vznikají mezi jednotlivými kmeny po použití markeru. Aby došlo k zřetelnému rozlišení fragmentů ohraničených těmito markery na agarózovém gelu, mělo by se jednat o délkový rozdíl nejméně 6 nukleotidů. Tyto rozdíly jsou patrnější při použití SNP markerů, při jejichž použití vznikají menší fragmenty a i rozdíl 6 nukleotidů je

pak zřetelnější. Poté je třeba polymorfismus detekovat jiným způsobem než klasickou gelovou elektroforézou, například radioaktivním značením.

Pro detekci parazitů byla zvolena PCR-ELISA, která na rozdíl od klasické ELISA metody zachycuje namísto proteinů specifické nukleotidové sekvence. Ke zjištění množství parazitů v orgánech či k jejich průkazu lze použít mimo PCR-ELISA také mikroskopické techniky, buněčné kultury, přímý aglutinační test, imunofluorescenční detekce. Mikroskopické a kultivační postupy jsou stále považovány vzhledem ke své vysoké specifitě za zlatý standard při průkazu parazitů. Tyto metody jsou oproti námi použité PCR-ELISA metodě časově náročné a také citlivost metod je závislá na množství parazitů v bioptickém materiálu (32).

Spojení amplifikace pro parazita specifických a konzervativních DNA sekvencí spolu se specifickou enzymatickou detekcí nám dává možnost specificky prokázat a detekovat i malé množství parazitů, metoda je tedy nejen specifická, ale také dostatečně citlivá. PCR-ELISA tedy je k průkazu parazitů *L. major* vhodnější než mikroskopie či buněčné kultury, a to především ve vzorcích s menším množstvím parazitů (32).

Nejprve jsme provedli detekci parazitů v orgánech základních a rekombinantních kongenních myších kmenů. Výsledky této kvantifikace zachycují grafy na Obrázku 9, 10 a 11 v kapitole Výsledky. Předpokládali jsme největší množství parazitů v orgánech vysoce vnímavého kmene BALB/c a tato hypotéza se také potvrdila. Kmeny k infekci rezistentní po infekci *L. major* vykazovaly, vyjma výsledků detekce parazitů ve slezině, nižší hodnoty. Relativně nízké množství parazitů bylo detekováno v orgánech vnímavého kmene B10.O20. Patrně se jedná o silnou zánětlivou reakci vůči parazitům, která následně vede k orgánové patologii.

Průběh infekce u rezistentních kmenů totiž podléhá kontrole adaptivní imunitní odpovědi zprostředkované Th1 lymfocyty. Prostřednictvím NO syntázy makrofágů

dochází k oxidaci L-argininu na oxid dusnatý, který může narušit Fe-dependentní enzymatické cesty nezbytné k přežití amastigotů v makrofázích. Dochází tak ke snížení počtu parazitů a hostitel se po této obranné reakci stává imunní proti následné infekci *L. major*. I přesto v místech infekce a také v lymfatických uzlinách dále přetrvává stálá populace parazitů (33).

Příčinou vysokého počtu parazitů ve slezině u všech kmenů a nezřetelných rozdílů mezi vnímavými a rezistentními myšimi kmeny k infekci *L. major* je odlišný průběh infekce v tomto orgánu. Na rozdíl od jiných orgánů, jako jsou například právě námi analyzované lymfatické uzliny. Ve slezině nedochází ke stejnému spontánnímu ničení parazitů prostřednictvím oxidu dusného. Aktivita zánětlivé NO syntázy je pouze přechodná. Dochází ke ztrátě cytotoxické aktivity makrofágů, která může být způsobená také jejich sekundárním dozráváním či jejich diferenciací po vystavení zánětlivému prostředí sleziny (33).

Genetický vliv na množství parazitů po infekci *L. major* byl zkoumán pomocí statistické analýzy dat. Na základě výsledků publikovaných v článku *Distinct genetic control of parasite elimination, dissemination, and disease after Leishmania major infection* lze usoudit, zda je statistické vyhodnocení a zda jsou hodnoty uvedené v Tabulce 3 a Tabulce 4 správné (31).

