



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

---

Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Analýza myších kmenů lišících se ve vnímavosti k *Leishmania major***

**Analysis of mouse strains differing in susceptibility to *Leishmania major***

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: RNDr. Jarošíková Taťána, CSc.

Konzultant práce: doc. Marie Lipoldová, CSc.

**Gabriela Jansová**

---

Kladno, květen 2017

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

Student: **Gabriela Jansová**  
Obor: Zdravotní laborant  
Téma: **Analýza myších kmenů lišících se ve vnímavosti k *Leishmania major***  
Téma anglicky: Analysis of mouse strains differing in susceptibility to *Leishmania major*

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

Vnímavost k parazitárním onemocněním závisí na druhu parazita, na imunitním stavu a genotypu hostitele. Mnohé aspekty lidské choroby je možné studovat na experimentálním myším modelu. V předchozím výzkumu jsme v naší laboratoři definovali 21 nových genetických Lmr (*Leishmania major* response) lokusů a určili jejich vliv na vývoj choroby a imunitní odpověď.

Cílem bakalářského projektu je seznámit se a zvládnout metodiky pro přesné mapování genů a provést samostatně část experimentů s cílem zpřesnění polohy Lmr genů.

Studentka v průběhu projektu:

1. vypracuje literární rešerši o metodách mapování genů, které kontrolují vnímavost k *Leishmania major*
2. seznámí se a zvládne práci s přístrojovým vybavením nutným pro zvládnutí sofistikovaných metod molekulární biologie včetně metod izolace NK, výběru vhodných primerů a enzymů pro typizace SNP, typizace SNP, RT-PCR, různé typy elektroforéz, ELISA a další
3. vyhodnotí a popíše výsledky získané pomocí výše uvedených metod


### Seznam odborné literatury:

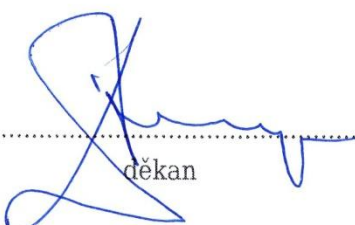
- [1] Lipoldová M, Demant P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis, ed. Nat Rev Genet. 2006, 7(4):294-305, ISSN: 1471-0056  
[2] Demant P., Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer, ed. Nat Rev Genet. 2003, 4(9):721-734, ISSN: 1471-0056  
[3] Kurey I, Kobets T, Havelková H, Slapnicková M, Quan L, Trtková K, Grekov I, Svobodová M, Stassen AP, Hutson A, Demant P, Lipoldová M, Distinct genetic control of parasite elimination, dissemination, and disease after *Leishmania major* infection. Immunogenetics, 2009, 61(9):619-633, ISSN: 0093-7711

Zadání platné do: 11.09.2018

Vedoucí: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.

Konzultant: doc. Marie Lipoldová, CSc.

  
.....  
vedoucí katedry / pracoviště

  
.....  
děkan

V Kladně dne 31.10.2016

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Analýza myších kmenů lišících se ve vnímavosti k *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).

V Praze dne 15.05.2017

.....  
podpis

## **Poděkování**

Velmi bych chtěla poděkovat paní doktorce Taťaně Jarošíkové RNDr., CSc. za podnětné rady a připomínky, dále paní doc. Marii Lipoldové, CSc. za odborné vedení mé práce a umožnění v laboratoři Ústavu molekulární genetiky AV ČR vypracovat praktickou část bakalářské práce. Veliké díky patří kolegům Marii Čepičkové, Danielu Jetenskému a všem dalším spolupracovníkům Laboratoře buněčné a molekulární imunologie za cenné informace a podporu po celou dobu mé účasti v tomto výzkumu.

Na závěr, avšak ne s nejménší důležitostí, chci poděkovat svým rodičům za podporu během celého mého studia a veškerou pomoc, kterou mi poskytli.

Práce byla vypracovaná v roce 2017 s grantovou podporou GAČR 16 - 22346S.

## Abstrakt

Tato práce je zaměřena na laboratorní metody využívané ve výzkumu k objasnění patogeneze působení prvoky rodu *Leishmania* a mechanismus jejich účinku na imunitní odpověď organismu hostitele. V závislosti na druhu *Leishmania* existují tři hlavní typy projevu onemocnění: kožní, kožně - slizniční a viscerální.

Každý organismus je individualita, která má se svým druhem společnou převážnou část genomu, ale v některých úsecích DNA se navzájem liší, proto každý jedinec odpovídá na nákazu patogenem jiným způsobem. Tyto predispozice k rozšíření nebo potlačení patogenu v organismu jsou řízeny více geny malého účinku a předurčují náchylnost jedince k propuknutí nebo potlačení choroby.

Protože heterogenita odpovědi lidského hostitele je kvůli působení různých životních podmínek značná, nejlepší způsob, jak prozkoumat vliv těchto genů s malou penetrancí, je studovat jejich účinky na modelových zvířecích organismech, například myších, jejichž genom byl sekvenován. Možnost specifického účelného křížení myších kmenů nám umožňuje odhalit geny, které ovlivňují různé imunologické aspekty odpovědi organismu k dané infekci. Vzhledem k ortologii těchto genů přítomných v lidském genomu lze předpovědět u člověka možný fenotypový projev indukovaný infekcí a míru imunitní obrany proti patogenu.

K tomuto účelu jsme použili modely rekombinantních kongenních kmenů (RCS) myší CcS/Dem odvozených od inbredního myšího kmene BALB/c, který je k infekci citlivý, a rezistentního myšího kmene STS. Křížením bylo získáno 20 kmenů, ze kterých každý obsahuje náhodných 12,5 % genomu dárcovského kmene STS na pozadí 87,5 % genomu BALB/c. Tímto způsobem se podařilo rozdělit geny odolnosti kmene STS mezi jednotlivé RCS. Tyto kmény jsme pak fenotypicky otestovali a kmény, které byly nejodolnější (a tedy obsahovaly geny odolnosti) a nejnámavější jsme vybrali k další analýze. Postupně jsme připravili F<sub>2</sub>

hybridy mezi kmenem BALB/c a kmeny CcS-5, CcS-9, CcS-11, CcS-16 a CcS-20 a mapovali jsme v nich 23 lokusů *Lmr* (*Leishmania major* response). Mým úkolem bylo přesné mapování lokusu *Lmr5*, který se nachází na distální části 10. chromosomu.

Rekombinantním mapováním byla zúžena oblast, kontrolující hladinu IgE v séru a velikost kožních lézí, na 5 Mbp. Bioinformatickou analýzou byl v této oblasti detekován kandidátní gen. Během své bakalářské práce jsem se podílela na přípravě dvou rekombinantních kmenů o délce 1.5 Mbp a 1 Mbp, které umožní potvrzení tohoto kandidátního genu.

### **Klíčová slova**

*Leishmania*; leishmanióza; genom; myší kmen; *Lmr* lokus; gen

## Abstract in English

This bachelor thesis is focused on elucidation of the way how protozoan parasite of *Leishmania* family have pathogenic effect on the host and so to clarify the mechanisms of this impact on immunity system of his organism. According to which species are involved, three types of disease are distinguished : cutaneous, muco- cutaneous and visceral form.

Although each organism has most of its genome similar to its species, still there are some parts of DNA in which the individual differs to each other. This is the reason why every individuality responses to this disease differently. Symptoms of disease caused by this pathogens are affected by multiple genes, which determine the phenotype effect.

According to heterogeneity of human population and differences in lifestyle and time exposure to infections, the best way how to explore these low-penetrance genes is to study them using the model organisms. Because the mouse genome was sequenced, efficient crossing of mouse strains can help us to identify genes involved in the host response to this infection. Orthologues of these genes in human genome then refer to potential rate of host's immunity system answer.

For this case we used the model of recombinant congenic strains (RCS) CcS/Dem mice, which consist from two inbred strains - susceptible BALB/c and resistant STS. Each of the 20 CcS/Dem RC mouse strain carries different random subset of 12,5 % genes of the resistant donor strain STS on the background of susceptible strain BALB/c. Genes of resistant STS strain were distributed among different RC strains and from these we choose the most susceptible and the most resistant RCS to further analysis. We prepared F<sub>2</sub> generation of the strains CcS-5, CcS-9, CcS-11, CcS-16 and CcS-20 crossed with BALB/c and mapped 23 *Leishmania major* response locus - *Lmr*. My objective was to map the *Lmr5* on distal part of the chromosome 10.

Thanks to recombinant mapping we narrowed the area which has influence in the size of the skin lesions and amount of IgE in serum to 5 Mbp and subsequent bioinformatic analysis detected the candidate gene. As the work for this bachelor thesis I participated on construction of two recombinant strains 1,5 and 1 Mbp long, which could confirm impact of this candidate gene.

**Key words:**

*Leishmania*; leishmaniasis; genome; mouse strain; *Lmr* locus; gene



## Obsah

1	Úvod.....	11
2	Současný stav .....	13
2.1	<i>Leishmania major</i> .....	13
2.1.1	Morfologie <i>Leishmania major</i> .....	13
2.1.2	Leishmanióza a přenos na člověka .....	14
2.2	Myší kmeny .....	18
2.2.1	Inbrední kmen .....	19
2.2.2	Kongenní kmen .....	19
2.2.3	Konsomický kmen.....	20
2.2.4	Rekombinantní inbrední kmen (RIS) .....	21
2.2.5	Rekombinantní kongenní kmen (RCS) .....	21
2.2.6	Transgenní kmeny .....	23
2.2.7	Knock-out a knock-down modely .....	23
2.2.8	Myší kmeny použité v tomto výzkumu .....	23
2.3	Laboratorní metody používané v tomto výzkumu .....	25
2.3.1	Izolace DNA.....	25
2.3.2	PCR.....	27
2.3.3	Restrikce DNA.....	29
2.3.4	Elektroforéza NK.....	32
3	Cíl práce.....	34
4	Metodika .....	35
4.1	Izolace DNA .....	35
4.2	PCR reakce.....	36
4.3	Restrikce DNA .....	37

4.4	Elektroforéza na agarózovém gelu .....	38
4.5	Metodika genotypizace myších alel SNP a mikrosatelitními markery ...	39
4.6	Metodika vyhledávání vhodných primerů a restrikčních enzymů .....	42
5	Výsledky.....	43
5.1	Výsledky křížení kmene 6Ax6UV .....	43
5.2	Výsledky křížení kmene 6354/XJ.....	47
6	Diskuze .....	50
7	Závěr .....	53
8	Seznam použitých zkratk.....	54
9	Seznam použité literatury.....	56
10	Seznam použitých obrázků .....	60
11	Seznam použitých tabulek.....	61

# 1 ÚVOD

Molekulárně genetický výzkum se donedávna zabýval především objasněním projevů chorob s jasně prokázanou dědičnou dispozicí (například v rámci rodiny), nebo nemocemi, které jsou způsobeny několika málo geny velkého účinku. V dnešní době jsme ale schopni díky metodám molekulární genetiky objasnit fenotypové projevy chorob, které zdánlivě nemají genetický podklad, například infekční choroby vyvolané různými patogeny, jako jsou bakterie, viry a prvoci.

Leishmanióza se považuje po malárii za jedno z nejdůležitějších parazitárních onemocnění v oblasti tropické a subtropické Afriky, Asie a Jižní Ameriky. Neexistuje účinná vakcína a tudíž je obrana velmi obtížná. Je důležité pochopit a porozumět mechanismům projevu tohoto onemocnění a jeho fenotypových změn, ale také samotnou podstatu této choroby vzhledem ke genotypu hostitele.

Genom je definován jako veškerá genetická informace obsažená v DNA daného organismu, zahrnující jeho všechny geny i nekódující sekvence. V současné době je genom člověka znám a asi z 98% je genetická výbava každého z nás stejná, liší se pouze v nepatrném zlomku z obrovského počtu obsažených genů. Tyto úseky se nazývají polymorfni a právě v těchto variabilních oblastech je skryt klíč k odhalení toho, proč se liší reakce lidského organismu na různé patogeny, parazity nevyjímaje.

Aby bylo možné lépe pochopit vliv genetické výbavy na fenotypový projev onemocnění, musí být zvolen k takovému výzkumu vhodný modelový organismus, jehož genom je detailně popsán a prostudován. V naší laboratoři byly k tomuto účelu zvoleny myší modelové organismy, jelikož všechny tyto požadavky splňují a disponují i dalšími výhodami, jako například brzká pohlavní dospělost samic, která je uváděna na 7 - 8 týdnů, krátká doba březosti a tudíž vysoký počet vrhů za rok (7-9), velký počet potomků a nenáročné podmínky

chovu (1). Jelikož můžeme nalézt v myším genomu úseky, které jsou analogické k lidskému, je myš domácí nejvíce preferovaný savčí modelový organismus, který nachází uplatnění již od druhé poloviny minulého století.

