

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

HMGB1 při bakteriálních infekcích

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Ing. Bc. Igor Šplíchal, CSc.

Garant za KBLV: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové 30. 4. 2010

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Ing. Bc. Igoru Šplíchalovi, CSc. a PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za odborné vedení a zároveň za možnost pracovat na takto zajímavém tématu. Také bych za pomoc ráda poděkovala MUDr. Alce Šplíchalové Ph.D. a ostatním pracovníkům Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. v Novém Hrádku.

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci grantů GA ČR 523/07/0572 a 524/09/0365.

Abstrakt

Bc. Petra Chmelařová

Název diplomové práce: HMGB1 při bakteriálních infekcích

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

Cíl práce: Stanovení aktivace genové exprese HMGB1 na úrovni mRNA a výskytu proteinu v krvi a v tenkém střevě při bakteriální infekci u infekčního modelu gnotobiotického selete. Zhodnocení průběhu infekčního procesu expresí IL-8, IL10, TNF- α a TLR4 v tenkém střevě na úrovni mRNA a IL-8, IL10 a TNF- α v krvi a střevním výplachu na úrovni proteinu. Výsledné posouzení HMGB1 jako možného pozdního markeru sepse u prasete.

Metody: 1) Skupiny gnotobiotických selat – bezmikrobní (kontrola), infikovaná (extracelulární parazit *E.coli* O55 nebo intracelulární parazit *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium) a asociovaná selata (probiotická *E.coli* Nissle 1917), 2) stanovení počtu CFU bakterií v krvi a střevě kultivací na bakteriologických půdách, 3) izolace celkové RNA ze střeva kolonkovou metodou, 4) spektrofotometrická kvantifikace a odhad čistoty celkové RNA, 5) syntéza cDNA metodou s kombinovanými primery (oligo d(T) a náhodné n-mery), 6) polymerázová řetězová reakce v reálném čase s LNA sondami, 7) normalizace genových prepisů k β -aktinu a jejich relativizace k průměrné hodnotě prepisu genu, 8) stanovení koncentrací HMGB1 a vybraných cytokinů v krevní plasmě a ve výplachu tenkého střeva metodou ELISA.

Výsledky: 1) Aktivace genového prepisu HMGB1 byla nejnižší v případě infekce bezmikrobního selete enteropatogenní *E.coli* O55, 2) nejvyšší aktivace většiny genů byla v případě *S. Typhimurium* – výjimku tvořil IL-10 u *E.coli* O55, 3) nejvyšší hodnoty HMGB1 v plasmě byly u *E.coli* O55, 4) ve střevním výplachu byly vysoké koncentrace HMGB1 u obou virulentních bakterií, zatímco u bezmikrobních selat a selat asociovaných probiotickou *E.coli* nebyl HMGB1 nalezen, 5) hodnoty cytokinů v plasmě byly nejvyšší u *E.coli* O55, ve střevě byly vysoké hodnoty u obou virulentních bakterií, 6) exprese mRNA pro TLR4 ve střevě byla nejvyšší u selat infikovaných *S. Typhimurium*.

Závěry: Genový prepis HMGB1 je konstitutivní. HMGB1 se vyskytuje v plasmě pouze u selat v těžkém septickém stavu a jeho hodnoty korelují s předpokládanou mortalitou (infekce *E.coli* O55). Ve střevě jsou vysoké hladiny HMGB1 vyvolány virulentními bakteriemi. Hodnoty vybraných referenčních cytokinů jsou v souladu s dříve publikovanými údaji a zdravotním stavem zvířat. HMGB1 u prasete je proto možno, stejně jako u jiných živočišných druhů a člověka, považovat za pozdní marker sepse.

Abstract

Bc. Petra Chmelařová

Title of diploma thesis: HMGB1 in bacterial infections

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biological and Medical Sciences

Background: Detection of HMGB1 mRNA expression and HMGB1 at the protein level in blood and ileum during bacterial infection in gnotobiotic piglet as infection model. Evaluation of the course of infection with expression IL-8, IL10, TNF- α and TLR4 mRNA in ileum and IL-8, IL10 a TNF- α levels in blood and intestinal washes. Final assessment of HMGB1 as potential late marker of sepsis in pig.

Methods: 1) The groups of gnotobiotic piglets – germfree (control), infected (extracellular parasite *E.coli* O55 or intracellular parasite *Salmonella enterica* serogroup Typhimurium) and associated piglets (probiotic *E.coli* Nissle 1917), 2) determination of bacterial count as CFU in blood and intestine with cultivation on bacteriological media, 3) column-based total RNA isolation from intestine, 4) spectrophotometric RNA quantification and estimation of purity, 5) cDNA synthesis with combined primers (oligo d(T) and random n-mers), 6) real-time polymerase chain reaction with LNA probes, 7) real-time PCR data normalization to β -actin and relativization to mean value of gene transcription, 8) ELISA detection of HMGB1 and selected cytokines levels in blood plasma and intestine washes.

Results: 1) Activation of HMGB1 gene expression was the lowest in germ-free piglets infected with enteropathogenic *E.coli* O55, 2) the highest activation in most genes was found in case of *S. Typhimurium* – exception was IL-10 in *E.coli* O55, 3) the highest plasma levels of HMGB1 were in group infected with *E.coli* O55, 4) in both virulent bacteria HMGB1 level was elevated in intestine washes, whereas HMGB1 was not found in germ-free piglets and piglets associated with probiotic *E.coli*, 5) we found the highest plasma cytokine levels in case of *E.coli* O55, cytokine concentrations in intestine were elevated in both virulent bacteria, 6) mRNA expression for TLR4 was the most increased in piglets infected with *S. Typhimurium*.

Conclusions: Gene transcription of HMGB1 is constitutive. HMGB1 is present in plasma only in piglets under severe septic condition and levels correlate with expected mortality (*E.coli* O55 infection). Increased HMGB1 levels in intestine caused with virulent bacteria. Concentrations of selected reference cytokines are in accordance with recently published data and state of animal health. So it is possible regard HMGB1 as late marker of sepsis in pig as well as other animal species and human.

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah	6
1 Úvod a cíle práce	9
2 Literární přehled.....	10
2.1 High-mobility group box 1	10
2.1.1 Struktura HMGB1	10
2.1.2 Nukleární funkce	11
2.1.3 Extracelulární funkce	11
2.1.4 Receptory pro HMGB1	13
2.1.5 Kinetika uvolňování HMGB1	15
2.1.6 Inhibice HMGB1	16
2.2 Cytokiny	18
2.2.1 Interleukin-8.....	18
2.2.2 Interleukin-10.....	18
2.2.3 Faktor nekrotizující nádory α	19
2.3 Adhezivní molekuly.....	19
2.4 Metody analýzy.....	20
2.4.1 Izolace RNA	20
2.4.2 Reverzní transkripce.....	21
2.4.3 Real-time PCR	21
2.4.4 ELISA	25
2.5 Miniaturní prase jako model v infekční imunologii	26
2.6 Bakterie	28
2.6.1 <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 (EcN)	28
2.6.2 <i>Escherichia coli</i> O55.....	28

2.6.3	<i>Salmonella enterica</i> sérovar Typhimurium.....	29
3	Materiál a metody.....	30
3.1	Srovnání nukleotidových a proteinových sekvencí.....	30
3.2	Navržení detekčního systému pro prasečí HMGB1 s LNA sondou	30
3.3	Odchov gnotobiotických selat	30
3.4	Odběr a zpracování materiálu.....	31
3.5	Mikrobiologie	31
3.5.1	Příprava bakteriální suspenze	31
3.5.2	Mikrobiologická kontrola	32
3.5.3	Záchyt mikrobů v orgánech a tělních tekutinách	32
3.6	Izolace RNA	32
3.7	Stanovení koncentrace a čistoty izolované RNA.....	33
3.8	Syntéza cDNA	34
3.9	Real-time PCR.....	34
3.10	ELISA.....	36
3.10.1	Stanovení HMGB1.....	36
3.10.2	Stanovení cytokinů	37
3.11	Statistické vyhodnocení	39
3.12	Tvorba citací	39
4	Výsledky.....	40
4.1	Srovnání nukleotidových a proteinových sekvencí HMGB1	40
4.2	Navržení systému pro stanovení genového přepisu HMGB1	41
4.3	Stanovení počtu bakterií v krvi a tenkém střevě.....	42
4.4	Měření koncentrace RNA a její čistoty	43
4.5	Stanovení genového přepisu HMGB1, cytokinů a TLR4 ve střevě	44
4.6	Stanovení hladiny HMGB1 a cytokinů v plasmě metodou ELISA.....	47
4.7	Stanovení hladiny HMGB1 a cytokinů ve střevě metodou ELISA.....	50
5	Diskuze	53
6	Závěr.....	57

7	Seznam zkratek	58
8	Seznam použité literatury	61
9	Přílohy.....	73
	9.1 Fotografie pořízené při práci na MBÚ AV ČR, v.v.i.	73
	9.2 Srovnání nukleotidových sekvencí HMGB1 u vybraných druhů	76

1 Úvod a cíle práce

High mobility group box 1 (HMGB1) je vysoce konzervovaný ubikvitární protein, nachází se v jádře a cytoplasmě všech buněk. Zprvu byl popisován jako nukleární protein, který nespecificky váže DNA, usnadňuje interakci DNA s dalšími proteiny a ovlivňuje tak genovou expresi. Později začala být studována jeho schopnost indukovat zánětlivou odpověď a byl zařazen do vrozeného imunitního systému. Může být uvolněn pasivně z nekrotických buněk nebo aktivně ze stimulovaných monocytů, makrofágů a dendritických buněk. Prostřednictvím receptorů RAGE a TLR působí jako amplifikátor zánětlivé odpovědi. Mimo jiné má chemotaktické vlastnosti a vyvolává sekreci prozáněťových faktorů, hlavně TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8. Bylo prokázáno, že je zapojen do patogeneze septického šoku, revmatoidní artritidy, aterosklerózy, diseminované intravaskulární koagulace, roztroušené sklerózy, maligních a dalších onemocnění. Proto je s velkým zájmem zkoumána inhibice jeho aktivity, která byla na zvířecích modelech úspěšná. V klinických studiích je také nalézána korelace mezi jeho koncentrací v cirkulaci a úrovní septických stavů a prognózou přežití.