Z výsledků lze usoudit, že množství parazitů v lymfatických uzlinách je kontrolováno genem, který je značen markerem D1Mit403. Jedná se o segment DNA na 1. chromozomu označovaný jako *Lmr20*. Vliv tohoto lokusu na množství parazitů v lymfatických uzlinách byl však prokázán pouze u samic či u obou pohlaví, pro myši samce se tato hypotéza nepotvrdila. Parazitární zátěž ve slezině je kontrolována segmentem DNA, který detekujeme markerem D10Mit12. Jedná se o lokus ležící na 10. chromozomu značený jako *Lmr5*. Také pro tento lokus vykazovaly signifikantní výsledky pouze samice či obě pohlaví.

Z výsledků uvedených v Tabulce 3 je kromě již zmíněných kandidátních genů také patrný vliv pohlaví na množství parazitů jak v lymfatických uzlinách, tak také ve slezině. U samice kmene CcS-11 byl detekován i tisícinásobek parazitů v obou analyzovaných orgánech. Výsledky tak poukazují na možnost rozdílného působení genů kontrolujících citlivost na *L. major* u obou pohlaví. Tento předpoklad byl prokázán také v dalších pracích, například Slapničková et al. uvádí vliv pohlaví na množství parazitů v lymfatických uzlinách (34).

Ve srovnání publikovaných dat a dat uvedených v tabulkách v kapitole Výsledky se některé hodnoty značně liší. Tyto rozdíly jsou důsledkem rozdílné úpravy získaných dat. V případě statistického zpracování dat publikovaných v uvedeném článku nedošlo ke stejné transformaci dat, jako v našem případě. S cílem získání normálního rozlišení byla data získaná při detekci parazitů ve slezině upravena podle vzorce $x = \log(a) + 5$, výsledky měření u lymfatických uzlin byly transformovány podle vzorce $x = \log(a \times 100)$. Písmenem *a* je označena výchozí naměřená hodnota.

Na základě takto odlišně upravených dat dochází tedy také k rozdílům v hodnotách hodnoty *P*. V závěru obou statistických analýz však nacházíme shodu. A to nalezení lokusů kontrolující množství parazitů v orgánech myši po infekci *Leishmania major*, lokus *Lmr20* na 1. chromozomu ovlivňující množství parazitů v lymfatických uzlinách a lokus *Lmr5* kontrolující množství parazitů ve slezině.

Shrnutí výsledků je znázorněno v Tabulce 5. Jsou zde popsány lokusy a jejich pozice na chromosomu, včetně jejich dalšího působení během infekce *L. major* (31). Detekované lokusy ovlivňují několik odlišných znaků. Možnou příčinou rozmanité aktivity obou lokusů může být jak přítomnost několika genů ovlivňující odlišné znaky, tak schopnost jednoho genu ovlivnit několik fenotypových znaků. Tento problém by měl být vyřešen pomocí rekombinantní analýzy, jejíž výsledky by znamenaly další důležitý pokrok v pochopení reakce organismu na infekci.

Tabulka 5: Shrnutí výsledků kontroly množství parazitů v lymfatických uzlinách a ve slezině

Marker	Chromosom	Lokus	Pozice (cM)	Kontrolovaný znak
D1Mit403	1	<i>Lmr20</i>	100	Množství parazitů v lymfatických uzlinách, sérový IgE, sérový IFN γ
D10Mit12	10	<i>Lmr5</i>	56,0	Velikost lézí, množství parazitů ve slezině, sérový IgE, sérový INF γ , sérový IL-4

Při studiích vazby mezi fenotypem a markerem kvantitativních znaků však nemusíme vždy jejich vazbu prokázat. A tak i přesto není možné vyloučit přítomnost vazby. Geny mohou mít třeba pouze menší účinek na výsledný projev znaku.