## 2 SOUČASNÝ STAV

### 2.1 *Leishmania major*

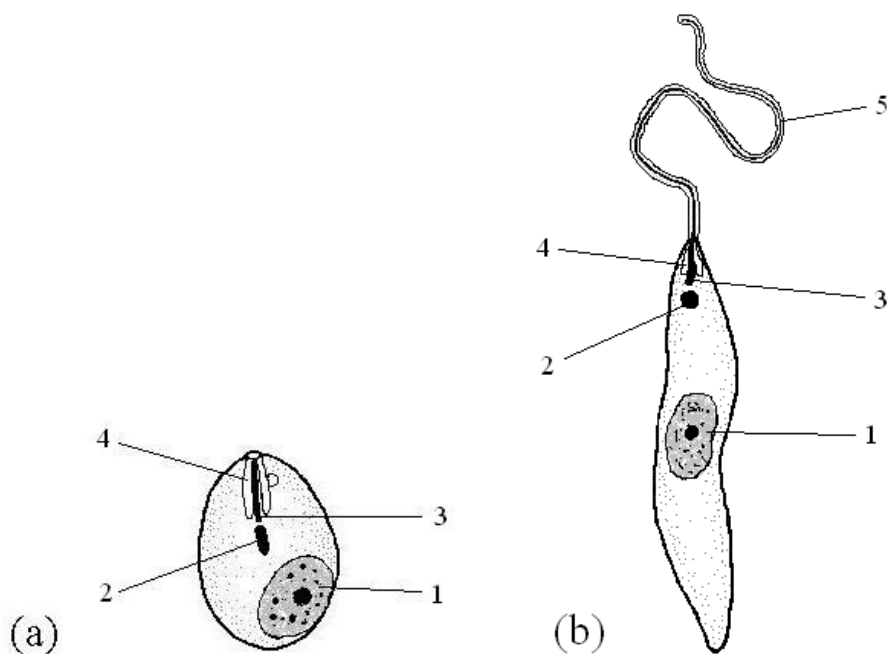
Několik stovek milionů obyvatel zemí tropického a subtropického pásma je ohroženo nákazou tímto prvokem rodu *Leishmania* (česky ničivka), kmene Mastigophora, třídy Kinetoplastida, čeledi Trypanosomatidae. Tyto jednobuněčné organismy jsou rozděleny do více jak dvaceti druhů podle svého výskytu a také podle charakteru onemocnění, které způsobují. Označujeme je jako *Leishmanie* "Starého" a "Nového" světa. Do *Leishmanií* Nového světa řadíme druhy, které mají původ v jižní a centrální části Ameriky a jsou to druhy *Leishmania peruviana*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana* nebo třeba *L. chagasi*, což je druh *L. infantum* přinesený do Nového světa nedávno. Mezi nejvýznamnější druhy Starého světa, což jsou oblasti, které byly známy Evropanům již před kolumbovskými výpravami, patří *L. donovani*, *L. infantum*, *L. tropica*, a právě také *Leishmania major* (2).

#### 2.1.1 Morfologie *Leishmania major*

Prvok *Leishmania* je jednobuněčný živočich s eukaryotní stavbou buňky. V jeho životním cyklu dochází ke značným morfologickým a fyziologickým změnám podle prostředí, ve kterém se vyskytuje – jedná se o dvě základní životní stadia: promastigotní a amastigotní (viz. Obr.1).

*Leishmania* má jeden bičík, který jí umožňuje pohyb. Bičík se vyskytuje jen u promastigotního životního stadia.

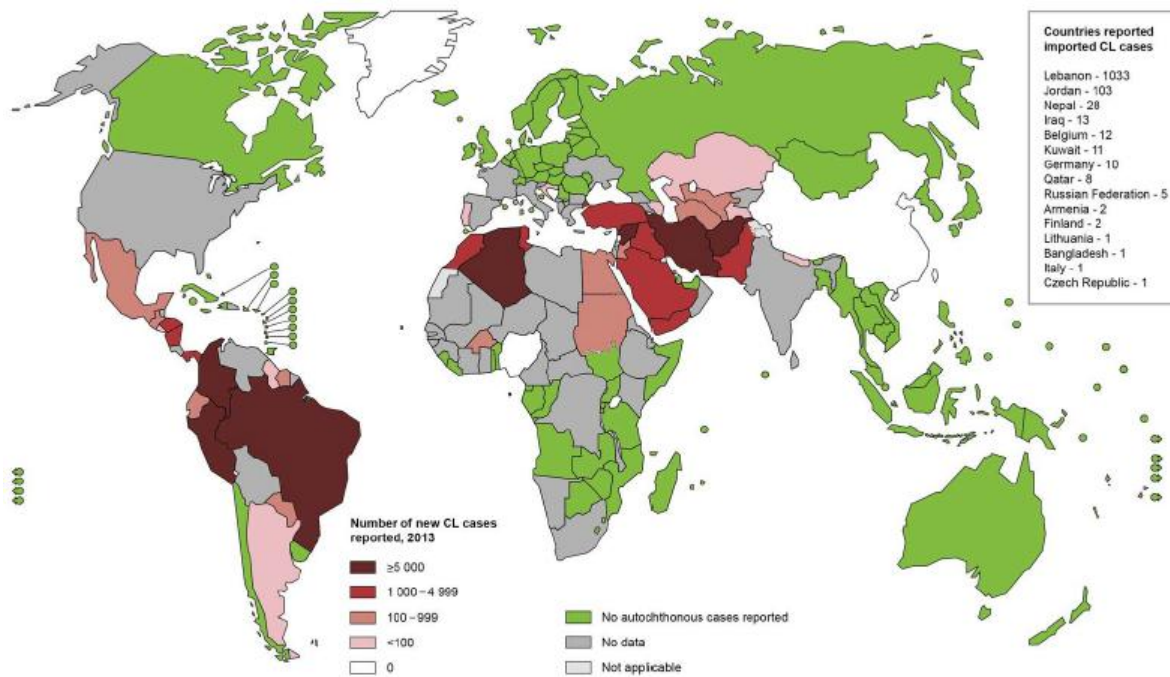
Specifickou organelou všech Kinetoplastid, mezi které rod *Leishmania* patří, je kinetoplast, který je lokalizován u báze bičíku. Obsahuje mimojadernou mitochondriální DNA, celkem až 10-20% celkové DNA buňky.



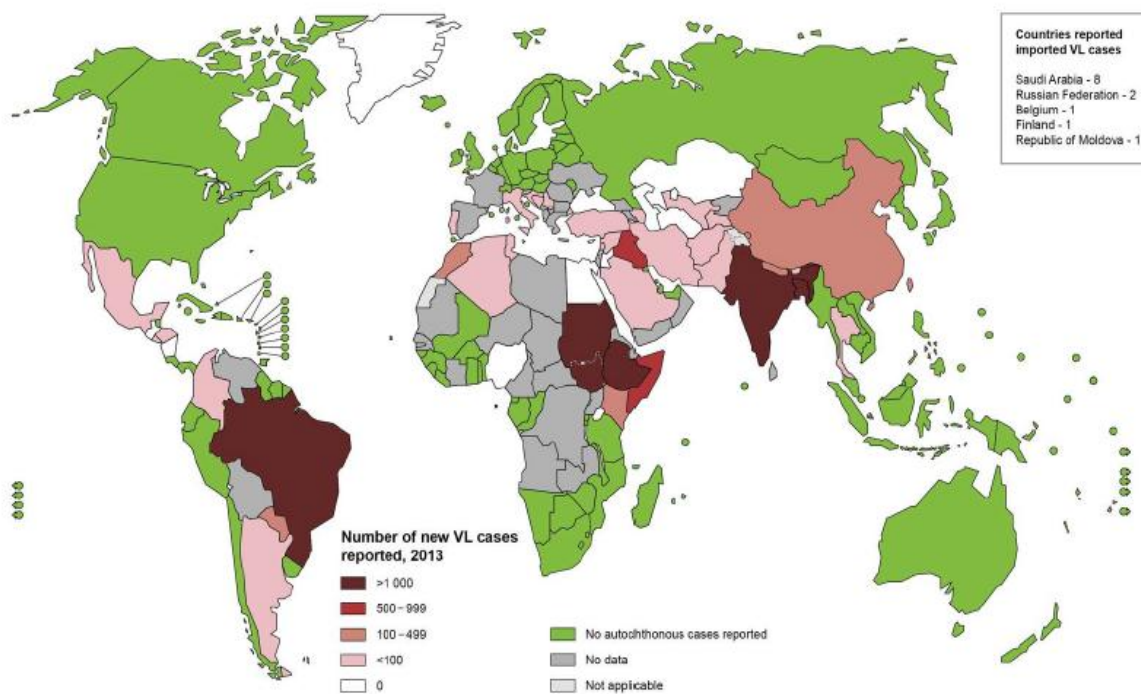
Obrázek 1: *Leishmania major*. (a) amastigot; (b) promastigot. 1 – jádro, 2 – kinetoplast, 3 – kinetozóm, 4 – axonema, 5 – bičík (podle (3))

### 2.1.2 Leishmanióza a přenos na člověka

Incidence výskytu nákazy leishmániemi je častá v zemích Jižní Ameriky a Afriky. V roce 2014 bylo nahlášeno přes 90 % případů viscerální podoby této nemoci z Brazílie, Etiopie, Indie, Somálska, Jižního Súdánu a Súdánu. Většina kožních infekcí je hlášena z Afghanistanu, Algérie, Brazílie, Íránu, Pakistánu, Saúdské Arábie, Sýrie (4), viz Obrázek 2.



Obrázek 2: Výskyt kožní formy leishmaniózy( podle (4))



Obrázek 3: Výskyt viscerální formy leishmaniózy ( podle (4))

Jak bylo řečeno výše, nákaza tímto prvokem může mít různé fenotypové projevy a podle toho rozlišujeme leishmaniózu kožní, kožně - slizniční a viscerální formu, jakožto nejtěžší formu nákazy.

Kožní forma je způsobena hlavně druhy *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. tropica* a *L. major* se vyznačuje kožními lézemi se zánětlivými ložisky a infikovanými makrofágy, které po zhojení zanechávají jizvy. Někdy je pozorována difúzní forma, kdy se léze rozšíří z původního místa nákazy, avšak přenos na vnitřní orgány není pozorován (2).

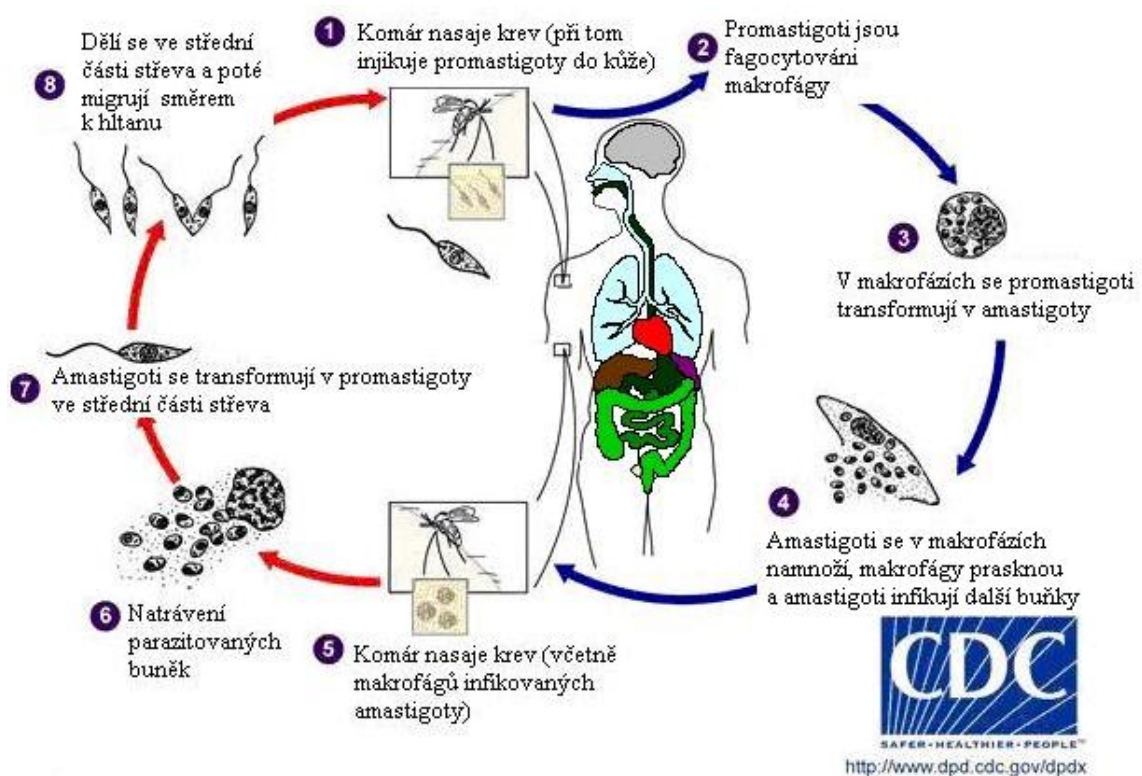
Kožně - slizniční forma se vyvine jen u malé části (zhruba u 2%) pacientů, kteří byli infikováni *L. braziliensis*. Postihuje hlavně sliznice úst a nosu, kde působí nekroticky na tkáň a vede k jejich destrukci. Tato forma leishmaniózy pravděpodobně výrazně souvisí kromě druhu leishmánie také s genetickým pozadím hostitele (2).