Hlavním cílem této práce bylo provést stanovení exprese HMGB1 na úrovni mRNA a proteinu po infekci bakteriemi *Salmonell enterica* sérovar Typhimurium a enteropatogenní *Escherichia coli* O55. Pro srovnání jsme použili hodnoty získané u bezmikrobních selat a po asociaci s probiotickým kmenem *Escherichia coli* Nissle 1917. Abychom měli přehled o stimulaci imunitního systému, sledovali jsme i expresi IL-8, IL-10 a TNF- α . Pracovali jsme s gnotobiotickým modelem selete. Použili jsme metody real-time PCR a ELISA aplikované na gnotobiotický model selete.

Díličí cíle jsou:

- 1) určení počtu CFU v krvi a tenkém střevě gnotobiotických selat infikovaných *S. Typhimurium* nebo *E. coli* O55 nebo asociovaných *E.coli* Nissle 1917,
- 2) stanovení aktivace genového přepisu HMGB1, TLR4 a cytokinů IL-8, IL-10 a TNF- α v ileu gnotobiotických selat infikovaných *S. Typhimurium* nebo *E. coli* O55 a asociovaných *E. coli* Nissle 1917 a bezmikrobního selete pomocí real-time PCR,
- 3) kvantifikace HMGB1 a cytokinů IL-8, IL-10 a TNF- α ve vzorcích plasmy a výplachu tenkého střeva gnotobiotických selat infikovaných *S. Typhimurium* nebo *E. coli* O55, asociovaných *E. coli* Nissle 1917 a bezmikrobního selete metodou ELISA.

2 Literární přehled

2.1 High-mobility group box 1

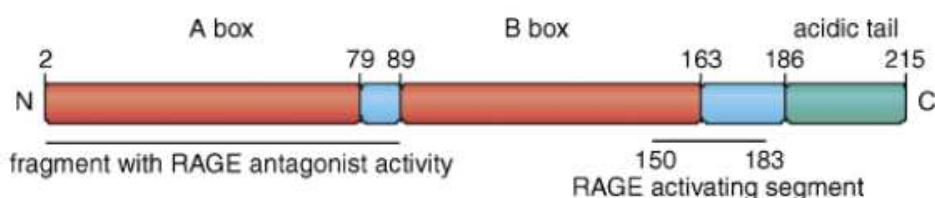
HMGB1 (dříve známý jako HMG-1 nebo amfoterin) patří do skupiny nehistonových proteinů, které byly objeveny v roce 1973 při analýze chromatinových proteinů extrahovaných z telecího thymu a byly pojmenovány podle své elektroforetické pohyblivosti v polyakrylamidovém gelu jako high-mobility group (HMG) proteiny [37].

Proteiny HMG se dělí do 3 rodin (HMGA, HMGB a HMGN), všechny mají schopnost vázat a ohýbat DNA, ale nejsou to transkripční faktory jako takové. Rodina HMGB má 3 členy — HMGB1, HMGB2 a HMGB3 [15]. Zatímco HMGB1 je téměř ubikvitární, zbylé dva proteiny (HMGB2 a HMGB3) jsou exprimovány (tj. vyjádření genetické informace v primární struktuře mRNA a následně vytvoření proteinu [70]) spíše v embryonální fázi života. V dospělé fázi je jejich exprese omezena [67].

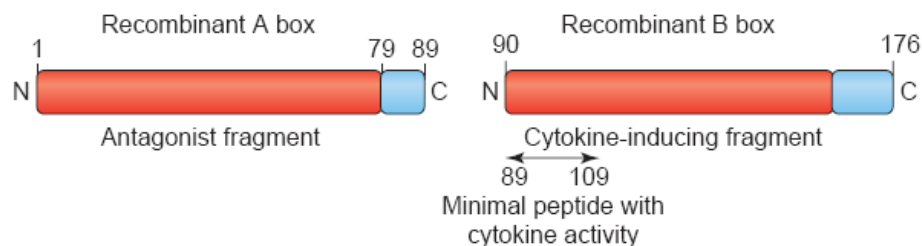
Jsou složeny ze 3 domén: 2 homologní DNA-vazebné domény (box A a box B) a kyselá C-terminální doména. Za rozdíl mezi jednotlivými HMGB proteiny je zodpovědná právě C-terminální doména. U HMGB1 je tato doména nejdelší a u HMGB3 nejkratší.

2.1.1 Struktura HMGB1

Jedná se o malý protein, který je složen z 215 aminokyselin [37]. Molekulová hmotnost tohoto proteinu je přibližně 25 kDa, ačkoli se při elektroforéze (SDS-PAGE) pohybuje na pozici 30 kDa. Je to způsobeno tím, že obsahuje nezvyklý počet pozitivně nabitých aminokyselin [12].



Obr. 1: Struktura HMGB1. DNA-vazebné domény jsou vyznačeny červeně a negativně nabitý C-konec zeleně. Modře vyznačené úseky jsou spojovací segmenty [26].



Obr. 2: Rekombinantní boxy A a B [26]

HMGB1 je velmi hojný (na jednu buňku připadá v průměru milión molekul) a evolučně vysoce konzervovaný. U savců je jeho proteinová sekvence identická z 99 % [67]. Lidský HMGB1 je kódován na chromozomu 13q12 [30].

2.1.2 Nukleární funkce

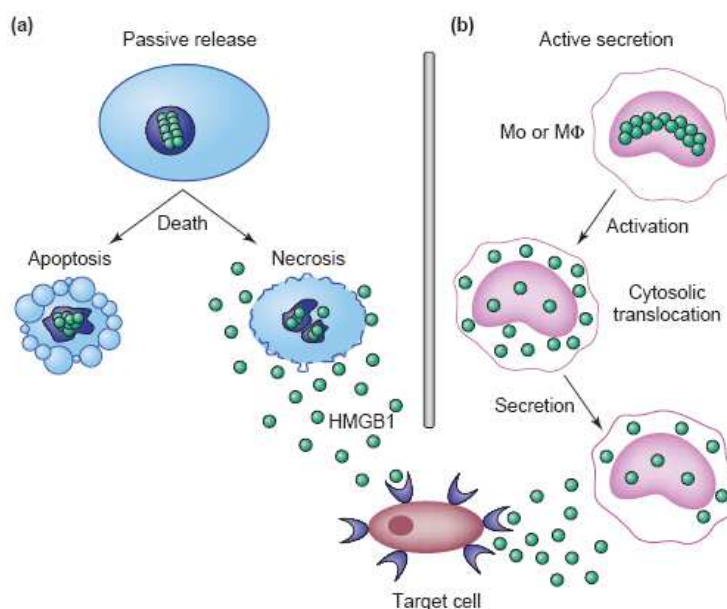
HMGB1 nespecificky váže DNA v malém žlábků a ohýbá ji o 90° a více. Cílem je umožnit přechodnou interakci DNA s dalšími proteiny, které mají funkci transkripčních faktorů, jsou to například receptory steroidních hormonů, p53, NF-κB nebo RAG1/2 [113]. HMGB1 také interaguje s DNA v místech, kde je již ohnutá, jako například po ozáření UV [76], po inkorporaci nukleotidových analogů [56] nebo kvůli tvorbě kovalentních aduktů (cisplatina) [41].

Nukleární lokalizace HMGB1 a jeho afinita k DNA je ovlivňována fosforylací a acetylací lyzinových zbytků. Hyperacetylované formy HMGB1 jsou hromaděny v sekrečních lysozomech a po stimulaci aktivně uvolněny do extracelulárního prostoru, zatímco jaderné molekuly HMGB1 jsou hypoacetylované. Pravděpodobně je to tak díky deacetylázám v jádře [13].

2.1.3 Extracelulární funkce

Řadí se společně s HSP, hyaluronanem [91] a proteiny S100 [85] do skupiny molekul označovaných jako alarminy. Alarminy jsou molekuly endogenního původu, které jsou uvolňovány v případech jak infekce, tak i sterilního zánětu (bez přítomnosti bakterií). Prostřednictvím receptorů PRRs (Pattern Recognition Receptors) jsou schopny vyvolat imunitní odpověď. Tato skupina receptorů rozeznává i exogenní nebezpečné vzory (PAMPs - Pathogen Associated Molecular Patterns), které společně s alarminy nazýváme DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) [11].

HMGB1 se může do extracelulárního prostoru uvolnit buď pasivně při nekróze [90] nebo aktivní sekrecí buňkami přirozené imunity (makrofágy, monocyty, dendritické buňky), které mohou být stimulovány cytokiny jako např. IL-1 β , TNF- α , INF- γ nebo lipopolysacharidem (LPS) [109].