Během statistické analýzy jsme také analyzovali možnou interakci mezi markery. Výsledky v Tabulce 4 ukazují možné spolupůsobení markeru D10Mit12 a markeru D10Mit46 při kontrole množství parazitů ve slezině, a to pro obě pohlaví. Po provedení korekce se tato možnost však nepotvrdila. Možnost interakce markerů uvedených rovněž v Tabulce 4, které vykazují možnost vzájemného působení při kontrole množství parazitů v lymfatických uzlinách, se po provedení korekce rovněž nepotvrdila.

Množství parazitů, a především projevy infekce, jsou řízeny několika různými geny a to nejen u myši, ale také u lidí. Polymorfní geny ovlivňující množství parazitů v napadeném orgánu, ale také geny ovlivňující imunitní systémovou reakci, mají za následek rozdílný průběh onemocnění. A naopak, stejné klinické symptomy mohou být u různých jedinců způsobeny odlišnými patologickými cestami. Tyto odlišné cesty infekce mají za následek rozdílnou odpověď na stejný způsob léčby u nakažených se shodným fenotypovým projevem.

Nalezením genů, které řídí imunitní odpověď či patologii jednotlivých orgánů, nebo naopak genů, které se uplatňují při eliminaci parazitů nebo potlačení infekce,

dochází k pokroku v oblasti funkčních imunologických studiích a pochopení této interakce mezi parazitem a imunitním systémem hostitele je důležitý pro pochopení vzniku a rozvoji onemocnění.

7 ZÁVĚR

S pomocí metod molekulární biologie a pomocí vazebné analýzy byly prokázány dva lokusy ovlivňující množství parazitů v orgánech myši po nákaze *L. major*. Jedná se o lokus *Lmr20* na 1. chromosomu, který kromě kontroly množství parazitů v lymfatických uzlinách také ovlivňuje hladiny protilátek IgE a hladinu INF γ . Na 10. chromosomu se nachází lokus *Lmr5* ovlivňující množství parazitů ve slezině anebo má také vliv na velikost kožních lézí.

Při detekci polymorfismů v DNA sekvencích jsme použili STR markery, které mají vyšší diskriminační schopnost a jejichž použití je z hlediska finanční i časové náročnosti vhodnější. Pro stanovení množství parazitů v orgánech myši po infekci *L. major* jsme použili metodu PCR-ELISA, která zachycuje sekvence DNA charakteristické pro tyto parazity. Pomocí této metody bylo detekováno jejich největší množství u vysoce citlivého kmene BALB/c.

Nalezení genů přímo ovlivňující imunitní odpověď organismu, či genů zodpovídající za patologii napadených orgánů, by znamenalo pokrok v oblasti imunologických studií. Jelikož dosud nebyl objasněn vztah mezi množstvím patogenů v organismu a klinickými projevy, mohlo by spolu s odpovědí na tuto otázku dojít k pochopení patofyziologie infekčního onemocnění.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AV ČR – Akademie věd České republiky

BAC – Umělé bakteriální chromosomy (bacterial artificial chromosome)

bp – Pár bazí (base pair)

cDNA – DNA vzniklá reverzní transkripcí (complementary DNA)

cM – Centimorgan

Cre – Cyclization recombinase

DEPC – Diethylpyrokarbonát

DIG – Digoxigenin

DNA – Deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

dNTP – Deoxyribonukleotid trifosfát

dUTP – Deoxyuridin trifosfát

EDTA – Kyselina ethylendiamintetraoctová

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

EtBr – Ethidiumbromid

F1 – První filiální generace

F2 – Druhá filiální generace

FCS – Fetální bovinní sérum

GAČR – Grantová agentura České republiky

HUGO – Human Genome Project

INF γ – Interferon γ

IgE – Imunoglobulin E

IL - Interleukin

Lmr – *Leishmania major* response

LoxP – Locus of X-over P1

MgCl₂ – Chlorid hořečnatý

NK – Nukleové kyseliny

NO – Oxid dusnatý

PBS – Fosfátový pufr (phosphate buffer solution)

PCR – Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

QTL – Lokusy kvantitativních znaků (quantitative trait locus)

RNA – Ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)

SD – Směrodatná odchylka

SDS – Sodium dodecylsulfát

SNP – Jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)