Nejzávažnější, viscerální forma nemoci, je způsobena druhy *L. donovani*, *L. chagasi* a *L. infantum* (5). U infikovaného hostitele lze pozorovat horečku, malátnost, hepatomegalii, splenomegalii a tyto příznaky jsou často doprovázeny anémií, hypergammaglobulinemií, sníženým počtem neutrofilů a dalšími přidruženými infekcemi, které se podílejí na vysoké mortalitě této formy nákazy (2).

Přenos na člověka se odehrává pomocí samic malého dvoukřídlého hmyzu rodu *Phlebotomus* a *Lutzomyia*. Rezervoáry většiny druhů leishmanií jsou psovité šelmy a hlodavci (zoonotická leishmanióza), pouze v málo případech může dojít k přenosu z nakaženého člověka na zdravého jedince (antroponotická leishmanióza) (2).



Do člověka se parazit dostane kousnutím hmyzem v podobě promastigota, což je infekční stadium vyznačující se protáhlým oválným tvarem buňky s bičíkem, které napadá složku imunitního systému, tzv. profesionální fagocyty - neutrofilní granulocyty, monocyty a makrofágy. Dále může napadnout dendritické buňky a fibroblasty. Nejvýznamnější pro životní cyklus parazita jsou však výše zmíněné makrofágy, které promastigot nalezne pomocí specifických receptorů. V těle hostitele se potom transformuje do stádia amastigota, oválného až kulovitěho stádia s velkým jádrem a zřetelným kinetoplastem, kde roste, namnoží se do takového počtu, že může roztrhnout cytoplazmatickou membránu buňky a dále může napadnout a infikovat další buňky organismu. Makrofág s amastigoty se přísátím hmyzu opět může dostat do jeho trávicí soustavy, kde se amastigoti transformují zpět do infekčního promastigotního stádia a jsou opět infekční (2).



Obrázek 4: Životní cyklus *Leishmanie* (podle (6)).

## 2.2 Myší kmeny

S rozvojem sekvenačních metod od druhé poloviny 19. století bylo možné získávat přesnější informace o úsecích DNA nejrůznějších organismů od bakterií až po rostliny nebo savce včetně člověka. Zjišťováním přesného pořadí nukleotidů v rámci genomu jednotlivých organismů můžeme získané informace mezi sebou porovnávat, čímž se zabývá obor komparativní genomika. Z etických důvodů nelze patofyziologii onemocnění studovat přímo na lidských subjektech, ale díky homologii lidského a myšího genomu tyto mechanismy můžeme studovat na těchto modelových organismech. Bylo dokonce prokázáno, že na úrovni DNA je člověk a primáti evolučně blíže hlodavcům než savčím modelům (7).

Shromažďování a ukládání sekvenačních dat a jejich vzájemné porovnávání pomocí bioinformatických algoritmů nám umožňuje elektronicky pracovat se sekvencí DNA daného organismu prostřednictvím volně dostupných prohlížečů (MapView, Ensembl) (8).

*Mus musculus*, myš laboratorní, byla pro tento výzkum vybrána pro mnoho výhod viz úvod a také pro možnost pomocí vzájemného křížení vytvářet myší linie s určitým potřebným genotypem, jako jsou například inbrední, kongenní nebo rekombinantní myší kmeny, což nám pomáhá při zjišťování účinků určitých úseků DNA, neboli lokusů, na fenotyp nositele.

Vhodným křížením bylo vyšlechtěno množství inbredních myších kmenů, které se používají v genetických nebo imunologických experimentech a dalších oblastech výzkumu po celém světě. Jeden z nejznámějších inbredních myších kmenů je C57BL/6, který byl vyšlechtěn roku 1921 americkým genetikem Clarencem Cookem Littlem v harvardském výzkumném ústavu. Tento myší kmen je používán často v imunogenetických laboratořích jako modelový organizmus pro výzkum mnoha lidských onemocnění pro své vlastnosti jako snadný chov a možnost

použití tohoto kmene jako genetické pozadí k získání kongenních myších kmenů (1).

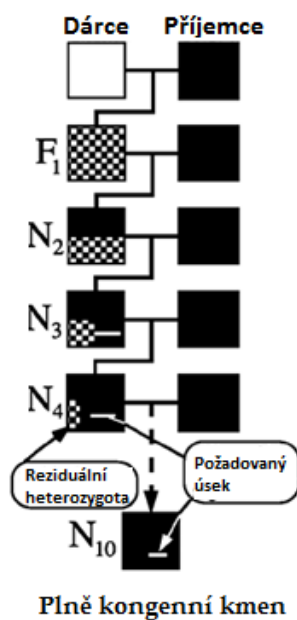
### **2.2.1 Inbrední kmen**

Jako inbrední myší kmen označujeme linii získanou opakovaným pářením bratr x sestra odvozeným od jednoho původního páru. Prvním křížením dostaneme první filiální generaci  $F_1$ , která je podle Mendelových zákonů uniformní, avšak při dalším křížení, to znamená od generace  $F_2$ , můžeme dostat potomky jak homozygotní, tak i heterozygotní. Postupně narůstá podíl homozygotních jedinců a pokud dostatečně dlouho potomky vzájemně křížíme, vzniklý myší kmen je homozygotní ve všech sledovaných lokusech a jsou geneticky identičtí. Svoji genetickou podstatou bychom tudíž takový kmen mohli přirovnat k monozygotním dvojčatům (9). Je stanoveno, že kmen můžeme považovat za inbrední při takovémto křížení po dobu 20 generací (10).

### **2.2.2 Kongenní kmen**

Kongenní myší kmen vzniká zkřížením jedinců různých vysoce inbredních kmenů, z nichž jeden tvoří genetické pozadí budoucího kongenního kmene (A) a druhý (B) je donorem neboli dárce části genomu, který na toto pozadí vnášíme. Většinou se tak děje systémem jednoduchého zpětného (simple backcross) křížení, kdy  $F_1$  generace obou inbredních myších kmenů je tvořena pouze heterozygoty, tento heterozygot se zkříží s rodičem A, jehož genotyp chceme mít na genetickém pozadí, a ze vzniklých potomků opět vybereme vhodného heterozygota a křížení opakujeme v dostatečném počtu (doporučuje se alespoň 10 křížení). Tento počet se díky pokrokům molekulární biologie a využitím mikrosatelitních markerů (markery asistované selekce - marker assisted breeding) snížil na tři zpětná křížení (11). Na závěr je provedeno vzájemné křížení heterozygotů pro daný úsek genomu - intercross a proto v potomstvu mohou být pro tento úsek i homozygoté obojího typu. Křížením homozygotního páru s alelou získanou od kmene

B získáme homozygotní inbrední kmen lišící se od původních kmenů tímto diferenciačním segmentem na pozadí kmene A a označujeme ho A.BX, kdy X označuje číslo chromozomu, kde se diferenciační segment vyskytuje. Pokud pozorujeme fenotypovou odlišnost původního kmene A a kongenního kmene A.BX, můžeme usuzovat, že právě v přeneseném úseku genomu se vyskytují geny zodpovědné za tyto změny (9).



Obrázek 5: Produkce kongenního kmene (9).

### 2.2.3 Konsomický kmen

Konsomický kmen je zvláštní druh kongenního myšního kmene, kdy diferenciační segment představuje celý chromosom.

#### **2.2.4 Rekombinantní inbrední kmen (RIS)**

Rekombinantní inbrední kmen představuje model pro vazebnou analýzu genů v genomu. Zkřížením dvou inbredních kmenů získáme generaci F<sub>1</sub>, což jsou heterozygoti v plném rozsahu, jejichž dalším zkřížením dostaneme generaci F<sub>2</sub>, u které dojde k segregaci rodičovských alel a vloh pro sledované znaky. Z této generace náhodně vybereme dva jedince, kteří tvoří základ pro jednotlivé budoucí inbrední kmeny, které získáme klasickým inbredním křížením bratr x sestra po více jak 20 generací. Každý takovýto rekombinantní inbrední kmen se liší v kombinaci zděděných parentálních alel (7).

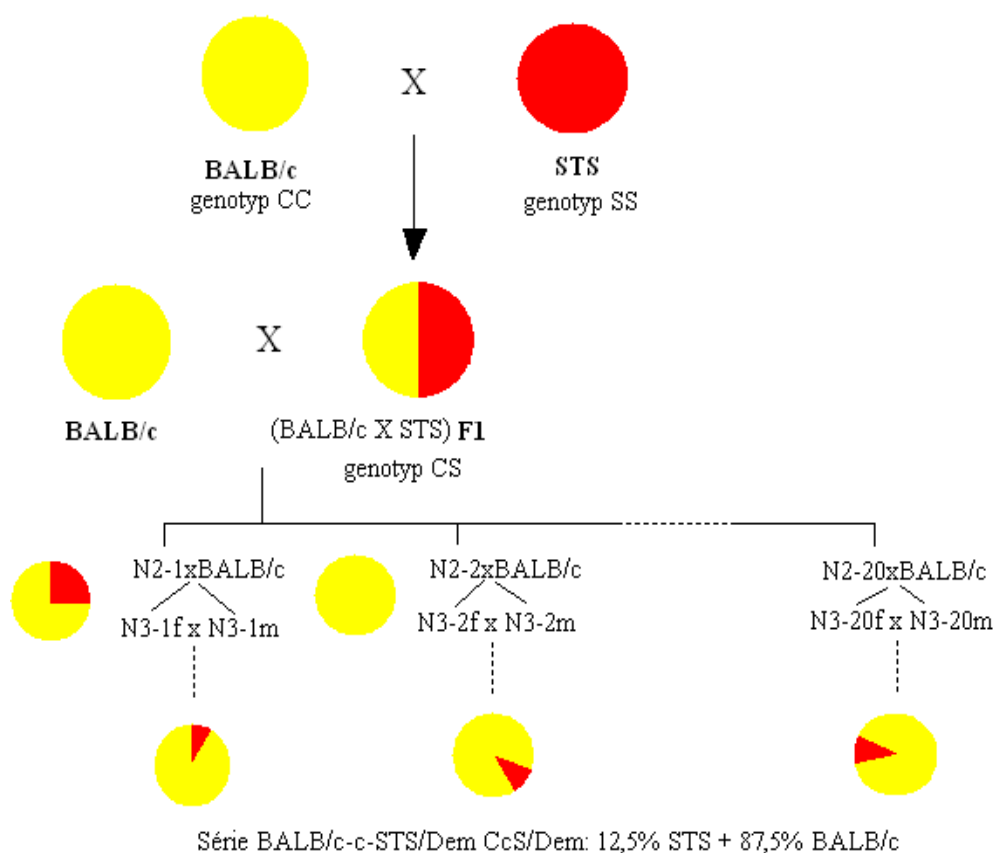
Každý RI kmen je homozygotní ve všech lokusech, ale obsahuje unikátní kombinaci 50% genů od jednoho rodičovského kmene a 50% od druhého rodičovského kmene. RI kmeny jsou dobrým nástrojem pro identifikaci chromozomální pozice znaků ovládaných jediným genem. Pro analýzu QTL (quantitative trait loci - lokusy kontrolující kvantitativní znaky) by bylo nutno použít sadu několika set RI kmenů (12).

#### **2.2.5 Rekombinantní kongenní kmen (RCS)**

Tyto kmeny byly vyvinuty pro usnadnění mapování QTL s nízkou penetrancí. RC kmeny jsou odvozeny od dvou následných zpětných křížení dvou inbredních kmenů – kmene dárcovského a kmene, který vytváří genetické pozadí.

RC série většinou obsahuje okolo 20 kmenů, které jsou homozygotní a obsahují různou náhodnou malou část genomu dárcovského kmene (12,5%) na genetickém pozadí základního kmene (13).

V tomto výzkumu jsme pracovali s rekombinantními kongenními kmeny CcS/Dem odvozené z kmenů BALB/c a STS. Dvacet párů myší bylo kříženo systémem bratr x sestra po dobu 40 generací. Kmeny obsahují různé, částečně se překrývající sady genů pocházející z kmene STS na pozadí genů, pocházejících z kmene BALB/c (znázorněno červenými výsečemi ve žlutých kruzích označujících celkový genom kmene) (14), viz obrázek 6.



Obrázek 6: Schéma přípravy rekombinantních kongenních kmenů série CcS/Dem.

### **2.2.6 Transgenní kmeny**

Existují kmeny s uměle vnesenou částí DNA, což jsou cizorodé nebo jinak modifikované geny, které jsou včleněny do genomu organismu pomocí vektoru. Tyto transgenní organismy potom slouží k objasnění funkcí genů, k tvorbě různých produktů tímto organismem nebo ke studiu dědičných onemocnění člověka. U myši se využívá metod mikroinjekce DNA do oplozeného vajíčka myši nebo do populací embryonálních kmenových buněk získaných z časných myši embryí (15).

### **2.2.7 Knock-out a knock-down modely**

Tyto techniky jsou využívány u modelových organismů myši, rybiček, červů a rostlin. Děje se tak úplným vyřazením nebo utlumením aktivity genu metodou inserce cizorodé DNA do úseku genomu, kde se tento gen vyskytuje. Tato inaktivace nám pomáhá určit funkci daného genu pomocí pozorovaných fenotypických změn u knock-out mutantního organismu. Metoda se používá ke studiu fyziologických a imunologických dějů v savčím organismu s aplikací na člověka, jelikož genom člověka a myši jsou v některých částech analogické a navzájem podobné (16).