Obr. 3: Pasivní (a) a aktivní (b) uvolňování HMGB1 [26]

Biologická aktivita HMGB1:

- zvyšuje expresi adhezivních molekul (ICAM-1, VCAM-1), monocytárního chemotaktického proteinu-1 (MCP-1), tkáňového aktivátoru plasminogenu (tPA) a inhibitoru aktivátoru plasminogenu-1 (PAI-1) endoteliálními buňkami [33]
- narušuje bariérovou funkci endoteliální vrstvy [73]
- působí jako chemoatraktant pro myeloidní [3] a hladkosvalové buňky [22]
- podporuje přestavbu cytoskeletu a transendoteliální migraci u monocytů, hladkosvalových buněk cév a mesoangioblastů – kmenových buněk na vnější straně stěn velkých cév [22;73;86]
- zvyšuje expresi genů pro prozáněťové faktory (TNF, IL-1 β a IL-8) v neutrofilech [74]
- vyvolává sekreci prozáněťových faktorů v monocytech a makrofázích (TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-1RA, IL-6, IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β) [3], dendritických (TNF, IL- α , IL-6, IL-8 a IL-12) [64] a endoteliálních buňkách (TNF a IL-8) [33]

- stimuluje dendritické buňky k maturaci, přičemž zvyšuje expresi CD40, CD54, CD58, CD80 a CD83 [64]
- podporuje Th1 polarizaci [64]
- zvyšuje proliferaci mesoangioblastů [73]
- oslabuje bariérovou funkci intestinálních epitelí a zvyšuje permeabilitu enterocytů [89]
- zvyšuje imunogenicitu solubilních i korpuskulárních antigenů [87]

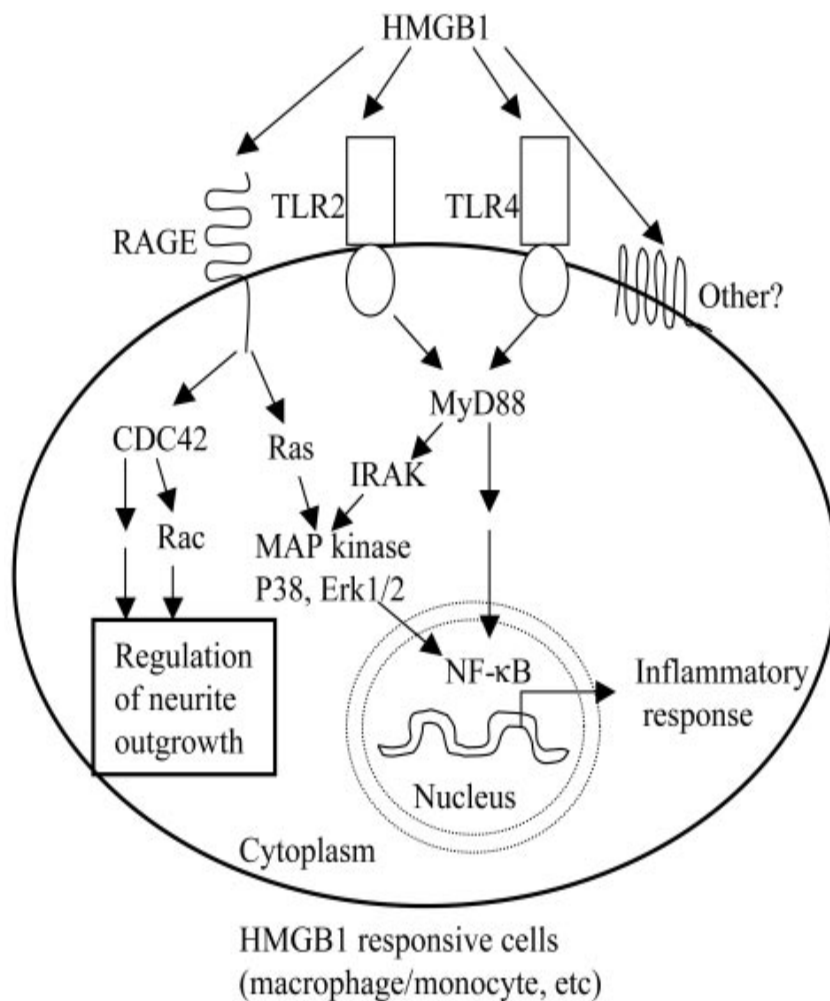
2.1.4 Receptory pro HMGB1

Jako první receptor vázající HMGB1 byl objeven RAGE (receptor for advanced glycation end products), přičemž jeho vazebná afinita k HMGB1 je sedmkrát vyšší než k AGEs (advanced glycation end products) [43]. Je to transmembránový protein a patří do rodiny imunoglobulinů. Je exprimován monocyty, makrofágy, také endoteliálními buňkami, hladkosvalovými buňkami cév a neurony. Reaguje s širokým spektrem ligandů zahrnujících kromě HMGB1 a konečných produktů pokročilé glykace (AGEs) i β -amyloid a proteiny S100 [98].

Právě přítomnost tohoto receptoru umožňuje prozánětlivé působení HMGB1 na makrofágy a endoteliální buňky [106]. RAGE zprostředkovává cytokinovou aktivitu HMGB1. Aktivuje monocyty k sekreci TNF- α a IL-1 [3]. Za normální situace je RAGE exprimován málo, jeho hladina ale roste v místech, kde se naakumulují jeho ligandy (jeho exprese je zvyšována, upregulována, v přítomnosti jeho ligandů) [18]. Interakce mezi HMGB1 a RAGE vyžaduje bazický úsek mezi B boxem a kyselým koncem, jedná se o aminokyseliny 150-183 [45]. Box A se chová jako kompetitivní inhibitor HMGB1, což znamená, že se na receptor váže, ale nezpůsobuje aktivaci a tím tlumí zánětlivou odpověď [58].

Další receptory, které mohou vázat HMGB1, jsou Toll-like receptory (TLR) - TLR2 a TLR4, exprimované makrofágy [75]. Patří do skupiny receptorů PRRs, které rozpoznávají endogenní i exogenní molekuly a aktivují vrozený imunitní systém a propojují ho s adaptivním [1]. TLR4 je známý i pro svou schopnost rozpoznávání bakteriálního lipopolysacharidu (LPS) a indukuje tvorbu cytokinů [88]. Interakce TLR4 a LPS vyžaduje spolupráci proteinů CD14 a MD2 (myeloid differentiation protein), který je vázaný na extracelulární doménu TLR4 [17].

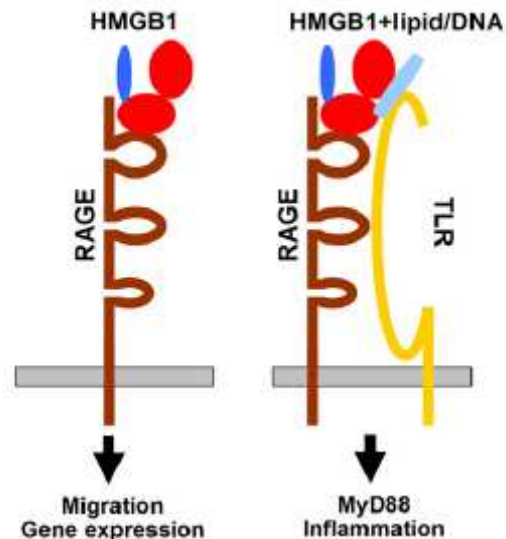
Navázání HMGB1 k receptorům RAGE nebo TLR způsobí aktivaci různých signálních molekul: NF- κ B, ERK1/2, p38 a SAPK/JNK kináz [43;46;74;75;89].



Obr. 4: Schéma transdukce signálu [112]

Interakce HMGB1 a TLR4 aktivuje NAD(P)H-oxidázu, která katalyzuje tvorbu reaktivních sloučenin kyslíku (ROS) v neutrofilech, což je považováno za jeden z mechanismů poškození tkáně vlivem vysoké koncentrace HMGB1 v cirkulaci [29].

Navíc receptory RAGE a TLR mohou spolupracovat při vazbě komplexů HMGB1 s nukleovými kyselinami nebo lipidy. Tato interakce vyvolává zánětlivou reakci ničící tkáň [103].

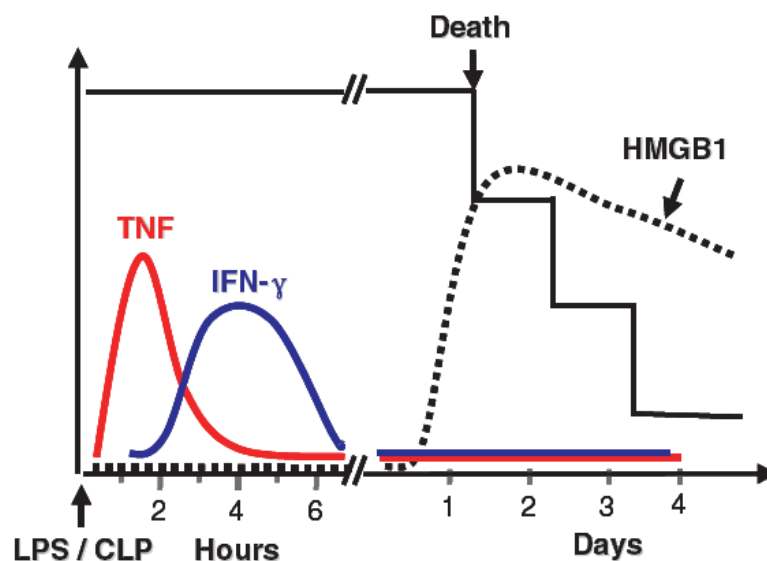


Obr. 5: Schéma interakce HMGB1/RAGE a komplexu HMGB1+lipid nebo DNA/TLR [84]

2.1.5 Kinetika uvolňování HMGB1

Při experimentech *in vitro* vykazoval protein HMGB1 zpožděné uvolňování z makrofágů oproti TNF- α a IL-1 β , které jsou secernovány během několika minut po stimulaci. HMGB1 byl detekovatelný až 8 hodin po stimulaci primárně peritoneálních myších makrofágů nebo lidských monocytů z periferní krve.