STR – Krátké tandemové repetitivní sekvence (short tandem repeat)

Taq – *Thermus aquaticus*

TBE – Tris-borát-EDTA

TK H₂O – Tkáňová voda

ÚMG – Ústav molekulární genetiky

YAC – Umělé kvasinkové chromosomy (yeast artificial chromosomes)

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) Leishmaniasis. *World Health Organization* [online]. © WHO 2018, 2018 [cit. 2018-03-14]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
- (2) HAVELKOVÁ, H., J. BADALOVÁ, M. SVOBODOVÁ, J. VOJTÍŠKOVÁ, I. KUREY, V. VLADIMIROV, P. DEMANT a M. LIPOLDOVÁ. Genetics of susceptibility to leishmaniasis in mice: four novel loci and functional heterogeneity of gene effects. *Genes and Immunity* [online]. 2006, 7(3), 220-233 [cit. 2017-10-27]. DOI: 10.1038/sj.gene.6364290. ISSN 1466-4879. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.gene.6364290>
- (3) ALVAR, Jorge, Iván VÉLEZ, Caryn BERN et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*. 2012, 7(5), 35671-. DOI: 10.1371/journal.pone.0035671. ISSN 1932-6203. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- (4) JÍRA, Jindřich. *Lékařská protozoologie: protozoální nemoci*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009. ISBN 978-80-7262-381-5.
- (5) Leishmaniasis: Epidemiological situation. In: *World Health Organization* [online]. Geneva: © WHO 2018, b.r. [cit. 2018-03-13]. Dostupné z: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>
- (6) WEINA, Peter J., Ronald C. NEAFIE, Glenn WORTMANN, Mark POLHEMUS a Naomi E. ARONSON. Old World Leishmaniasis: An Emerging Infection among Deployed US Military and Civilian Workers. *Clinical Infectious Diseases*. 2004, 39(11), 1674-1680. DOI: 10.1086/425747. ISSN

1058-4838. Dostupné také z: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/425747>

- (7) VOTÝPKA, Jan a Jovana SÁDLOVÁ. Jak zničit ničivku...: aneb Leishmanióza: opomíjená nemoc na postupu. *Vesmír*. Vesmír s.r.o., 2014, **280**(5). ISSN 0042-4544.
- (8) KOBETS, T., H. HAVELKOVÁ, I. GREKOV et al. Genetics of Host Response to *Leishmania tropica* in Mice – Different control of skin Pathology, Chemokine Reaction, and Invasion into Spleen and Liver. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012, **6**(6), 1667-. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001667. ISSN 1935-2735. Dostupné také z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001667>
- (9) LIPOLDOVÁ, Marie a Peter DEMANT. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews Genetics*. 2006, **7**(4), 294-305. DOI: 10.1038/nrg1832. ISSN 1471-0056. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg1832>
- (10) Medicínské centrum Praha. In: *Medicínské centrum Praha* [online]. Praha: Medicínské centrum Praha, 2015 [cit. 2017-11-02]. Dostupné z: <http://www.mc-praha.cz/parazitarni-nemoci>
- (11) PACE, David. Leishmaniasis. *Journal of Infection*. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016344531400228X>, 2014, **1**(69), 10-18. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>. ISSN 0163-4453.
- (12) ŠEDA, Ondřej, František LIŠKA a Lucie ŠEDOVÁ. Komparativní genomika. *Aktuální genetika: Multimediální učebnice biologie, genetiky a genomiky* [online]. Praha: Ústav biologie a lékařské genetiky 1.LF UK a VFN,

2006 [cit. 2018-01-24]. Dostupné z:
http://biol.lfl.cuni.cz/ucebnice/komparativni_genomika.htm