### **2.2.8 Myši kmeny použité v tomto výzkumu**

Spojitost mezi multigenně podmíněnou odpovědí myšího modelu na nákazu leishmanií a rolí, kterou hrají zúčastněné složky imunitního systému organismu, sledujeme na 20 záměrně připravených rekombinantních kongenních myších kmenech pojmenovaných CcS- a číslo daného kmene. Takto bylo připraveno 20 rekombinantních kmenů, CcS-1-20, vycházejících z citlivého inbredního kmene BALB/c a rezistentního kmene STS. Každý rekombinantní kmen má svoji specifickou, odlišnou a náhodnou kombinaci těchto původních kmenů, přičemž každý obsahuje 12.5 % genů z rezistentního kmene STS na genetickém pozadí

genomu BALB/c, který tvoří zbylých 87,5 % genů, a současně v rámci všech těchto 20 RC kmenů je pokryt celý genom STS z více jak 95 % (17).

Tento model nám má sloužit k lepšímu pochopení mechanismů imunitní odpovědi na infekci parazitem, jelikož ne všechny jsou úplně objasněny. Zpočátku se předpokládalo, že za citlivost či rezistenci vůči nákaze zodpovídá aktivace různých tříd T pomocných lymfocytů. Tyto buňky nesou na svém povrchu CD4 glykoprotein a tvoří cytokiny k aktivaci B lymfocytů, T cytotoxických lymfocytů nebo makrofágů. Rozšíření nákazy bylo asociováno s TH2 pomocnými lymfocyty, které tvoří interleukin 4, kdežto interferon  $\gamma$  tvořený TH1 lymfocyty se zdál důležitý pro odmítnutí nemoci a uzdravení organismu. Postupně se zjistilo zapojení dalších složek imunitního systému hostujícího organismu a součinnost mnoha dalších polymorfních genů, které se účastní této interakce organismu a parazita a ovlivňují mnoho faktorů jako velikost kožních lézí způsobených parazitem, míru obtížnosti proniknutí parazita do vnitřních orgánů hostitele, jako je slezina a játra, a tím rozpoutání systémové nákazy nebo množství parazita v těchto orgánech (18).

Jedinci jednotlivých kmenů série CcS vykazovali různou míru citlivosti na nákazu, někteří dokonce získali úplnou rezistenci. Z těchto kmenů byly k dalšímu křížení vybrány kmeny CcS-5, který byl rezistentní, CcS-16, který vykazoval citlivost a CcS-20, který byl na škále citlivosti přibližně uprostřed mezi nimi. Míra citlivosti se zjišťovala biologickými metodami, při kterých se srovnávaly parametry jako velikost lézí, počet parazitů v lymfatických uzlinách a slezině, hladina IgE a IFN $\gamma$  v séru. Mapováním pomocí F<sub>2</sub> hybridů se z těchto proměnných vyhodnocují lokusy s kandidátními geny, které mohou mít zodpovědnost za tyto fenotypové projevy a tyto geny se stávají předmětem výzkumu, kdy se jejich funkce buď potvrdí nebo vyvrátí (17).



## 2.3 Laboratorní metody používané v tomto výzkumu

### 2.3.1 Izolace DNA

Pro většinu molekulárně biologických metod je potřeba vodný roztok DNA zbavený podílu bílkovin. Bílkoviny totiž mohou změnit pH roztoku nebo svoji katalytickou aktivitou během analýzy dokonce změnit konformaci nukleové kyseliny. Vazby proteinů a DNA dále mění také rozpustnost NK nebo může dojít k vychytání iontů z roztoku, které jsou důležité pro prováděné enzymatické reakce. Při izolaci se snažíme zvolit takový postup, abychom dosáhli co nejvyššího výtěžku DNA o vysoké kvalitě, to znamená, že není příliš fragmentovaná na menší části, a zároveň abychom dosáhli vysoké čistoty. Je nutné dbát na opatrnost a vyvarovat se kontaminace použitím ochranných laboratorních pomůcek, čistých špiček a sterilních nástrojů. Nezanedbatelným faktorem, který může znečistit izolovanou DNA, je také aerosol vznikající při centrifugaci. Správně izolovaná DNA je stabilní a ve vhodném prostředí vydrží až několik let (19).

DNA můžeme izolovat z nejrůznějších typů tkání - kůže, vnitřních orgánů nebo tekutého materiálu. Při izolaci z celistvého kusu tkáně je potřeba tuto tkáň mechanicky zhomogenizovat pomocí homogenizátorů. V zásaditém prostředí lyzačního pufru (TRIS pufr s EDTA o pH 8 - 9) dochází v přítomnosti detergentu (SDS) ke zvýšení permeability buněčné membrány buňky a k uvolnění nukleoproteinových komplexů, které se následně enzymaticky rozštěpí, nejčastěji pomocí proteinázy K (20).

Nejčastěji používané metody v molekulárně biologických laboratořích je fenol-chloroformová extrakce a nebo vysrážení DNA po deproteinizaci pomocí solí nebo nepolárního rozpouštědla - alkoholu, nejčastěji ethanolu nebo isopropylalkoholu (19). Tato metoda je detailně popsána v kapitole 4 - Metodika práce.

- **Fenol - chloroformová extrakce**

Díky přidání pufovaného fenolu do lyzační směsi a následné centrifugaci se DNA dostane do vodné fáze směsi, přičemž ostatní nepotřebné kompartmenty jako buněčné membrány, proteiny, polysacharidy a lipidy zůstanou v organické fázi a odpipetováním vodné fáze s DNA do směsi s chloroformem se zbavíme zbytků fenolické fáze z roztoku. Následuje precipitace a purifikace DNA pomocí 70% vodného roztoku ethanolu. Procedura trvá několik hodin a mezi její výhody patří vysoká výtěžnost a čistota nukleové kyseliny, ale nevýhoda spočívá v použití organických rozpouštědel, což zamezuje automatizaci a použití laminárních boxů s HEPA filtry a ohrožuje zdraví laboratorního personálu (20).

- **Extrakce pomocí NaOH**

Extrakce pomocí NaOH je rychlá a finančně nenáročná metoda, kdy produkt lze okamžitě využít k PCR reakci, avšak získaný vzorek není určen k dlouhodobému skladování a není vhodný kvůli nižší kvalitě a čistotě k náročnějším aplikacím (19).

- **Měření koncentrace a čistoty DNA**

Koncentraci DNA zjišťujeme spektrofotometricky, pomocí přístroje nanospektrofotometru, na základě hodnocení absorbance vzorku, kterým projde paprsek laseru přístroje. Vycházíme z lineární závislosti koncentrace DNA a absorbance měřené v UV oblasti při 260 nm. Je nutné však přihlédnout k nukleotidovému zastoupení měřené DNA, zvláště u krátkých molekul, jelikož je absorbance závislá na poměru bází (19).

Z naměřených absorbancí při vlnové délce 260 a 300 *nm* můžeme spočítat i teoretickou čistotu izolované DNA. DNA má díky bázím absorpční maximum při 260 *nm*, proteiny oproti tomu při 280 *nm*. Čistotu vzorku DNA spočteme podle rovnice

$$NK = \frac{(A_{260} - A_{300})}{(A_{280} - A_{300})}$$

( $A_{300}$  je absorbance optického pozadí)

Izolovaná DNA vydrží při vhodném skladování velmi dlouhou dobu a následně ji můžeme využít pro další enzymatické metody. DNA se nejčastěji uchovává v prostředí o teplotě - 4 °C. Hluboké zmrazování se nehodí pro molekuly DNA delší než 20 kb, aby nedošlo k fragmentaci molekuly (21).

### 2.3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce využívá vlastnosti chování nukleových kyselin v opakujících se cyklech střídání teplot ve spolupráci s enzymem polymerázou, která je schopna podle templátu DNA ohraničeného primery vytvořit řetězec nový.

Polymerázy můžeme dělit na termostabilní a termolabilní. K rozvoji molekulárně genetických metod přispělo objevení termolabilní DNA polymerázy I, která byla vyizolována z bakterie *Escherichia coli*, a jejíž počet se odhaduje v každé bakterii až na několik set. Termolabilní polymerázy však nejsou pro reakci PCR použitelné, proto se pro účely PCR nejvíce využívá termostabilní *Taq* polymeráza izolovaná z bakteriálního kmene *Thermus aquaticus* žijícího v termálních pramenech Yellowstonekého národního parku v USA, která má tu výhodu, že nenedenaturuje při vysokých teplotách. Teplotní optimum této bakterie je udáváno na 72 °C, ale je schopna přežít i v teplotách okolo 95 °C. Původní kmen

měl exonukleázovou aktivitu, tudíž byl schopný zpětně vyštěpit špatně zařazený nukleotid, ale nyní se dá pro komerční účely použít i geneticky modifikovaná *Taq* DNA polymerasa I, která tuto schopnost nemá, což zvýšilo rychlost polymerační reakce (20).

Podstatou polymerázové řetězové reakce je pravidelné střídání 30 - 40 cyklů, během kterých dochází ke střídání teplot. K tomu nám slouží přístroje Thermocyclery, kde se dá nastavit kolik cyklů je pro naši reakci nutno opakovat a také teploty jednotlivých kroků každého cyklu. Výhodou thermocyclerů je možnost rychle a přesně měnit požadovanou teplotu a po skončení reakce udržet vzorek v chladicím režimu, obvykle při 4 °C.

Každý cyklus PCR se skládá ze tří kroků:

**1. Denaturace:** V prvním kroku se vzorek DNA s PCR mixem zahřeje na teplotu okolo 94 °C a dojde k porušení vodíkových můstků a denaturaci dvoušroubovice DNA.

**2. Hybridizace:** Ve druhém kroku poklesne teplota na 50 - 60 °C a při této teplotě nasednou primery na komplementární úseky DNA. Tento proces se nazývá annealing a je velmi důležité zvolit v tomto kroku správnou teplotu, pokud by byla teplota vysoká, primery by nenedly na templátové vlákno v dostatečném množství a naopak pokud by byla moc nízká, primery by mohly nasednout na nekomplementární úseky a tudíž by došlo ke zkreslení výsledku reakce a ovlivnění specifiky metody. Tato teplota se dá experimentálně určit, ale běžně se dá vypočítat jako teplota tání  $T_m$ , která je charakteristická pro použité primery:

$$T_m = (4 \times [G + C]) + (2 \times [A + T])^\circ\text{C}$$

Písmena G, C, A, T v rovnici představují počet jednotlivých nukleotidů v primeru. Po vypočtení  $T_m$  se použije reálná teplota o 1 - 2 stupně nižší.

Z výše uvedeného vyplývá, že je nutné pro jednu konkrétní metodu zvolit vhodné primery, které by se navzájem příliš nelišily v  $T_m$  (22).

**3. Polymerace:** Třetí krok je charakterizován zvýšením teploty na teplotu okolo 72 - 74 °C, což je teplotní optimum pro aktivitu polymerázy a ta syntetizuje nový řetězec podle matrice, až je její aktivita ukončena další změnou teploty a novým cyklem.

Kroky denaturace - annealing - syntéza se opakují a výsledek je exponenciální nárůst úseku DNA ohraničeného primery. Primery jsou sekvence nukleotidů dlouhé okolo 6 bází, které jsou komplementární z obou stran k úseku DNA, kterou chceme namnožit. Primery musí být součástí PCR mixu, stejně jako dNTP - deoxyribonukleotidy, které jsou použity k syntéze nového vlákna.

PCR metoda je hojně využívaná velmi citlivá metoda, která i z jedné molekuly DNA dokáže během 30 cyklů vytvořit až 130 milionů produktů (22).

### 2.3.3 Restrikce DNA

Restrikčních enzymů se využívá v řadě molekulárně biologických technik. Díky nim můžeme fragmentovat izolovanou DNA genomu na kratší úseky a ty pak použít v metodách genetického inženýrství pro přípravu transgenních organismů a genomových knihoven nebo necháme působit restrikční mix na namnožený úsek DNA v předcházející PCR reakci ke zjištění přítomnosti polymorfismů genomu.

Restrikční enzymy jsou enzymy izolované z bakterií, kterým slouží jako obrana před cizorodou, zejména virovou DNA. Jejich vlastní DNA je chráněna před těmito účinky methylocí nukleotidů v místech rozpoznávaných těmito enzymy. Pojmenování těchto enzymů odkazuje na název bakterie, z které byl enzym získán. První písmeno je totožné s prvním písmenem rodu bakterie, další dvě písmena odkazují na počáteční písmena druhového jména. Dále může enzym specifikovat

číslo nebo písmeno na konci pojmenování, které odkazuje na konkrétní bakteriální kmen nebo sérotyp. V dnešní době je známo více jak 3500 restrikčních enzymů, které jsou komerčně připravované a distribuované. Většinou je takovýto enzym dodán s příslušným puforem, který obsahuje nezbytné soli a další komponenty pro správnou funkci enzymu (23).