In vivo studie sledující kinetiku sérové hladiny HMGB1 pomocí myšího modelu peritonitidy (ligace slepého střeva a jeho následná perforace) nebo endotoxémie (aplikace endotoxinu) opět zjistili, že protein HMGB1 je uvolňován mnohem později než TNF- α a INF- γ . HMGB1 byl v séru prokazatelný od 8 hodin po aplikaci endotoxinu – LPS (LD₅₀), dále jeho hladina stoupala až do fáze plató (16-32 hodin po stimulaci). HMGB1 byl tedy označen jako pozdní mediátor endotoxinové letality. Vzestup sérové hladiny HMGB1 je souběžný s počátkem úhynu pokusných zvířat [109].

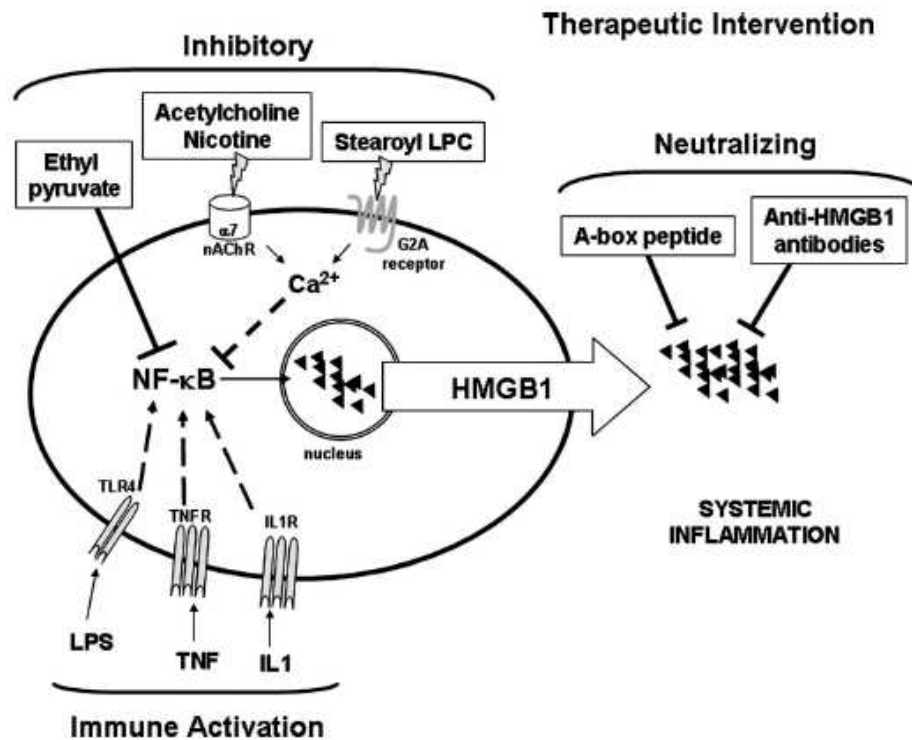


Obr. 6: Kinetika časných a pozdních mediátorů letálního systémového zánětu [110]

V klinických studiích byli pozorováni pacienti se sepsí a orgánovou dysfunkcí způsobenou sepsí (hypotenze, laktátová acidóza, diseminovaná intravaskulární koagulace, hypoxémie nebo pokles močení). Hladina HMGB1 v jejich sérech byla značně zvýšená oproti kontrolní skupině. U pacientů, kteří následně onemocněli, byly hladiny nejvyšší. Navíc hladina HMGB1 koreluje s mírou orgánové dysfunkce [36;109]. Dále byly zvýšené hladiny HMGB1 pozorovány během hemoragického šoku [71] a revmatoidní artritidy [101].

2.1.6 Inhibice HMGB1

Farmakologická inhibice HMGB1 je možná na dvou úrovních – sekrece HMGB1 a jeho cytokinové působení. Sekreci HMGB1 i jiných mediátorů zánětu inhibuje ethyl pyruvát, který působí na signální cestu NF- κ B a snižuje tak hladinu cirkulujícího HMGB1 [39]. Další inhibitory jsou agonisté α 7-nikotinového acetylcholinového receptoru (acetylcholin, nikotin) [110] a stearyl lysofosfatidylcholin [19]. Neutralizační strategie využívá protilátky anti-HMGB1 nebo kompetitivního antagonistu HMGB1 - A box. Tyto inhibitory blokují schopnost HMGB1 vázat se na povrchové receptory a ruší jeho cytokinovou aktivitu [59;109].



Obr. 7: Schematické znázornění experimentálních metod terapie využívajících inhibici HMGB1 [62]

Aplikace inhibitorů může zabránit rozvoji sepse, mnohočetného orgánového selhání a úhynu pokusných zvířat na následky těchto stavů [109]. Dále několik experimentů s inhibitory HMGB1 potvrdilo, že mohou zamezit rozvoji zánětlivých onemocnění jako je například revmatoidní artritida [2;53;101].

2.2 Cytokiny

Cytokiny jsou polypeptidy, proteiny nebo glykoproteiny s regulační a informační funkcí. Jsou secernovány T-lymfocyty, makrofágy a dalšími buňkami. Působí většinou parakrinně (tzn. na okolní buňky) a autokrinně (na samotnou produkující buňku), výjimečně endokrinně (jako hormony). Jejich účinek je pleiotropní (jeden cytokin má více efektů), redundantní (více cytokinů má stejný účinek) a někdy též antagonistický (jeden cytokin inhibuje jiné). Podílejí se na regulaci imunitní odpovědi, krvetvorby, ovlivňují nervový systém a obnovu tkání. Jejich účinky jsou vzájemně složitě provázány a klasifikace do skupin není jednotná. Řadí se sem například hemopoetické růstové faktory neboli kolonie stimulující faktory (CSF), interleukiny (IL), lymfokiny, monokiny, faktor nekrotizující nádory (TNF), chemokiny a interferony (IFN) [54].

Pro nás jsou zajímavé cytokiny IL-8, IL-10 a TNF- α .

2.2.1 Interleukin-8

Patří mezi chemokiny. Zdrojem IL-8 jsou aktivované monocyty, dále makrofágy, eozinofily, epitelální buňky, keratinocyty, melanocyty, hepatocyty, chondrocyty a fibroblasty.

Receptor pro tento cytokin byl označen jako CD128. Hojně se vyskytuje na neutrofilech a o něco méně na T lymfocytech. Na tyto a na ostatní migrující buňky imunitního systému působí IL-8 jako chemoatraktant. Inhibuje adhezi leukocytů na endotel, takže má protizánětlivou aktivitu, a podporuje angiogenezi [47].

2.2.2 Interleukin-10

U člověka je secernován aktivovanými Th lymfocyty. Receptor pro tento cytokin (CDw210) je strukturně podobný receptoru pro interferon. IL-10 inhibuje prezentaci antigenů a syntézu prozánětlivých cytokinů (například IFN- γ , IL-2, TNF- β – cytokiny Th lymfocytů a IL-1, IL-6 a TNF- α – cytokiny makrofágů). Výsledný efekt je tedy protizánětlivý. Podporuje maturaci B buněk a produkci imunoglobulinů. Působí kostimulačně na proliferaci mastocytů a periferních lymfocytů [47].

2.2.3 Faktor nekrotizující nádory α

Je produkován mnoha buňkami: makrofágy, monocyty, neutrofilny, T lymfocyty, NK-buňkami (a to po stimulaci bakteriálním LPS), dále astrocyty, mikroglie, fibroblasty, hladkosvalovými buňkami. Jeho syntéza je indukována interferony, IL-2, GM-CSF, substancí P, imunokomplexy. Inhibitory produkce jsou mimo jiné IL-6, TGF- β , vitamin D₃, prostaglandin E₂.

Váže se na 2 receptory:

- TNFR1 (TNF receptor 1), označovaného také p55, TNFRSF1A (TNF receptor superfamily member 1A), CD120a
- TNFR2 (TNF receptor 2) neboli TNFRSF1B (TNF receptor superfamily member 1B), CD120b

Receptory pro TNF- α jsou exprimovány na všech somatických buňkách kromě erytrocytů.

Je označován jako kachektin. Má prozáněťový a antitumorový efekt, působí cytotoxicky, spouští proces apoptózy, stimuluje produkci cytokinů a adhezních proteinů a je endogenním pyrogenem. Je zodpovědný za těžké následky Gram-negativní sepsy. Dále má vliv na angiogenezi, krevní srážlivost, kostní resorpci, metabolismus lipidů [47].