- (13) Model organisms in genetics research: the mouse. *BigPicture: Bringing cutting-edge science into the classroom and beyond* [online]. London: Creative Commons Attribution 4.0 licence, 2014 [cit. 2017-11-09]. Dostupné z: <https://bigpictureeducation.com/model-organisms-genetics-research-mouse>
- (14) PETERS, Luanne, Raymond ROBLED, Carol BULT, Gary CHURCHILL, Beverly PAIGEN a Karen SVENSON. The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nature Reviews Genetics*. 2007, 8(1), 58-69. DOI: 10.1038/nrg2025. ISSN 1471-0056. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg2025>
- (15) CHINWALLA, Asif, Lisa COOK, Kimberly DELEHAUNTY et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002, 420(6915), 520-562. DOI: 10.1038/nature01262. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature01262>
- (16) Why use the mouse in research?. *Yourgenome* [online]. Cambridge, 2017 [cit. 2017-11-10]. Dostupné z: <https://www.yourgenome.org/facts/why-use-the-mouse-in-research>
- (17) MULLEROVA, J. Use of Recombinant Congenic Strains in Mapping Disease-Modifying Genes. *News in Physiological Sciences*. 2004, 19(3), 105-109. DOI: 10.1152/nips.01512.2003. ISSN 0886-1714. Dostupné také z: <http://nips.physiology.org/cgi/doi/10.1152/nips.01512.2003>

- (18) DEMANT, Peter. Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer. *Nature Reviews Genetics*. 2003, 4(9), 721-734. DOI: 10.1038/nrg1157. ISSN 1471-0056. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg1157>
- (19) GUSAREVA, Elena, Iryna KUREY, Igor GREKOV a Marie LIPOLDOVÁ. Genetic regulation of immunoglobulin E level in different pathological states: integration of mouse and human genetics. *Biological Reviews*. 2014, 89(2), 375-405. DOI: 10.1111/brv.12059. ISSN 14647931. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/brv.12059>
- (20) ZHU, Mengjin a Shuhong ZHAO. Candidate Gene Identification Approach: Progress and Challenges. *International Journal of Biological Sciences*. 2007, 3(7), 420-427. DOI: 10.7150/ijbs.3.420. ISSN 1449-2288. Dostupné také z: <http://www.ijbs.com/v03p0420.htm>
- (21) CARTER, Matt a Jennifer SHIEH. Making and Using Transgenic Organisms. *Guide to Research Techniques in Neuroscience* [online]. Elsevier, 2015, , 253-271 [cit. 2018-03-13]. DOI: 10.1016/B978-0-12-800511-8.00012-5. ISBN 9780128005118. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128005118000125>
- (22) BADALOVÁ, J., M. SVOBODOVÁ, H. HAVELKOVÁ et al. *Separation and mapping of multiple genes that control IgE level in Leishmania major infected mice*. 2002, 3(4), 187-195. DOI: 10.1038/sj.gene.6363838. ISSN 1466-4879. Dostupné také z: <http://www.nature.com/articles/6363838>
- (23) MILES, C. a M. WAYNE. Quantitative Trait Locus (QTL) Analysis. *Scitable: byNatureEducation* [online]. Nature Education, 2008, 1(1), 208 [cit. 2017-11-24].

Dostupné z: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/quantitative-trait-locus-qtl-analysis-53904>

- (24) FOX, James. *The mouse in biomedical research*. 2nd ed. Boston: Elsevier, AP, 2007. ISBN 01-236-9457-4.
- (25) SUE, Mei, Swee YEAP, Abdul OMAR a Sheau TAN. Application of PCR-ELISA in Molecular Diagnosis. *BioMed Research International*. 2014, **2014**, 1-6. DOI: 10.1155/2014/653014. ISSN 2314-6133. Dostupné také z: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/653014/>
- (26) KOBETS, T., BADALOVÁ, J., GREKOV, I., HAVELKOVÁ, H., SVOBODOVÁ, M. a M. LIPOLDOVÁ. Leishmania parasite detection and quantification using PCR-ELISA. *Nature Protocols*. 2010, **5**(6), 1074-1080. DOI: 10.1038/nprot.2010.68. ISSN 1754-2189. Dostupné také z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2010.68>
- (27) TOMAN, Miroslav. *Praktická cvičení z imunologie*. 2. vydání - dotisk. Brno: VFU (Brno) : Výzkumný ústav veterinárního lékařství, 2008. ISBN 80-902963-6-X.
- (28) ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 978-80-210-3841-7.
- (29) BARBAS, Carlos, Dennis BURTON, Jamie SCOTT a Gregg SILVERMAN. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2010, **2007**(11), 47-. DOI: 10.1101/pdb.ip47. ISSN 1940-3402. Dostupné také z: <http://www.cshprotocols.org/lookup/doi/10.1101/pdb.ip47>