Restrikční enzymy řadíme do tří tříd a pro molekulární biologii je nejvýznamnější typ II, který nasedá na specifickou sekvenci DNA - rozpoznávací sekvenci a nejčastěji přerušuje toto vlákno buď přímo v tomto místě, nebo několik bází vzdáleném od této sekvence. Enzymy se stejným rozpoznávacím místem se nazývají izoschizomery, mohou však mohou štěpit DNA v jiném místě nebo se liší citlivostí k methylaci (21). Rozpoznávací sekvence je dlouhá 4 - 8 nukleotidů a často má charakter palindromu, kdy komplementární řetězec má v tomto úseku pořadí bází zrcadlově obrácené (19). Restriktázy štěpí vlákno buď tak, že vzniknou zarovnané - tupé konce molekuly, nebo překrývající se, asymetrické kohezivní konce na 5' nebo 3' konci řetězce.

### **2.3.3.1 Restrikční enzymy můžeme použít k zjišťování polymorfismů genomu**

V praxi se restrikčních metod využívá pro stanovení polymorfismů v genomu organismu. Tato metoda se nazývá RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), tedy délkový polymorfismus restrikčních fragmentů. Polymorfismy jsou variabilní oblasti genomu, které vznikly mutací a můžeme je nalézt u více jak 1 % populace. Nejčastěji se jedná o jednobodové mutace, které způsobí zánik či vytvoření restrikčního místa a tudíž změnu délky vyštěpené oblasti genomu. Restrikční mix použijeme v tomto případě na předem amplifikovanou DNA v místě, kde polymorfismus zkoumáme, a necháme působit dostatečně dlouho při inkubační teplotě, která je pro každý enzym specifická, nejčastěji se pohybuje okolo 37 °C. Výsledek reakce zviditelníme pomocí elektroforetické metody. Při RFLP metodě je tedy nutné znát cílovou sekvenci

DNA, kterou chceme testovat a v jednom testování jsme schopni stanovit maximálně 1 - 2 polymorfismy na daný úsek (20).

Sledování polymorfismů genomu je důležité, protože hledáním polymorfních úseků DNA daných do souvislosti s fenotypem nositele nám může ukázat, zda je polymorfismus ve vazbě s genem podmiňujícím například projev nemoci, přičemž samotné polymorfní úseky často leží v nekódující oblasti DNA. Testování genomu na polymorfní markery nám ve spojitosti s fenotypovými změnami může dát důležité informace o poloze kandidátních genů, které za fenotyp zodpovídají.

Nejvíce zastoupenými polymorfismy v genomu jsou SNP - single nucleotid polymorphismus, kdy se sekvence DNA liší pouze o jeden nukleotid. Tyto polymorfismy jsou v populaci zastoupeny nejvíce. Dalším hojně zastoupeným polymorfismem jsou tandemové repetice, kdy se několik nukleotidů ve stejném pořadí několikrát opakuje. U minisatelitů se jedná o dva nukleotidy, u mikrosatelitních repetic je opakující se úsek složen z 3-6 nukleotidů. VNTR (variable number of tandem repeats) je polymorfismus v počtu opakování minisatelitů, kdežto u mikrosatelitů používáme pojmenování STR - short tandem repeats. Za možný vznik takovýchto oblastí považujeme skluz DNA polymerázy na tomto úseku během replikace DNA. Pokud známe primery ohraničující celou tuto oblast, můžeme polymorfní úsek množit pomocí PCR reakce a elektroforeticky vyhodnotit produkty. Analýza mikrosatelitních sekvencí se využívá ve vazebných a populačních studiích nebo pro forenzní účely. Tyto sekvence ve srovnání s vývojem jiných sekvencí mají vypovídající hodnotu pro posouzení evolučního vývoje organismu (24).

### 2.3.4 Elektroforéza NK

Elektroforéza je elektromigrační metoda, která nám umožní vyhodnotit a identifikovat fragmenty DNA z předešlých enzymatických metod popsaných výše. Zakládá se na odlišné rychlosti putování různě velkých úseků DNA elektrickým polem skrz agarosový nebo polyakrylamidový gel a to na základě jejich odlišné molekulární hmotnosti nebo konformaci molekuly. Díky zbytkům kyseliny fosforečné mají NK záporný náboj; báze náboj molekuly téměř neovlivňují, proto molekula DNA putuje ke kladné elektrodě - anodě. Pro docílení co nejlepších výsledků můžeme měnit různé parametry metody, jako je napětí stejnosměrného elektrického proudu nebo hustotu gelu. Záleží, kolika bázemi se liší fragmenty, které chceme viditelně oddělit, zda je DNA jedno - či dvouvláknová, roli také hraje teplota, množství vzorku v jamkách gelu a pH pufru.

Agarosa je polysacharid získaný z mořských řas. Jejími monomerními jednotkami jsou D-galaktosa a 3, 6-anhydro-L-galaktosa. Je komerčně dostupná v podobě bílého prášku, který se smíchá s vhodným pufrům. K tomuto účelu se používá nejčastěji TBE pufr, jehož složkami jsou TRIS, kyselina boritá a EDTA, nebo TPE pufr, který se skládá z TRIS, kyseliny fosforečné a EDTA. Nejčastější koncentrace gelu se volí mezi 1 - 4 % a používají se pro separaci fragmentů o délkách 100 - 5000 párů bází. Pro delší fragmenty se volí méně koncentrované gely (20).

Polyakrylamidové gely mají vyšší rozlišovací citlivost, ale agarosové gely jsou výhodnější pro snadnou přípravu, rychlý průběh separace a velký rozsah separovaných fragmentů. Některé firmy vyrábí k rutinnímu použití předem připravené agarosové gely, tzv. *precast agarose gels*, které ušetří čas, ale zároveň na úkor finančních prostředků (20).



K oddělení malých úseků molekul NK slouží modifikace klasické agarosové elektroforézy, tzv. pulzní gelová elektroforéza (PFGE). Zde se v pravidelných intervalech mění intenzita a směr pulzů elektrického proudu, přičemž nukleové kyseliny na tyto změny reagují změnou orientace pohybu. Tomuto procesu se říká reorientace a reorientační čas je čas nutný k jejímu uskutečnění. Delší molekuly mají delší reorientační čas než kratší molekuly a proto se pohybují gelem pomaleji (21). Tato metoda je časově náročnější než klasická elektroforéza, může trvat až několik hodin (20).

Pro vizualizaci NK v gelu se používají interkalační barviva, která se vmezeří do molekuly kyselin mezi nukleotidy pyrimidinového typu a jejich funkční skupiny po aktivaci UV zářením emitují fotony. Tyto barviva jsou součástí gelu a přidávají se do pufru nalitého přes gel v separační vaně. Jedním z nejvíce užívaných barviv je ethidiumbromid - EtBr, který ale pro svou mutagenitu bývá nahrazován jinými barvivy - DAPI, SYBR Green a další (20). K vizualizaci můžeme použít přístroj transiluminátor, který ozáří gel paprsky v UV oblasti a obraz zviditelněné nukleové kyseliny se přenesou do počítače, kde ho můžeme dále upravovat a snímkovat.

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo vhodným křížením vytvořit nové rekombinantní kmeny vycházející z kmenů CcS/Dem s kratšími úseky genomu původem od STS kmene. U zástupců kmene 6354/ XJ se jedná o oblast na distálním konci 10. chromosomu (*Lmr5*) a u kmene 6A/6UV bylo cílem odstranit část STS genomu na 17. chromosomu. Tyto *Lmr* lokusy je potřeba zkrátit proto, abychom mohli lépe identifikovat kandidátní geny, které zodpovídají za parametry určující míru citlivosti vůči nákaze. Tohoto cíle lze docílit zpětným křížením vhodných rekombinantních jedinců s jedinci kmene BALB/c. Z jejich potomků se vyberou heterozygoti, které se dál kříží s BALB/c a z této generace potomků genotypizací zjišťujeme, zda byl původní STS úsek genomu nahrazen úsekem původu BALB/c.

## 4 METODIKA

### 4.1 Izolace DNA

Izolace byla provedena podle (25) z tkáně myších ocásků.

TE pufr: 10 mM Tris-HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)(Serva, Heidelberg, SRN)

0,1 mM EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)

Lyzační pufr: 200 mM NaCl (Lachema, Brno, ČR)

100 mM Tris-base (Serva, Heidelberg, SRN)

5 mM EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)

0,2% SDS (Sigma, St. Louis, Missouri, USA)

Do sterilních mikrozkuvek typu eppendorf o objemu 1,5 ml napipetujeme 750  $\mu$ l lyzačního pufru a přidáme čerstvě rozmraženou proteinázu K (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) tak, aby její výsledná koncentrace byla 100  $\mu$ g/ml lyzačního pufru. Do lyzačního roztoku poté vložíme kousky myšího ocásku (asi 0,5 cm). Zkumavky inkubujeme přes noc na třepačce ve vodní lázni 55 °C teplé.

Následující den zlyzovanou směs centrifugujeme 1 hodinu při 4°C a 4000 otáčkách za minutu (centrifuga Centrifuge 5810 R, Eppendorf, SRN). Supernatant přelijeme do nové mikrozkuvky, ve které je 750  $\mu$ l izopropanolu. Vysráženou

DNA přeneseme sterilní jednorázovou mikrobiologickou kličkou do nové mikrozkuhavky a rozpustíme v 500  $\mu$ l TE pufru.

Pro použití při PCR roztok DNA ředíme na přibližnou koncentraci 4 ng/ml tak, že pipetujeme 12,5  $\mu$ l koncentrovaného roztoku DNA do 500  $\mu$ l sterilní TK H<sub>2</sub>O (voda pro tkáňové kultury). Vzorke DNA uchováváme při 4 °C.

## 4.2 PCR reakce

Tuto metodiku pro radioaktivně neznačené primery můžeme použít, pokud jsou produkty delší než 8 nukleotidů.

5x PCR pufr: 50 mM Tris-HCl (pH 8,4) (Serva, Heidelberg, SRN)

250 mM KCl (Lachema, Brno, Česká republika)

7,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Brazílie)

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

PCR mix připravíme tak, že do mikrozkuhavky postupně pipetujeme tyto chemikálie: 6,7  $\mu$ M primer F (levý primer) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)

6,7  $\mu$ M primer R (pravý primer) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)

5x PCR pufr

5 U/ $\mu$ l Red Taq polymeráza (Sigma - Aldrich, USA)

TK H<sub>2</sub>O.

Do jednotlivých jamek 96-ti jamkové destičky (Thermo Scientific, Velká Británie) pipetujeme vždy 10 µl vzorku (zředěné DNA) a 10 µl PCR mixu. Jamky uzavřeme víčky a vložíme do termálního cykleru (PTC-220 DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Waltham, USA). V něm probíhá PCR podle následujícího schématu:

	3 min	94°C	počáteční denaturace
40 cyklů	30 s	94°C	denaturace
	1 min	55°C	hybridizace
	1 min	72°C	polymerace
	1 min	55°C	hybridizace
	3 min	72°C	polymerace
	1 min	23°C	ukončení reakce

V případě potřeby (u některých primerů) můžeme upravit teplotu hybridizace v rozmezí 50-60 °C a koncentraci MgCl<sub>2</sub> v rozmezí 1,5 – 3 mM.

### 4.3 Restrikce DNA

Ke správnému průběhu restrikce DNA je nutné nechat na vzorek působit restrikční mix dostatečně dlouhou dobu a mít všechny složky směsi ve správném poměru. Restrikční enzym je komerčně připravovaný a dodávaný s potřebným kultivačním médiem, který tvoří vhodné prostředí pro aktivitu enzymu.

K jednomu vzorku pipetujeme: 0,5 µl restrikčního enzymu

1,5 µl Cut Smart Buffer

Do jednotlivých jamek destičky (Thermo Scientific, Velká Británie) pipetujeme 13 µl vzorku a 2 µl restrikčního mixu. Restrikce probíhá podobně jako polymerázová řetězová reakce v thermocyleru (PTC-220 DNA Engine Dyad

Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Waltham, USA) při konstantní teplotě 37 °C. Doba nutná k proběhnutí reakce se liší dle použitého enzymu a dále ovlivňuje výsledek i stáří enzymu - čím použijeme starší enzym, tím ho necháme působit déle. Časy reakcí se tudíž mohou lišit až řádově několika hodin - od 4 hodin až po 18 hodin, kdy necháme restrikci probíhat přes noc.

#### 4.4 Elektroforéza na agarózovém gelu

Elektroforéza slouží k rozdělení produktů PCR podle jejich velikosti. K dělení dochází ve stejnosměrném elektrickém poli při průchodu porézním gelem.