2.3 Adhezivní molekuly

Jedná se o molekuly buněčného povrchu, které umožňují adhezi (přilnutí) buněk navzájem nebo k mezibuněčné hmotě. Navíc zprostředkovávají buněčnou komunikaci a mají regulační funkci. Dělí se na integriny, selektiny, adhezivní molekuly z rodiny imunoglobulinů, kadheriny a další, jako je například rodina molekul CD44.

Endoteliální adhezivní molekuly ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule-1) a VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) se řadí do skupiny imunoglobulinů. Uplatní se při extravazaci leukocytů (jejich zachycení na cévní stěně a průnik do intersticia). ICAM-1 neboli CD54 se nachází na leukocytech a endotelu a interaguje s leukocytárním antigenem LFA-1. VCAM-1 (CD106) je exprimován na povrchu endotelu a po jeho aktivaci LPS, TNF- α a IL-1 dojde ke zvýšení jejich počtu na buněčném povrchu (tj. upregulace), stejně jako ICAM-1 [63].

2.4 Metody analýzy

2.4.1 Izolace RNA

Izolace nukleových kyselin se provádí po homogenizaci tkáně a lýze buněk - rozpuštění buněčných membrán a denaturaci proteinů působením detergentu (například Triton X-100 a laurylsulfát sodný). K lyzačnímu roztoku se někdy přidává proteináza K - enzym, který zvyšuje čistotu izolovaných nukleových kyselin štěpením bílkovin včetně histonů. Dále se do lyzačních pufrů přidává dithiothreitol nebo 2-merkaptoethanol, které redukují disulfidové můstky a inhibují aktivitu RNáz [94].

Nejdříve byla vyvinuta technika fenol-chloroformová extrakce, kterou v roce 1987 popsali Chomczynski a Sacchi [20]. K lyzovaným buňkám se přidá chloroform a centrifugací se separují vrstvy. Při použití RNA Blue (nebo dalších komerčních reagensů využívajících principu fenol-chloroformové extrakce), který je vhodný právě pro izolaci RNA z tkání, se po centrifugaci objeví tři vrstvy:

- vodní fáze – obsahuje RNA
- interfáze – obsahuje DNA
- organická fáze – obsahuje proteiny

RNA zůstává ve vodné fázi, zatímco DNA je za daných podmínek ve vodě nerozpustná a zůstává v interfázi. Do směsi se přidávají také inhibitory RNáz, které chrání RNA před degradací. Tyto enzymy jsou všudypřítomné, protože jsou značně odolné vůči teplotě, detergentům a nevyžadují pro svou aktivitu žádné kofaktory. Musí se proto používat rukavice, materiály a chemikálie zbavené RNáz [7].

RNA je z vodní fáze izolována pomocí isopropanolu, přičemž RNA precipituje a po centrifugaci se na dně zkumavky objeví peleta. Bílé zbarvení dávají peletě soli, které také obsahuje. Ty se odmyjí 75% ethanolem a po odstranění supernatantu se peleta rozpustí v PCR vodě.

Další způsob izolace využívá schopnost adheze nukleových kyselin na silikátový povrch (například membránu) v přítomnosti chaotropních solí, což jsou látky rušící vodíkové můstky s molekulami vody. Samy totiž tyto můstky s molekulami vody vytvářejí, je to například močovina, guanidinydrochlorid nebo jodid sodný [52]. Po adsorpci nukleových kyselin ostatní látky zůstávají v roztoku, který se odstraní (včetně chaotropních solí), kolonka se promyje a pomocí vhodného pufru bez chaotropních solí se z kolonky nukleové kyseliny eluují [94].

Takto získaná RNA obsahuje všechny její typy a kontaminující DNA se dá odstranit DNázou. Pokud potřebujeme stanovit genovou transkripci, potřebujeme pouze mRNA. Samotná mRNA se dá izolovat pomocí paramagnetických částic, které mají na svém povrchu ukotveny polythymidinové řetězce. Všechny molekuly mRNA mají na svém 3'-konci polyadenylovou sekvenci obsahující pouze adeninové nukleotidy, které na základě komplementarity bazí hybridizují s řetězcí na magnetických partikulích [44]. Tyto řetězce mohou být ukotveny i na jiné povrchy [40;60].

Kvalita izolované RNA se kontroluje elektroforeticky v agarózovém gelu s přídavkem ethidium bromidu. Na gel se nanese i kontrolní žebříček (ladder). A gel se potom fotí podsvícený UV transluminátorem [57;60].

Měření koncentrace a čistoty se provádí spektrofotometricky. Koncentrace RNA se stanoví z měření absorbance při 260 nm a od hodnoty odečteme absorbanci pozadí (při 320 nm). Čistota se určí z poměru absorbance při 260 nm a při 280 nm (A_{260}/A_{280}). Očekávaný poměr je pro RNA 2,0. Pokud je menší než 1,75, je vhodná reprecipitace [82]. Umožňuje nám to odhadnout, jak moc je vzorek kontaminován proteiny nebo fenolem [57;60].

2.4.2 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je přepis sekvence RNA do sekvence cDNA (complementary DNA). Slouží k tomu enzym reverzní transkriptáza (RNA dependentní DNA polymeráza), z nichž se komerčně nejvíce využívají tyto:

- MMLV – pochází z myšího leukemického viru Moloney (s nebo bez aktivity RNázy H, která štěpí RNA v hybridu RNA/DNA)
- AMV – izolována z viru ptačí myeloblastózy.

Reverzní transkriptáza potřebuje pro zahájení polymerace primery. Používají se náhodné n-mery (např. hexamery), oligo(dT) nebo specifické primery [40;60].

2.4.3 Real-time PCR

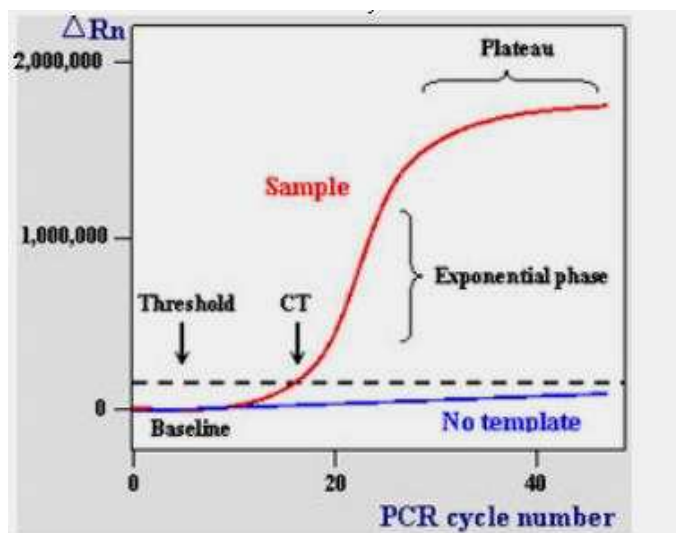
Tato metoda je postavena na základech polymerázové řetězové reakce (PCR), která je známá už od roku 1983 [68]. Jedná se o cyklickou reakci sloužící k amplifikaci daného úseku molekuly DNA. V každém cyklu se teoreticky počet molekul zdvojnásobí.

Vše probíhá v mikrozkušavce, která obsahuje vzorek DNA (templát), pufovací roztok s DNA polymerázou (například Taq DNA polymeráza), oligonukleotidové primery, které ohraničují amplifikovaný úsek, čtyři druhy nukleotidů (dNTP) a MgCl₂, který působí jako kofaktor enzymu [25].

Každá PCR začíná denaturací, při níž se vlivem teploty (95 °C) dvouvláknová DNA rozdělí na jednovláknové templáty. Potom následuje annealing (připojení primerů ke komplementárním sekvencím templátové DNA při teplotě 50-60 °C). Po nasednutí primerů může DNA polymeráza z nukleotidů v roztoku syntetizovat nové vlákno, komplementární k templátovému, a to prodlužováním primerů ve směru 5' → 3'. Teplotní optimum Taq polymerázy je 72 °C [70].

U klasické end-point PCR je amplifikovaný produkt (amplikon) detekován po skončení reakce (elektroforeticky), výstupem je tedy fotografie gelu s pásy amplikonu a standardů pro určení velikosti PCR produktu. Real-time PCR umožňuje měření množství amplikonu již v průběhu reakce, tzn. v reálném čase (real time).

V průběhu amplifikace získáváme záznam fluorescence v každém cyklu, což je umožněno využíváním fluorescenčních barviv. Závislost růstu fluorescenčního signálu na počtu reakčních cyklů zobrazuje amplifikační křivka. Osa y zobrazuje úroveň fluorescence a osa x počet cyklů. Křivka má esovitě zahnutý tvar a jednotlivé fáze jsou vyznačeny na obrázku č. 8. První fáze se nazývá skrytá neboli „background“. Produktu je zatím tak málo, že fluorescenční signál není měřitelný. V exponenciální fázi množství amplifikátu roste (exponenciálně). V této chvíli se získávají data, obvykle v podobě hodnoty C_T, která vyjadřuje počet cyklů, kdy fluorescence dosáhne prahové hodnoty. Po exponenciální fázi následuje „plató“, ve které je fluorescenční signál konstantní, protože se už množství amplifikátu nemění. Platí, že čím dříve křivka překročí fluorescenční práh, tím více bylo templátových molekul ve vzorku [25;60].