- (30) ŠÍPEK, Antonín. Základní metody genetického inženýrství. *Genetika - Biologie: Váš zdroj informací o genetice a biologii* [online]. ©2010-2014 [cit. 2018-05-15]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/zakladni-metody-genetickeho-inzenyrstvi>
- (31) KUREY, I., KOBETS, T., HAVELKOVÁ H., et al. Distinct genetic control of parasite elimination, dissemination, and disease after *Leishmania major* infection. *Immunogenetics*. 2009, **61**(9), 619-633. DOI: 10.1007/s00251-009-0392-9. ISSN 0093-7711. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00251-009-0392-9>
- (32) REITHINGER, R., J.-C. DUJARDIN a Peter VALLONE. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006, **45**(1), 21-25. DOI: 10.1128/JCM.02029-06. ISSN 1547-769X. Dostupné také z: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.02029-06>
- (33) KAN, W., ZHAO, K., JIANG, Y. et al. Lung, Spleen, and Kidney Are the Major Places for Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in Endotoxic Shock: Role of P38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Signal Transduction of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression. *Shock*. 2004, **21**(3), 281-287. DOI: 10.1097/01.shk.0000113314.37747.55. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00024382-200403000-00012>
- (34) SLAPNIČKOVÁ, M., VOLKOVA, V., ČEPIČKOVÁ, M., KOBETS, T., ŠÍMA, M., SVOBODOVÁ, M., DEMANT P. a M. LIPOLDOVÁ. Gene-specific sex effects on eosinophil infiltration in leishmaniasis. *Biology of Sex Differences*. 2016, **7**(1), -. DOI: 10.1186/s13293-016-0117-3. ISSN 2042-6410. Dostupné také z: <http://bsd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13293-016-0117-3>

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Světový výskyt kožní leishmaniózy z roku 2015 (5).....	14
Obrázek 2: Světový výskyt viscerální leishmaniózy z roku 2015 (5).....	15
Obrázek 3: Životní cyklus <i>Leishmanie</i> (10).....	17
Obrázek 4: Genomy rekombinantních kongenních kmenů (18).....	21
Obrázek 5: Schéma metody PCR-ELISA (26).....	31
Obrázek 6: Snímek elektroforetického rozdělení fragmentů vzorků CcS20a, CcS20b a CcS20c použitím enzymů <i>MnII</i> , <i>AluI</i> , <i>BccI</i> a <i>MnII</i>	49
Obrázek 7: Snímek elektroforetického rozdělení fragmentů vzorků B2120-2133 a B1487-B1493 za použití markerů <i>D10Mit46</i> a <i>D10Mit271</i>	50
Obrázek 8: PCR-ELISA detekující DNA parazitů v lymfatických uzlinách.....	51
Obrázek 9: Graf množství parazitů v játrech jednotlivých myších kmenů po infekci <i>L. major</i>	52
Obrázek 10: Graf množství parazitů ve slezině jednotlivých myších kmenů po infekci <i>L. major</i>	53
Obrázek 11: Graf množství parazitů v lymfatických uzlinách jednotlivých myších kmenů po infekci <i>L. major</i>	53

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: Průběh polymerázové řetězové reakce	43
Tabulka 2: Množství parazitů v orgánech základních kmenů po infekci <i>L. major</i>	52
Tabulka 3: Analýza vazby genů, které ovlivňují množství parazitů ve slezině a v lymfatických uzlinách kmene CcS11	56
Tabulka 4: Analýza kontroly množství parazitů v orgánech myši kombinací markerů	57
Tabulka 5: Shrnutí výsledků kontroly množství parazitů v lymfatických uzlinách a ve slezině	63