TBE: 90 mM Tris (Serva, Heidelberg, SRN)

90 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (Serva, Heidelberg, SRN)

4 mM EDTA (Serva, Heidelberg, SRN), pH 8.3

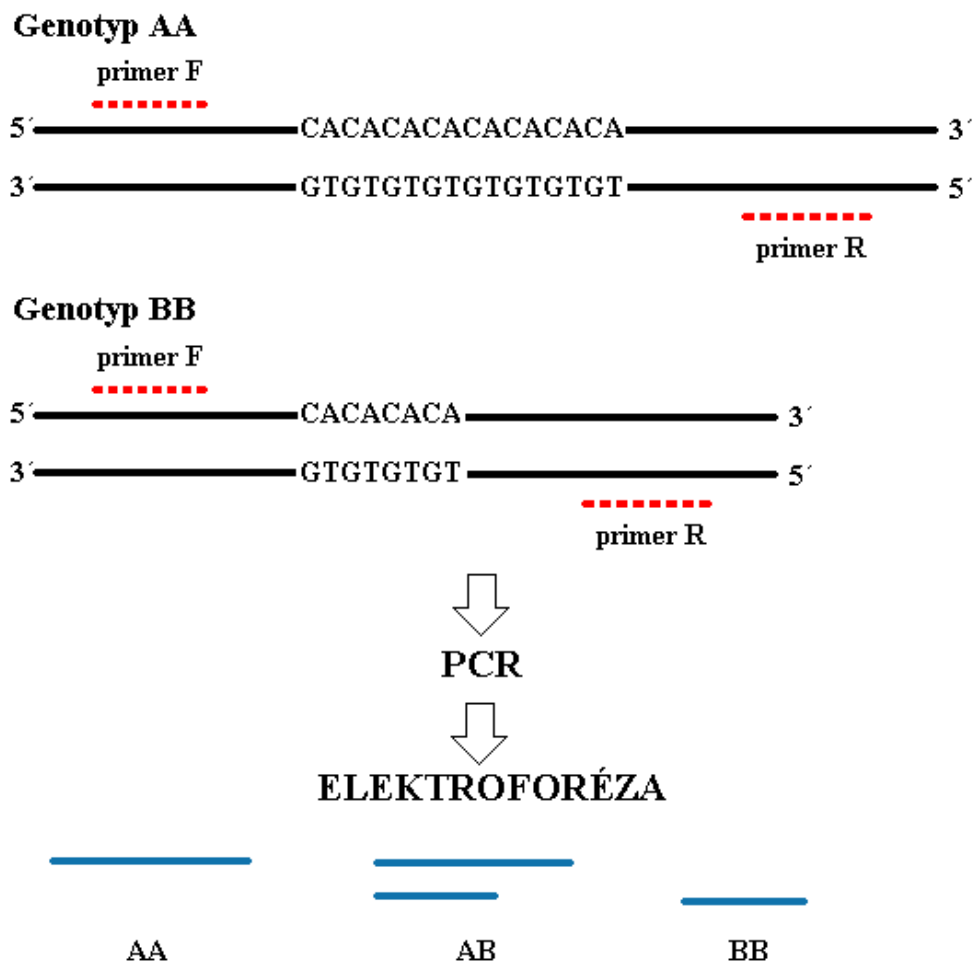
Připravíme si 3% agarosový gel (ideální pro rozlišení délky fragmentů mezi 100 až 200 bp). Navážíme 2,5 g agarosy MetaPhor (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, USA) a 1,25 g agarosy Sigma (Sigma - Aldrich, USA). Agarosu rozpustíme ve 125 ml 0,5x TBE pufru a povaříme několik minut v mikrovlnné troubě. Po částečném vychlazení přidáme 8 µl 1% roztoku EtBr (ethidium bromid; Serva, Heidelberg, SRN). Gel nalijeme do formy a necháme v klidu hodinu polymerovat.

Gel uložíme do horizontální aparatury pro elektroforézu, zalijeme 0,5x koncentrovaným TBE puforem tak, aby byl gel v pufru zcela ponořen, a přidáme 75 µl 1% roztoku EtBr. Do jamek v gelu pipetujeme přibližně

15  $\mu$ l vzorku, do krajních jamek pipetujeme 3  $\mu$ l standardu 50 bp (DNA Ladder, New England BioLabs, USA, koncentrace 80  $\mu$ g/ml). Aparaturu připojíme ke zdroji stejnosměrného napětí Electrophoresis Power Supply 250Ex (GibcoBrl, Gaithersburg, USA). Elektroforéza probíhá při konstantním napětí 150 V, doba trvání je úměrná velikosti děleného produktu, nejčastěji mezi 30–60 minutami. Výsledek elektroforézy zdokumentujeme pod UV světlem vyfocení kamerou GeneGenius (Syngene, Cambridge, Velká Británie).

#### **4.5 Metodika genotypizace myších alel SNP a mikrosatelitními markery**

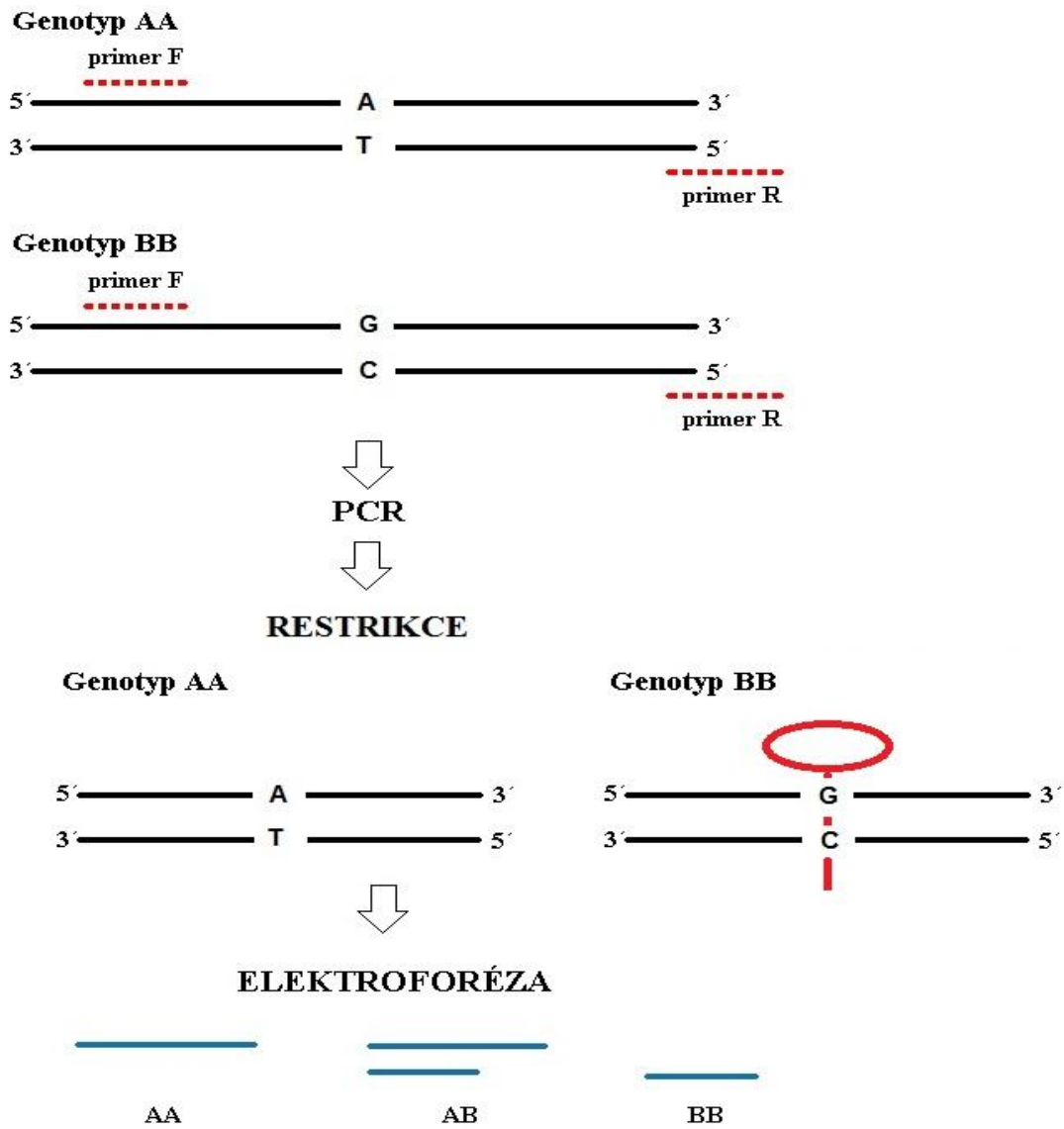
Mezi jednotlivými myšími kmeny existuje velká variabilita v počtu a velikosti repetitivních sekvencí, převážně v nekódujících oblastech. Toho lze s výhodou využít při genetické typizaci myší (26). Pro vývoj nových rekombinantních kmenů bylo důležité zjistit, který úsek DNA je původem BALB/c a který od STS, na základě odlišností v polymorfních oblastech genomu. Variabilitu můžeme detekovat pomocí mikrosatelitních markerů STR úseků, nebo restriční analýzou SNP úseků. Princip těchto metod naznačují schémata níže.



Obrázek 7: Schéma principu genotypizace myších alel mikrosatelitním markerem

Schéma výše popisuje situaci, kdy mikrosatelitním markerem označíme z obou stran úsek STR genomu, amplifikujeme pomocí PCR a elektroforeticky vyhodnotíme produkty o různých délkách.





Obrázek 8: Schéma principu genotypizace myších alel SNP markerem

U SNP primerů je situace podobná, až na to, že polymorfismus tvoří záměna pouze jednoho nukleotidu. Pokud bychom po amplifikaci tohoto úseku provedli elektroforézu, rozdíl je tak nepatrný, že bychom produkty od sebe nemohli správně odlišit. Proto se provede restrikce restrikčním enzymem štěpícím v této oblasti, kdy dostaneme produkty o takových rozdílných délkách, že je výsledek možný následně vyhodnotit elektroforézou.

## 4.6 Metodika vyhledávání vhodných primerů a restričních enzymů

Abychom mohli dosáhnout relevantních výsledků polymerázové řetězové reakce a restričních metod, je nutné umět vyhledat správné primery pro ohraničení úseku DNA o známé sekvenci. K tomu slouží řada programů, bez kterých bychom se v tomto úkolu neobešli.

Nejdříve je nutné vyhledat polymorfismus na požadovaném úseku, tudíž je třeba srovnat dva genomy kmenů, se kterými pracujeme - BALB/c a STS. K tomu slouží program IGV (interactive genomic viewer). Program sám nabídne v daném místě srovnání s vyznačeným polymorfismem. Od tohoto místa vezmeme okolo 250 nukleotidů z každé strany a vložíme tento požadavek na stránkách <http://www.ensembl.org> pro získání přesné nukleotidové sekvence úseku.

Tuto sekvenci vložíme do <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>, kde se podle sekvence nukleotidů vyhledají vhodné primery. Nutné je dát pozor, abychom měli nastavený správný organismus, u kterého primery hledáme, tudíž u nás *Mus musculus*. Vhodné je, aby nukleotidová záměna ležela uprostřed primeru.

K dohledání vhodného restričního enzymu slouží program NebCutter, dostupný na <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php>. Zde vkládáme úsek asi 10 nukleotidů okolo polymorfismu a jednopísmennou zkratkou označíme, o jakou záměnu nukleotidu se jedná.

Program sám vyhledá vhodný restriční enzym, který štěpí danou sekvenci.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Výsledky křížení kmene 6Ax6UV s BALB/c

Myší kmen 6Ax6UV jsme křížili s BALB/c za účelem eliminovat úsek na 17. chromosomu původem od kmene STS. N4 generace tohoto křížení má na 10. chromosomu v oblasti *Lmr5* a na 17. chromosomu heterozygotní alely (viz tabulka 1).

V tabulkách 1-6 je genotyp BALB/c označen číslem 1, heterozygoty číslem 2 a genotyp STS číslem 3. Mužské pohlaví je značeno písmenem m a ženské pohlaví písmenem f.

Tabulka 1: Genotypizované markery a jejich poloha na chromosomu 10 a chromosomu 17

Název markerů	Chromosom 10					Chromosom 17
	rs36885546	rs13480832	rs29348306	10:128410474	rs31479025	D17Mit3
Položka na chromozomu (Mbp)	127,65	128,22	128,38	128,41	128,6	68,14
Genotyp	1	2	2	2	2	2

Tabulka 2: Výsledky genotypizace N4 generace 6Ax6UV křížených s BALB/c

	Číslo myši	Pohlaví	Název markeru				D17Mit3
			rs13480832	rs29348306	10:128410474	rs31479025	
N4 generace	15O-99187	m		2	2		2
	15O-99188	m		2	2		1
	15O-99189	m		1	1		1
	15O-99190	m		1	1		1
	15O-99191	f		2	2		2
	15O-99192	f		1	1		1
	15O-99193	f		2	2		2
	15O-99194	f		2	2		2
	15O-99195	f		2	2		2
	15O-99805	f		2	2		2

Z myší N4 generace jsme vybrali pro další křížení samce 15O - 99188, protože má na 17. chromosomu homozygotní genotyp BALB/c a zároveň heterozygotní genotyp v úseku *Lmr5* a křížili jsme ho se dvěma samicemi BALB/c (tabulka 3).

Dále jsme z myší N4 generace vybrali 2 samice (15O-9193 a 15O-99194), které jsme zkřížili se samcem BALB/c (tabulka 4). Tato generace potomků je pojmenována N5. Takto jsme získali N5 generaci potomků.