Obr. 8: Amplifikační křivka [6]

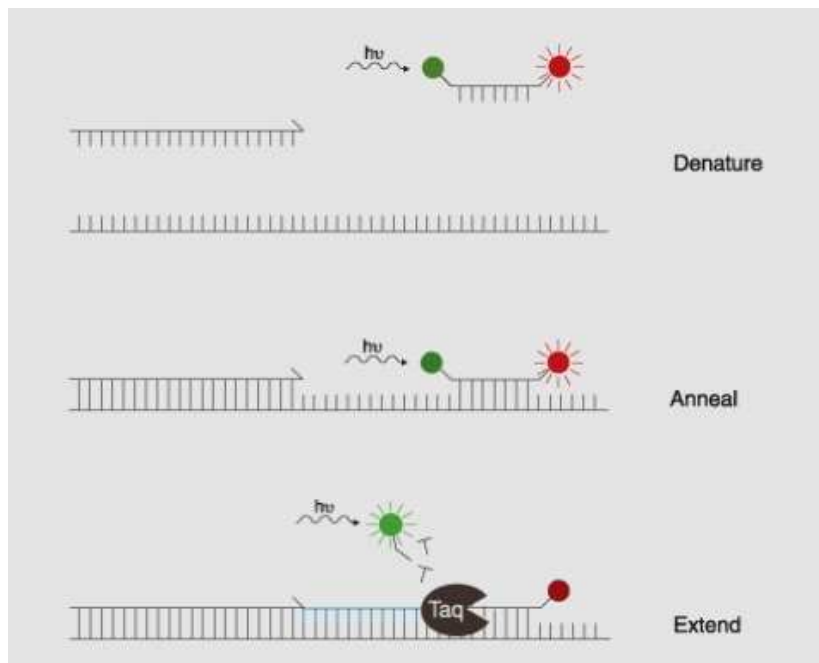
Existují dvě kvantifikační strategie. Při absolutní kvantifikaci je stanovován přesný počet kopií templátu ve vzorku. U relativního stanovení se sledují změny množství templátu mezi vzorky vzhledem k interní kontrole, tzv. referenční gen (často nazýván jako housekeeping gen, ale tento název není doporučován a upouští se od něj). K tomu se využívají různé geny jako např. β -aktin, β -2-mikroglobulin, GAPDH (Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza), cyklofilin A, HPRT (hypoxantin fosforibosyl transferáza) a další. Mají podobnou hladinu exprese v testovaných vzorcích bez vztahu k buněčnému cyklu nebo aktivaci buněk. Protože DNA můžeme pomocí této metody stanovit kvalitativně i kvantitativně (počet kopií DNA), je real-time PCR označována také jako kvantitativní PCR (qPCR) [102].

Metoda je velmi citlivá a specifická, zejména při použití sond. Využívá se ke kvantifikaci genové exprese, genotypizaci a detekci a kvantifikaci mikroorganismů [25].

Kvantifikaci umožňují fluorescenční látky nespecificky se vážající na DNA nebo sekvenčně specifické primery či sondy. Nespecifická fluorescenční barviva jsou interkalační látky jako například SYBR Green I a ethidium bromid. Při vazbě na dvoušroubovici DNA vykazují mnohonásobně vyšší fluorescenci než nevázané molekuly barviva [60]. Fluorescence je nejvyšší na konci každé exponenciální fáze a v následující denaturační fázi je minimální. Během reakce mohou vznikat nespecifické produkty a nebo produkty vzniklé reakcí samotných primerů (dimery) [25].

Jako specifické fluorescenční sondy se v dnešní době nejčastěji používají hydrolyzační sondy TaqMan (obr. 9). Jsou to krátké oligonukleotidy značené fluoroforem (reportér) a na druhém konci stejné sondy je navázán zhášec (quencher).

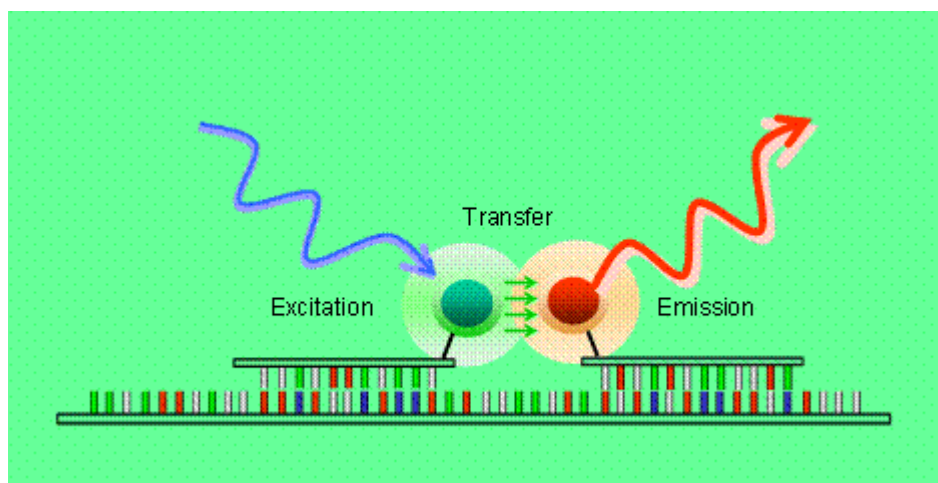
V intaktní formě je reportér v blízkosti zhášedce, který fluorescenci „absorbuje“ a není tak měřitelná. Exonukleázovou aktivitou polymerázy je ale sonda štěpena, reportér se dostane do dostatečné vzdálenosti od zhášedce a dochází k nárůstu fluorescence, která je měřena na konci elongace. Řadí se sem také molekulární majáky a škorpióny [25].



Obr. 9: Hydrolyzační sondy [9]

Nově se objevují modifikace, jako jsou LNA (locked nucleic acid) sondy, které navíc obsahují methylenový můstek omezující flexibilitu ribofuranózového kruhu. Struktura kruhu je rigidní a díky tomu je hybridizace specifitější a stabilnější. LNA sondy mohou být podstatně kratší než konvenční sondy. Toho se využívá při detekci problémových oblastí, které jsou například bohaté na G-C nebo A-T a musí být voleny delší sondy [78].

Dalším typem specifických sond jsou hybridizační sondy (FRET sondy). Je využíváno rezonančního přenosu energie (Fluorescence Resonance Energy Transfer) prostřednictvím interakcí mezi dvěma různými chromofory (donor a akceptor), které jsou vázány na dvou samostatných řetězcích. Ty jsou navrženy tak, že hybridizují blízko vedle sebe, aby byly donor a akceptor v kontaktu. Pokud sondy správně nasednou, přenáší se energie absorbovaná donorem na akceptor a akceptor emituje fluorescenci. Pokud jedna ze sond nasedne nebo je odbourána při elongaci aktivitou polymerázy, FRET se neuskuteční, akceptor „zhasne“ a fluorescenci emituje donor [60;78].

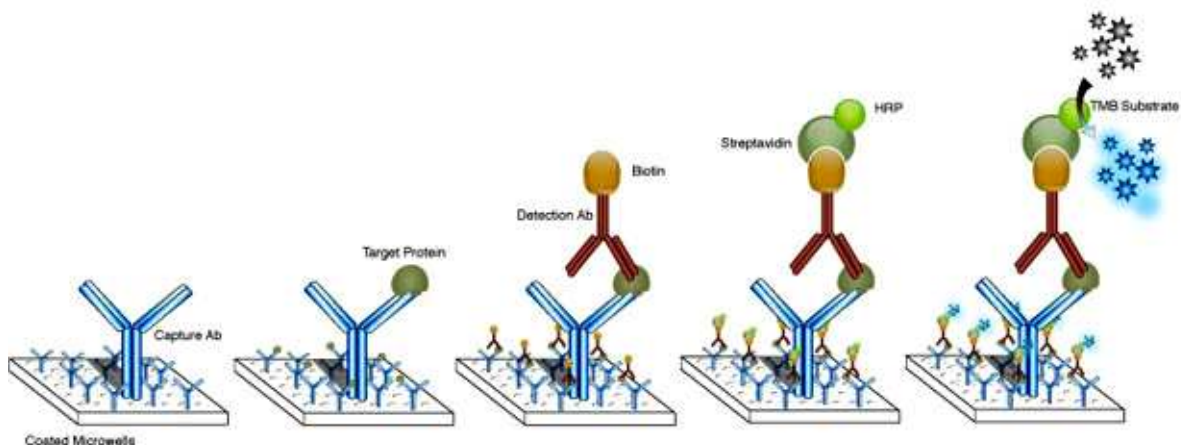


Obr. 10: Hybridizační sondy FRET [5]

2.4.4 ELISA

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) je imunoenzymatická metoda založená na interakci antigenu a protilátky za předpokladu vazby jednoho z imunoreaktantů na pevný povrch (např. stěna zkumavky, mikrotitrační destičky nebo povrch kuličky). Slouží ke kvantitativnímu a kvalitativnímu stanovení protilátek nebo antigenů. Metoda má mnoho modifikací. Protilátky se nejčastěji značí kovalentní vazbou s enzymem, který katalyzuje přeměnu chromogenního substrátu na barevný produkt. Dále mohou být použity protilátky značené fluorescenčně nebo kovem [28;34].

V použitých kitech jsou protilátky biotinylovány. Biotin ireverzibilně váže streptavidin, který je kovalentně vázán s křenovou peroxidázou (horse-radish peroxidase - HRP). Ta přeměňuje 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin (TMB) na modrý produkt. Reakce je zastavena pomocí kyseliny sírové, přičemž dojde ke vzniku žlutého produktu. Intenzita zbarvení je měřena spektrofotometricky a je úměrná koncentraci stanovovaného antigenu nebo protilátky.