Tabulka 3: Výsledky genotypizace N5 generace samce 15O - 99188 x BALB/c

		Název markeru					
	Číslo myši	Pohlaví	rs13480832	rs29348306	10:128410474	rs31479025	D17Mit3
N5 generace	15O-99188	m		2	2		1
	BALB/c	f		1	1		1
	BALB/c	f		1	1		1
	15O-A3105	m		1	1		1
	15O-A3106	f		1	1		1
	15O-A3107	f		1	1		1
	15O-A3465	m		1	1		1
	15O-A3466	f		2	2		1

Tabulka 4: Výsledky genotypizace N5 generace dvou samic 15O-9193 a 15O-99194 x BALB/c

		Název markeru					
	Číslo myši	Pohlaví	rs13480832	rs29348306	10:128410474	rs31479025	D17Mit3
N5 generace	15O-99193	f		2	2		2
	15O-99194	f		2	2		2
	BALB/c	m		1	1		1
	15O-A3883	m		1	1		2
	15O-A3884	m		2	2		1
	15O-A3885	m		2	2		2
	15O-A3886	m		2	2		1
	15O-A3887	m		2	2		2
	15O-A3888	m		2	2		2
	15O-A3889	f		2	2		2
	15O-A3890	f		1	1		1

Z obou generací N5 jsme vybrali jednoho samce (15O-A 3884) a samici (15O-A3466), kteří byli homozygoti na 17. chromosomu a heterozygoti na *Lmr5*. Po jejich křížení jsme získali N6 generaci, ve které se již podařilo identifikovat homozygotní jedince STS původu na úseku *Lmr5* (tabulka 5).

Poté jsme vybrali vhodnou samici a samce s tímto genotypem a křížili je navzájem jako inbrední křížení (tabulka 6).

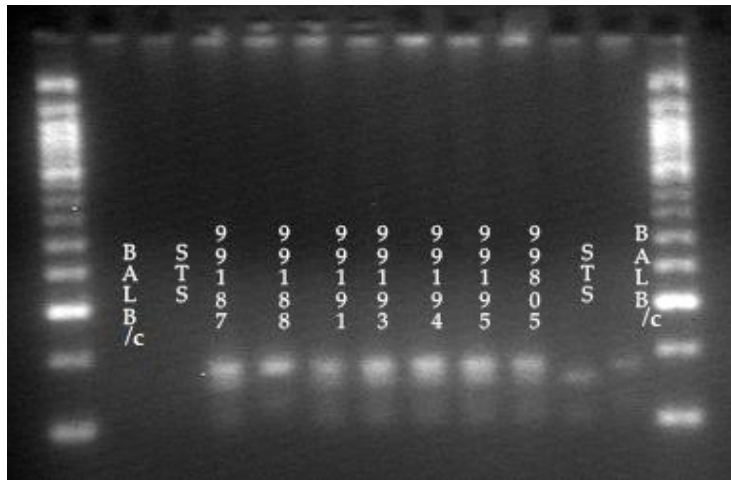
Tabulka 5: Výsledky genotypizace N6 generace

		Název markeru						
		Číslo myši	Pohlaví	rs13480832	rs29348306	10:128410474	rs31479025	D17Mit3
N6 generace	15O-A3884	m		2	2			1
	15O-A3466	f		2	2			1
	15O-A5314	m		3	3			1
	15O-A5315	m		2	2			1
	15O-A5316	m		2	2			1
	15O-A5317	m		2	2			1
	15O-A5318	f		2	2			1
	15O-A5319	f		2	2			1
	15O-A5320	f		3	3			1

Tabulka 6: Výsledky genotypizace inbredního křížení

		Název markeru						
		Číslo myši	Pohlaví	rs13480832	rs29348306	10:128410474	rs31479025	D17Mit3
Inbrední křížení	15O-A5314	m		3	3			1
	15O-A5320	f		3	3			1

Výsledkem křížení je rekombinantní kmen s pracovním názvem A , jehož předpokládaná délka úseku původu STS je 1,5 Mbp.



Obrázek 9: Snímek elektroforézy fragmentů DNA vzorků 99187 - 99805 za použití markeru D17Mit3.

Výsledek elektroforézy na obrázku 9 znázorňuje amplifikované úseky DNA markerem D17Mit3, kdy při srovnání s kontrolními vzorky BALB/c a STS všechny vzorky reprezentují heterozygoty kromě čísla 99188, které má v tomto místě BALB/c alelu.

## 5.2 Výsledky křížení kmene 6354/XJ

Tento kmen vychází z CcS/Dem kmenů a na typizovaných markerech má genom STS původu. Tabulka 7 znázorňuje použité markery úseku *Lmr5* s jejich polohou na chromozomu 10 v Mbp. Postupným křížením na BALB/c jsme získali jedince 15O-99197, který obsahoval heterozygotní úseky na okrajích a STS genom na dvou testovaných markerech uprostřed námi sledovaného úseku na chromosomu 10 (viz tabulka 8), a opět zkřížili se samicemi BALB/c.

V tabulkách 7-10 genotyp BALB/c označujeme číslem 1, heterozygoty číslem 2 a genotyp STS číslem 3. Mužské pohlaví je značeno písmenem m a ženské pohlaví písmenem f.

Tabulka 7: Genotypizované markery kmene 6354/XJ úseku *Lmr5* chromozomu 10

Název markerů	10:127329028	rs8259806	rs36885546	rs13480832	10:128410474	rs31479025
Poloha v Mbp	127,33	127,36	127,65	128,22	128,41	128,6
6354/XJ	3	3	3	3	3	1

Tabulka 8: Výsledky genotypizace myši získaných křížením 15O-99197 x BALB/c

Číslo myši	Pohlaví	Název markeru					
		10:127329028	rs8259806	rs36885546	rs13480832	10:128410474	rs31479025
15O-99197	m	2	3	3	2	2	1
BALB/c	f	1	1	1	1	1	1
BALB/c	f	1	1	1	1	1	1
15O-A1988	m	1	2	2		2	
15O-A1989	f	1	2	2		2	
15O-A1990	f	1	2	2		2	
15O-A1991	f	1	2	2		2	
15O-A2737	m	2	2	2		1	
15O-A2738	m	2	2	2		1	
15O-A2739	m	1	2	2		2	
15O-A2740	f	1	2	2		2	
15O-A2741	f	1	2	2		2	
15O-A2742	f	2	2	2		1	
15O-A2743	f	2	2	2		1	
15O-A2744	f	1	2	2		2	

Z potomků jsme vybrali jednoho samce a dvě samice, u kterých jsme identifikovali pomocí markeru 10:127329028 homozygotní alely BALB/c, viz tabulka 9. Všichni potomci tohoto křížení mají tímto markerem potvrzeny taktéž alely BALB/c. Potomky tohoto křížení jsme genotypizovali markery rs8259806 a 10:128410474, které jsou na koncích tohoto námi sledovaného úseku chromosomu a předpokládáme, že v oblasti mezi těmito markery je původ genomu stejný, jelikož je v tomto místě velmi malá pravděpodobnost rekombinace.

Tabulka 9: Výsledky genotypizace myši získaných křížením samce 15O-1988 a dvou samic - 15O2740 a 15OA2741

Číslo myši	Pohlaví	Název markeru					
		10:127329028	rs8259806	rs36585546	rs13480832	10:128410474	rs31479025
15O-A1988	m		2			2	
15O-A2740	f		2			2	
15O-A2741	f		2			2	
15O-A4576	m		2			2	
15O-A4577	f		2			2	
15O-A4578	f		3			3	
15O-A4579	f		2			2	
15O-A4706	m		1			1	
15O-A4707	m		2			2	
15O-A4708	f		1			1	
15O-A4709	f		2			2	
15O-A4877	m		2			2	
15O-A4878	m		1			1	
15O-A4879	m		3			3	
15O-A4880	f		2			2	
15O-A5305	m		2			2	
15O-A5306	m		3			3	
15O-A5307	f		2			2	
15O-A5308	f		3			3	
15O-A5309	f		2			2	
15O-A5310	f		3			3	
15O-A5311	f		1			1	
15O-A5312	f		3			3	
15O-A5313	f		3			3	



Z této generace potomků jsme vybrali opět dvě samice a jednoho samce s homozygotním genotypem STS v požadovaném úseku (tabulka 10) a tyto myši jsou základem pro nový rekombinantní kmen, kde jsme úsek o délce 0,5 Mbp původu BALB/c nahradili genomem STS, viz Obrázek 11.

Tabulka 10: Vybrané myši nově vzniklého rekombinantního kmene pro další křížení

Číslo myši	Pohlaví	Název markeru					
		10:127329028	rs8259806	rs36885546	rs13480832	10:128410474	rs31479025
15O-A4879	m		3			3	
15O-A4578	f		3			3	
15O-A5310	f		3			3	



Obrázek 10: Snímek elektroforézy fragmentů DNA vzorků za použití markeru rs8259806 s následnou restrikcí enzymem AluI.

Na obrázku 10 je znázorněn výsledek elektroforézy vzorků po použití markeru rs 8259806 a restrikci enzymem AluI. V přední části jsou kontrolní vzorky BALB/c a STS, kde vidíme rozdíly v délkách restrikčních fragmentů, podle kterých určíme vzorky 2, 3, 4, 7, 9-13 a 22 STS původu, 6 a 14-21 BALB/c původu a 1, 5, 8 jako heterozygoty s oběma rodičovskými alelami.

## 6 DISKUZE

Cílem mé práce bylo seznámit se s metodikami molekulárně genetických metod pro vytvoření rekombinantních myších kmenů vycházejících z CcS kmenů nesoucích ve svém genomu úseky DNA rezistentního kmene STS na pozadí genomu BALB/c, který je vnímavý k nákaze parazitem *Leishmania*. Mým úkolem bylo správným použitím těchto metod získat myši s kratšími úseky STS genomu dříve zmapovaného úseku *Lmr5* na distální části chromozomu 10 a tím zpřesnit identifikaci kandidátních genů, které byly dříve vyhodnoceny bioinformatickou metodou.

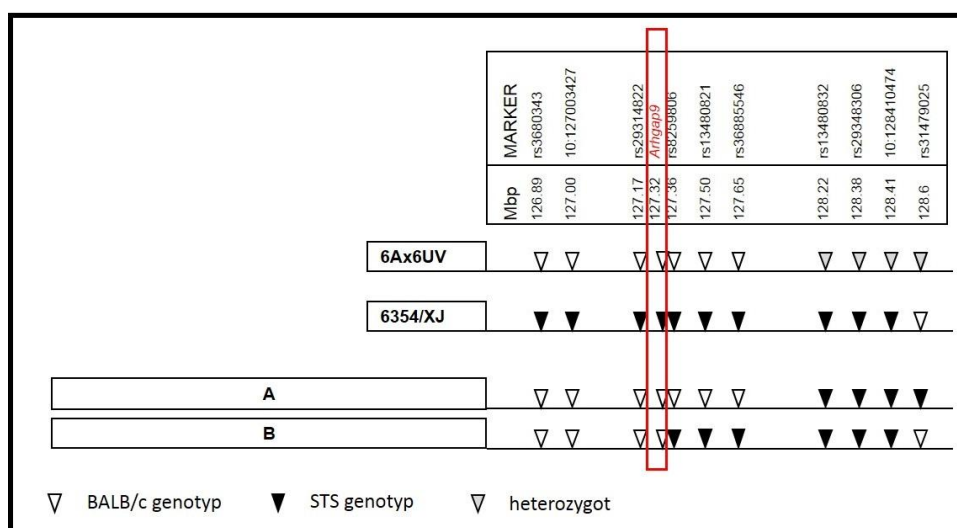
V této práci jsem používala hlavně SNP primery, kdy jsem často dosáhla zřetelnějších výsledků na základě větších rozdílů délek restričních fragmentů (viz Obrázek 10), než tomu bylo u STR markeru D17Mit3 (viz Obrázek 9). DNA fragmenty původu BALB/c a STS namnožené pomocí tohoto STR markeru se liší pouze o 6 nukleotidů, což je hraniční rozdíl zobrazovaný klasickou elektroforézou na agarosovém gelu. Nezáleží také pouze na tomto rozdílu počtu bází, ale celkových délkách amplifikovaných úseků; čím kratší je tato celková délka, tím je čitelnější i malý vzájemný rozdíl mezi těmito úseky. Dalším důvodem k použití SNP markerů je to, že tyto jednobodové polymorfismy jsou v genomu častěji zastoupeny než úseky krátkých tandemových repetitiv (STR). Nevýhodou je, že analýza pomocí SNP obsahuje jeden krok navíc - štěpení restričním enzymem a je tedy dražší.

U kmene 6Ax6UV byly použity konkrétní markery: rs29348306 a 10:128410474 na chromosomu 10 a D17Mit3 na chromosomu 17. Úsek původu STS v kmenu 6Ax6UV bylo nutné eliminovat tak, aby vznikl inbrední kmen s úsekem DNA na 17. chromosomu původem BALB/c, ale přitom *Lmr5* na chromosomu 10 zůstal původem STS. Pro marker rs29348306 jsme použili pro restrikci enzym AluI, pro marker 10:128410474 enzym HhaI. Marker D17Mit3 ohraničuje oblast krátké

tandemové repetice, proto se elektroforeticky zviditelní amplifikovaná část DNA bez restrikce. Po vyhodnocení produktů těchto reakcí pomocí elektroforézy jsem vybrala vhodné myši pro další křížení. Na obrázku 9 v kapitole Výsledky je snímek elektroforézy vzorků za použití markeru D17Mit3, kdy fragment BALB/c je delší a vytváří horní viditelnou čárku v gelu, kdežto alela původem STS postupuje gelem rychleji a tvoří dolní fragment. Vzorky jsou heterozygotní, neboť u nich vidíme obě alely, až na vzorek 99188, jehož úsek je původem BALB/c.