Obr. 11: Sendvičová (Capture) ELISA [4]

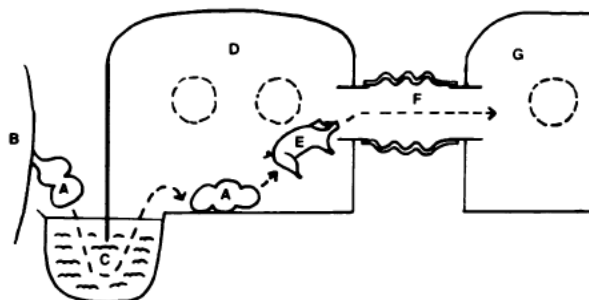
2.5 Miniaturní prase jako model v infekční imunologii

Předností prasete jako modelu je epiteliochoriální typ placenty, který brání přestupu imunoglobulinů z mateřského krevního oběhu do fetálního a tím i pasivní imunizaci [99]. Novorozené sele má při narození velmi nízký obsah plasmatických bílkovin, kde imunoglobulinová frakce je zastoupena pouze tzv. přirozenými protilátkami [81;105]. Při porodu v prostředí hospodářské stáje musí co nejdříve získat ochranné imunoglobuliny z mateřského kolostra, aby přežilo konvenční podmínky, kdy je sele náhle osídleno různými mikrobiálními druhy (kmeny), z nichž některé mohou být oportunně patogenní. V kolostru převažují imunoglobuliny třídy G, jejichž působení je systémové, zatímco v dalších dnech převládají v mateřském mléku imunoglobuliny třídy A. Jejich hlavním místem působení jsou slizniční povrchy. V období po porodu dochází spolu se změnou imunoglobulinového složení kolostra a mléka ke změně schopnosti prostupu imunoglobulinů; udává se, že cca 36 hodin po porodu se střevní bariéra pro vstup intaktních molekul IgG uzavírá [79]. Selata získaná chirurgicky a odchovaná v mikrobiologicky kontrolovaném prostředí mohou sloužit jako vhodný model studia interakcí mikroorganismů s jejich hostitelem nebo různých mikroorganismů navzájem [92].

S ohledem na prase jako laboratorní model jsou s výhodou využívána laboratorní miniprasata a tato nacházejí stále více příznivců v řadách výzkumníků. Vedle tradičního modelu miniaturního prasete v používaných v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Novém Hrádku a Ústavu živočišné fyziologie a genetiky v Liběchově také další pracovní skupiny využívají prasete jako experimentální model např.

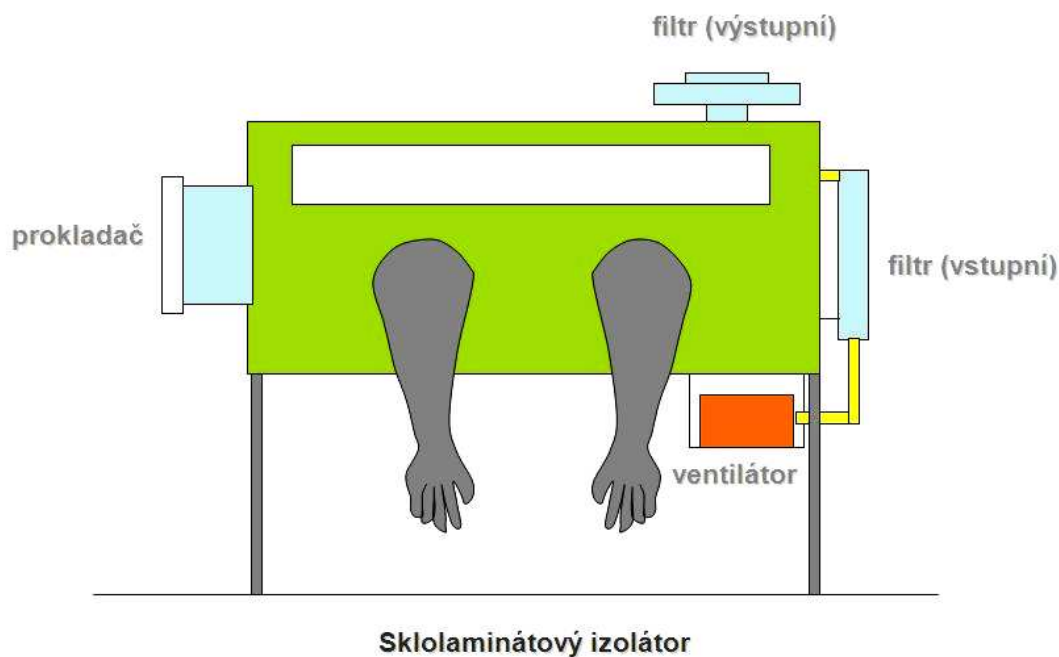
Dr. Oliverius , IKEM – transplantace tenkého střeva; Dr. Kieslichová, IKEM – septický šok; Doc. Holáň, Ústav molekulární genetiky AV ČR – transplantace rohovky; Doc. Trč, 2. LF UK a FN Motol - ortopedie.

Jedním z možných způsobů získání gnotobiotických selat je hysterektomie (obr. 12).



Obr. 12: Hysterektomie. Děloha s féty (A) je vyjmuta z břišní dutiny prasnice (B). Chirurgicky odstraněná děloha se selaty je přes prokládací vanu s dezinfekcí (C) vložena do prvního oddílu (D), kde jsou selata vyjmuta (E) z dělohy a ošetřena a přes prokládací tunel (F) jsou přenesena do chovného izolátoru (G) [65].

Pro odchov selat v mikrobiologicky definovaných a řízených podmínkách na pracovišti MBÚ AV ČR slouží přetlakové sklolaminátové izolátory (obr. 13).



Obr. 13: Schéma izolátoru pro odchov gnotobiotických selat

Takto odchovaná selata jsou vhodná pro studium mechanismů infekční imunity [61].

2.6 Bakterie

2.6.1 *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN)

E. coli je Gram-negativní, fakultativně anaerobní, nesporulující bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Kmen Nissle 1917 byl izolován německým lékařem Alfredem Nisslem v roce 1916 [27]. Tento kmen není patogenní, má adheziny, neprodukuje hemolysin, enterotoxiny, ani cytotoxiny, není invazivní, nejeví známky urologické patogenity a je sérum senzitivní - kvůli mutaci v genu pro polymerázu pro antigen O6 [38]. V genomu se vyskytují clustery kódujících několik faktorů prospěšných zdraví hostitele. Jsou to geny pro produkci mikrocinů, které inhibují růst ostatních enterobakterií. Lipopolysacharid (LPS) ve vnější membráně je „semirough“ chemotypu a vykazuje protizánětlivé vlastnosti, díky kterým tento kmen udržuje pacienty s ulcerativní kolitidou v remisi [55]. Komunikace mezi bakterií a střevním epitelem, která zesiluje epiteliální bariéru, je díky stimulaci produkce epiteliálních defensinů. Navíc produkty metabolismu EcN (pravděpodobně octová kyselina) podporují střevní motilitu, což by mohlo mít příznivý vliv pro pacienty s chronickou zácpou. Dál byl v klinických studiích prokázán příznivý vliv při protrahovaných průjmech [42].

Je využíván jako probiotikum, to jsou živé nepatogenní mikroorganismy, které mají příznivé účinky na mikroflóru člověka i zvířat [10]. Příčinou příznivého efektu je pravděpodobně modulace mikroflóry a následná produkce střevních cytokinů [21] a schopnost produkovat látky s antibakteriálními účinky, bakteriociny [50].

2.6.2 *Escherichia coli* O55

Patří mezi enteropatogenní *E. coli* (EPEC). Jedná se o třetí nejčastější sérovar identifikovaný při průjmových onemocněních novorozenců hlavně v rozvojových zemích [72]. U selat žijících v konvenčních podmínkách způsobuje enteritidy, u bezmikrobních selat má osazení letální následky [100]. Neprodukují toxiny, ale poškozují epiteliální buňky tenkého střeva a vznikají tzv. attaching and effacing léze s poškozenými mikrokly [104].

2.6.3 *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium

Salmonella je rod Gram-negativních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*, patří mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy. Nejčastější salmonelové infekce prasat způsobuje právě tento hostitelsky nespecifický sérovar. U konvenčních prasat probíhá infekce většinou asymptomaticky, u selat, jimž bylo odepřeno kolostrum, se projevuje jako gastroenteritida [93]. U člověka se manifestuje také tak [14]. Bakterie při infekci proniká přes střevní epitel, do lymfatických uzlin a do cirkulace [66]. Při likvidaci makrofágy (sleziny, jater a u prasat také plic) může fagocytovaná *Salmonella* uvnitř hostitelských buněk přežívat a množit se. Po rozpadu buňky se bakteriální buňky dostávají do cirkulace a způsobují septikémii [31]. Infekční dávka je u bezmikrobních selat, kterým byl navíc odepřen příjem kolostra, nižší než u konvenčních selat, jejichž mikroflóra množení salmonel omezuje [23].

3 Materiál a metody

3.1 Srovnání nukleotidových a proteinových sekvencí

Podobnost nukleotidových a proteinových sekvencí HMGB1 vybraných druhů jsme srovnávali pomocí volně dostupného programu BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a ChromasPro. verze 1,5 (Technelysium Pty Ltd). Sekvence jsme vyhledávali v databázi GeneBank.