Kmen 6354/XJ jsem genotypizovala pomocí markerů 10:127329028, rs8259806, rs36885546 a 10:128410474. Protože to jsou SNP markery, následovala restrikce, přičemž pro marker 10:127329028 jsem použila enzym *AciI*, pro marker rs8259806 enzym *AluI* dle metodiky v kapitole 4.3. Obrázek 10 v kapitole Výsledky znázorňuje, jak metoda RFLP pomáhá správně určit genotyp myši, neboť různé délky restrikčních fragmentů jsou dobře vidět a lze je z gelu snadno odečíst. V přední části jsou kontrolní vzorky kmenů BALB/c a STS, v části vzorků hned první vzorek reprezentuje heterozygota, který má viditelné jak alely BALB/c, tak i STS.

## Lmr5



Obrázek 11: Znázornění rekombinantních kmenů A a B vzhledem k původním kmenům 6Ax6UV a 6354/XJ

Získané rekombinantní kmeny je možné dál použít pro další postup vedoucí k identifikaci kandidátních genů, což je důležité pro objasnění mechanismů projevu nákazy tímto patogenem.

Jak bylo řečeno v úvodu, viscerální forma projevů je smrtelná a používané léky mají značné vedlejší účinky (27). Zhodnocením dosažených výsledků a posouzením účinku kandidátních genů lze předpokládat lepší pochopení reakcí organismu hostitele a zapojení imunitního systému během nákazy. To by mohlo pomoci k vývoji léčebných postupů a pro zlepšení prognózy pacientů s tímto onemocněním.

## 7 ZÁVĚR

Byly vytvořeny dva rekombinantní kmeny s přesně definovaným genotypem, přičemž oproti původním kmenům byly některé jejich úseky původem STS nahrazeny úseky s genotypem BALB/c. Za tímto účelem jsme použili v daných oblastech mikrosatelitní a SNP markery pro metodu PCR, u SNP markerů bylo dále třeba restričních enzymů, které danou jednonukleotidovou záměnu rozpoznají a amplifikovaný úsek DNA naštěpí specificky podle toho, zda úsek pochází z kmene STS nebo BALB/c. Produkty byly rozděleny elektroforeticky na agarosovém gelu a s přispěním EtBr zviditelněny a vyhodnoceny v přístroji transiluminátoru. Na základě těchto výsledků byly vybrány vhodné myši pro další křížení za účelem dosažení cíle výzkumu.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AV ČR	-	Akademie věd České republiky
CcS/Dem	-	rekombinantní kongenní kmeny myši připravené křížením a šlechtěním rodičovských kmenů BALB/c a STS
CD	-	povrchové molekuly leukocytů (cluster of differentiation)
cM	-	centimorgan
DAPI	-	Fluorescenční barvivo, které se váže na oblasti DNA bohaté na báze AT (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride)
DNA	-	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	-	Deoxyribonukleotidy
EDTA	-	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EtBr	-	Ethidium bromid
f	-	Samice
F <sub>1</sub>	-	První filiální generace
F <sub>2</sub>	-	Druhá filiální generace křížení
IFN $\gamma$	-	Interferon $\gamma$
IgE	-	Imunoglobulin E
IGV	-	Integrační genomický prohlížeč (integrative genomic viewer)
IL	-	Interleukin
<i>Lmr</i>	-	<i>Leishmania major</i> response
m	-	Samec
Mbp	-	Mega base pair
MgCl <sub>2</sub>	-	Chlorid hořečnatý
NaCl	-	Chlorid sodný

NaOH	-	Hydroxid sodný
PBS	-	Fosfátový pufr (Phosphate Buffer Solution)
PCR	-	Polymerázová řetězová reakce
PFGE	-	Pulzní gelová elektroforéza
RCS	-	Rekombinantní kongenní kmen
RFLP	-	Polymorfismus délky restričních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RIS	-	Rekombinantní inbrední kmen
RNA	-	Ribonukleová kyselina
SDS	-	Sodium dodecylsulfát
SNP	-	Single nucleotid polymorphism - jednobodový polymorfismus
STR	-	Polymorfismus krátkého opakujícího se úseku DNA (short tandem repeats)
<i>Taq</i>	-	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	-	Tris - borát - EDTA
TK H <sub>2</sub> O	-	Tkáňová voda
VNTR	-	Polymorfismus v počtu opakování minisatelitů (variable number tandem repeats)
QTL	-	Quantitative trait loci - lokus kvantitativních znaků

## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **JEBAVÝ, Lukáš.** *Chov laboratorních zvířat: [učební text pro vyučovaný předmět Chov laboratorních zvířat].* V Praze: Česká zemědělská univerzita, 2011. ISBN 9788021321786.

2. **LIPOLDOVÁ, Marie, DEMANT Peter.** Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2006, 7(4), 294-305 [cit. 2017-05-16]. DOI: 10.1038/nrg1832. ISSN 14710056. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg1832>

3. **ROBERTS, L. S., JANOVOY J.** *Foundations of parasitology.* 5th ed. Dubuque: Wm. C. Brown Publishers, c1996. ISBN 0697260712.

4. **Leishmaniasis.** *World Health Organization.* [Online], aktualizováno 2017. [Citace: 10. 5 2017.] <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>.

5. **LEIBY, A. D.** Leishmaniasis. [autor knihy] Felipe KIERSZENBAUM. *Parasitic infections and the immune system.* San Diego : Academic Press, inc., 1994, stránky 90-109, ISBN 0124065759.

6. **U.S. Department of Health and Human Services.** Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern. *Centers for disease control and prevention.* [Online], aktualizováno 2017. [Citace: 10. 5 2017.] [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx).

7. **Ústav lékařské biologie a lékařské genetiky 1. LF a VFN.** Aktuální genetika. [Online] 2005 - 2006. [http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/komparativni\\_genomika.htm](http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/komparativni_genomika.htm).

8. **Kolektiv autorů.** *Molekulární medicína a biotechnologie: soubor přednášek.* Praha: Galén pro 1. LF UK v Praze, c2008. ISBN 9788072625352.



9. **PANCZAK, Aleš, OTOVÁ, Berta ed.** *Molekulární biologie a genetika III.díl.* Praha : Karolinum, 2013. ISBN 978-80-246-2415-0.

10. **SILVER, L. M.** *Mouse genetics: concepts and applications.* New York : Oxford University Press, 1995. ISBN - 0195075544.

11. **MARKEL et al.** Theoretical and empirical issues for marker-assisted breeding of congenic mouse strains. *Nature Genetics* [online]. 1997, **17**(3), 280-284 [cit. 2017-05-16]. DOI: 10.1038/ng1197-280. ISSN 10614036. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ng1197-280>.

12. **DEMANT, Peter.** Cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer. *Nature Reviews Genetics* [online]. 2003, **4**(9), 721-734 [cit. 2017-05-16]. DOI: 10.1038/nrg1157. ISSN 14710056. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg1157>

13. **DEMANT, Peter a HART, A. A. M.** Recombinant congenic strains—a new tool for analyzing genetic traits determined by more than one gene. *Immunogenetics*, 1986, 24.6: 416-422, PMID 3793154. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00377961>.

14. **MOEN, C. J. A., VAN DER VALK A. M., SNOEK M.** The recombinant congenic strains—a novel genetic tool applied to the study of colon tumor development in the mouse. *Mammalian Genome* [online]. 1991, **1**(4), 217-227 [cit. 2017-05-16]. DOI: 10.1007/BF00352328. ISSN 09388990. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00352328>

15. **SNUSTAD, D. P., SIMMONS M. J., RELICHOVÁ, J., ed.** *Genetika*. Přeložil Anna MATALOVÁ. Brno: Masarykova univerzita, 2009. ISBN 9788021048522

16. **DE SANTIS F., DI DONATO V., DEL BENE F.** *Clonal analysis of gene loss of function and tissue-specific gene deletion in zebrafish via CRISPR/Cas9 technology* [online]. s. 171 [cit. 2017-05-16]. DOI: 10.1016/bs.mcb.2016.03.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X16000510>
17. **KUREY, I., KOBETS T., HAVELKOVÁ H.** et al. Distinct genetic control of parasite elimination, dissemination, and disease after *Leishmania major* infection. *Immunogenetics* [online]. 2009, **61**(9), 619-633 [cit. 2017-05-16]. DOI: 10.1007/s00251-009-0392-9. ISSN 00937711. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00251-009-0392-9>
18. **LIPOLDOVÁ, M., SVOBODOVÁ M., HAVELKOVÁ H.**, et al. Mouse genetic model for clinical and immunological heterogeneity of leishmaniasis. *Immunogenetics* [online]. 2002-6-1, **54**(3), 174-183 [cit. 2017-05-16]. DOI: 10.1007/s00251-002-0439-7. ISSN 00937711. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00251-002-0439-7>
19. **ZVÁROVÁ, Jana, MAZURA Ivan.** *Metody molekulární biologie a bioinformatiky*. Praha: Karolinum, 2012. Biomedicínská informatika. ISBN 9788024621500.
20. **BERÁNEK, Martin.** *Molekulární genetika pro bioanalytiky*. Praha : Karolinum, 2016. ISBN 9788024632247.
21. **ŠMARDA, Jan.** *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 8021038411.
22. **BROWN, T. A.** *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. 6th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, c2010. ISBN 9781405181730.

23. **ALBERTS, B.** *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky.* [překl.] P. HOZÁK a B. BOUZEK. 2. vydání. Ústí nad Labem : Espero Publishing, 1998. ISBN 8090290604.

24. **OTOVÁ, Berta.** *Lékařská biologie a genetika.* Praha: Univerzita Karlova, 2008. ISBN 9788024615943.

25. **LAIRD P. W., ZIJDERVELD A., LINDERS K. et al.** A. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research.* 1991;19(15):4293, PMID: PMC328579. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC328579/>

26. **DIETRICH, W. F., KATZ, H., LINCOLN, S. E.** A Genetic Map of the Mouse Suitable for Typing Intraspecific Crosses. *Genetics*, 131(2), 423–447, PMID: PMC1205016. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1205016/>

27. **KOBETS, T., I. GREKOV AND M. LIPOLDOVA.** Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. *Current Medicinal Chemistry.* 2012, vol. 19, no. 10, s. 1443-1474. ISSN 0929-8673/1875-533X. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/node/96762/article>.

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: <i>Leishmania major</i> . (a) amastigot; (b) promastigot. 1 – jádro, 2 – kinetoplast, 3 – kinetozóm, 4 – axonema, 5 – bičík (podle (3)).....	14
Obrázek 2: Výskyt kožní formy leishmaniózy( podle (4)) .....	15
Obrázek 3: Výskyt viscerální formy leishmaniózy ( podle (4)) .....	15
Obrázek 4: Životní cyklus <i>Leishmanie</i> (podle (6)). .....	17
Obrázek 5: Produkce kongenního kmene (9). .....	20
Obrázek 6: Schéma přípravy rekombinantních kongenních kmenů série CcS/Dem. ....	22
Obrázek 7: Schéma principu genotypizace myších alel mikrosatelitním markerem .....	40
Obrázek 8: Schéma principu genotypizace myších alel SNP markerem .....	41
Obrázek 9: Snímek elektroforézy fragmentů DNA vzorků 99187 - 99805 za použití markeru D17Mit3.....	46
Obrázek 10: Snímek elektroforézy fragmentů DNA vzorků za použití markeru rs8259806 s následnou restrikcí enzymem AluI. ....	49
Obrázek 11: Znázornění rekombinantních kmenů A a B vzhledem k původním kmenům 6Ax6UV a 6354/XJ .....	51

## 11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: Genotypizované markery a jejich poloha na chromosomu 10 a chromosomu 17 .....	43
Tabulka 2: Výsledky genotypizace N4 generace 6Ax6UV křížených s BALB/c ..	43
Tabulka 3: Výsledky genotypizace N5 generace samce 15O - 99188 x BALB/c ...	44
Tabulka 4: Výsledky genotypizace N5 generace dvou samic 15O-9193 a 15O-99194 x BALB/c.....	44
Tabulka 5: Výsledky genotypizace N6 generace .....	45
Tabulka 6: Výsledky genotypizace inbredního křížení .....	45
Tabulka 7: Genotypizované markery kmene 6354/XJ úseku Lmr5 chromozomu 10 .....	47
Tabulka 8: Výsledky genotypizace myši získaných křížením 15O-99197 x BALB/c .....	47
Tabulka 9: Výsledky genotypizace myši získaných křížením samce 15O-1988 a dvou samic - 15O2740 a 15OA2741 .....	48
Tabulka 10: Vybrané myši nově vzniklého rekombinantního kmene pro další křížení.....	49