3.2 Navržení detekčního systému pro prasečí HMGB1 s LNA sondou

K tomu jsme použili software ProbeFinder od firmy Roche Diagnostic (Manheim, SRN) volně dostupný na stránkách: www.universalprobelibrary.com.

Ostatní systémy byly na pracovišti zavedeny již dříve.

3.3 Odchov gnotobiotických selat

Selata byla získána hysterektomií u miniaturní prasnice chované v laboratoři Mikrobiologického ústavu AV ČR v Novém Hrádku ve 112. dni březosti, které bylo ve 105. dni březosti podáno 50 mg medroxyprogesteron acetátu (Depo-Promone, Pfizer Manufacturing Belgium, Puurs, Belgium), aby nedošlo k předčasnému porodu a 30 dní před hysterektomií byly prasnici injekčně aplikovány vitamíny A a D. Po hysterektomii byl selatům podán Ferridextran a vitamin K. Následně byla odchována v přetlakových sklolaminátových izolátorech a krmena sterilním mlékem (12,5 % sušiny) s minerály a vitamínovými doplňky, příjem kolostra jim byl odepřen. Možná bakteriální kontaminace selat byla kontrolována 2x týdně.

Čtyři týdenní selata jsme osadili probiotickým kmenem *E. coli* Nissle 1917, 4 selata enteropatogenním kmenem *E. coli* O55, 4 selata *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium (obojí 8×10^8 CFU na sele) a další 4 jsme krmili jen sterilním mlékem a

ponechali jsme je jako bezmikrobní kontrolní skupinu. 24 hodin po osazení bakteriemi byla selata usmrcena vykrvením srdeční punkcí v halotanové inhalační anestezii (Narkotan, Zentiva, Praha, Česká republika) a byl odebrán materiál k dalšímu zpracování.

Všechny pokusy se zvířaty byly schváleny Odbornou komisí MBÚ AVČR, v.v.i. a Rezortní komisí AVČR.

3.4 Odběr a zpracování materiálu

Během pitvy jsme asepticky odebrali orgány (játra, slezina, plíce, mezenterální lymfatické uzliny), krev, vzorky ilea a provedli výplach tenkého střeva. Orgány jsme zhomogenizovali a dále kultivovali na bakteriologických půdách v požadovaných ředěních. Odebranou krev jsme smíchali s 3,8% citrátem sodným (v poměru 9:1) a centrifugovali jsme ji při 2500 rpm po dobu 10 minut při 8 °C. K supernatantu jsme přidali inhibitory proteáz (Roche Diagnostic, Mannheim, SRN). K výplachu jsme použili část tenkého střeva dlouhou 40 cm (ileum, jejunum), propláchli ho 2 ml DPBS (PAA Laboratories, Linz, Austria) a přidali inhibitory proteáz. Výplach jsme centrifugovali 20 minut při 4000 rpm a 8 °C a přefiltrovali přes nitrocelulózový filtr s póry o velikosti 0.2 µm (Sartorius, Göttingen, SRN). Takto získaný materiál byl okamžitě zmrazen a uchován při -70 °C. Nastříhané vzorky střeva jsme uložili do RNeasy (Qiagen, Hilden, SRN), nechali 10 minut stát při laboratorní teplotě a pak je skladovali při -20 °C. Centrifugace jsme prováděli na Mikro 200R, rotor 2424A (Hettich Zentrifugen).

3.5 Mikrobiologie

3.5.1 Příprava bakteriální suspenze

Bakterie *S. Typhimurium* kmen LT2 (Max Planck Institut für Immunobiologie, Freiburg in Breisgau, SRN), *E. coli* O55 (Česká sbírka mikroorganismů, Brno) a *E. coli* Nissle 1917 (O6:K5:H1; Mutaflor, Ardeypharm GmbH, SRN) jsme před podáním kultivovali na masopeptonovém agaru (Oxoid, Basingstoke, UK) po dobu 24 hodin. Čerstvě narostlé bakterie jsme resuspendovali v PBS. Roztok byl proměřen při 550 nm a z kalibrační křivky jsme vypočítali infekční dávku. Selatům jsme podali $1 \cdot 10^8$ CFU

v 5 ml mléčné diety a jejich koncentraci jsme ověřili kultivací suspenze na Endově agaru (Oxoid, Basingstoke, UK) 24 hodin při 37 °C.

3.5.2 Mikrobiologická kontrola

Kontrolu bakteriální kontaminace jsme prováděli 2x týdně rektálními výtěry a stěry ze stěn izolátorů a následnou kultivací pro záchyt anaerobních a aerobních bakterií a plísní.

3.5.3 Záchyt mikrobů v orgánech a tělních tekutinách

Mikrobiologickou kontrolu distribuce bakterií v infikovaných zvířatech jsme prováděli aerobní i anaerobní kultivací vzorků plné krve, výplachu tenkého střeva a homogenizovaných vnitřních orgánů ve sterilizovaném fosfátu pufovaném fyziologickém roztoku o pH 7,0 (PBS).

Orgány jsme zvážili a 1 g tkáně jsme zhomogenizovali se 4 ml destilované vody ve sterilním homogenizátoru. Homogenát jsme ředili desítkovou řadou do zkumavek s 1,8 ml PBS. Do první zkumavky jsme přenesli 0,2 ml homogenátu a po promíchání pipetou jsme s novou špičkou přenesli opět 0,2 ml do další zkumavky. V případě tělních tekutin jsme při ředění postupovali stejně. Z každé koncentrace jsme odebrali 0,1 ml a rozetřeli pomocí pipety na MacConkeyho agar (Merck, Darmstadt, SRN), kultivovali jsme 24 hodin při 37 °C. Potom jsme spočítali narostlé kolonie podle vztahů:

$$\text{počet mikrobů v 1 g orgánu} = n \times 5 \times 10 \times \text{ředění}$$

$$\text{počet mikrobů v 1 ml tělních tekutin} = n \times 10 \times \text{ředění}$$

kde n je počet kolonií na Petriho misce, 5 je ředění tkáně PBS, 10 je dáno množstvím 0,1 ml.

3.6 Izolace RNA

Celkovou RNA jsme izolovali pomocí Invisorb® Spin Tissue RNA Mini Kit (Invitek, Berlín, SRN). Slouží k izolaci celkové RNA na principu membránové adsorpce, kontaminující genomová DNA je odstraněna pomocí pevných částic v Lysis solution DCT, na které se DNA naváže. Všechny kroky jsme prováděli při laboratorní

teplotě, která nesměla klesnout pod 20 °C. Centrifugace jsme prováděli na Mikro 200R, rotor 2424A (Hettich Zentrifugen).

- 1) Asi 2 x 2 mm kousek tkáně z RNAlater (Qiagen) jsme zhomogenizovali v 600 µl Lysis solution DCT, který jsme před přidáním protřepali. Následovala centrifugace 2 minuty při 14 000 rpm.
- 2) Supernatant jsme přemístili do Receiver Tube, přidali jsme 330 µl 99,8% ethanolu a promíchali pomocí pipety.
- 3) Směs jsme přenesli na kolonku RTA-Spin Filter Set a inkubovali jsme 1 minutu.
- 4) Potom jsme kolonku s obsahem nechali centrifugovat 1 minutu při 10 000 rpm a to, co protéklo, jsme vylili.
- 5) Na Spin Filter jsme nanесли 500 µl promývacího pufru Wash Buffer R1 a opět jsme nechali centrifugovat 30 s při 10 000 rpm.
- 6) To, co při centrifugaci prošlo kolonkou, jsme opět vylili a na Spin Filter jsme nanесли 700 µl pufru Wash Buffer R2. Centrifugovali jsme 30 s při 10 000 rpm.
- 7) Předchozí promývání jsme zopakovali.
- 8) Následovala centrifugace 5 minut při 14 000 rpm a Receiver Tube jsme vyhodili.
- 9) Spin Filter jsme přenesli na RNase-free Elution Tube, na Spin Filter jsme nanесли 30-60 µl elučního pufru (Elution Buffer) a inkubovali jsme 2 minuty.
- 10) Centrifugovali jsme 1 minutu při 10 000 rpm, Spin Filter jsme vyhodili a eluát s celkovou RNA jsme okamžitě uložili na led.

3.7 Stanovení koncentrace a čistoty izolované RNA

Kvantitu a kvalitu izolované RNA jsme kontrolovali spektrofotometricky. Vzorek jsme naředili 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 v poměru 1:20 (ředící faktor – 21) a změřili jsme absorbanci při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm. Koncentraci RNA jsme vypočítali podle vzorce:

$$c [\mu\text{g/ml}] = k_{40} \cdot A_{260} \cdot \text{ředící faktor}$$

kde hodnota absorbance 1 odpovídá přibližně koncentraci RNA 40 µg/ml (k_{40}).

Pro stanovení čistoty RNA jsme porovnávali poměry absorbancí při vlnových délkách: 260/280 (kontaminace bílkovinami) a 260/230 (kontaminace nízkomolekulárními látkami, například aromatické sloučeniny). Očekávané hodnoty pro

čistotu by měly být v rozmezí 1,8 - 2,0. Poměr absorbancí 260/280 menší než 1.75 svědčí pro kontaminaci a je nutná reprecipitace vzorku.

3.8 Syntéza cDNA

Reverzní transkripci jsme provedli pomocí QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) v termocykleru iQ5 cyclor (Bio-Rad, Hercules, USA). Centrifugace jsme prováděli na Mikro 200R, rotor 2424A (Hettich Zentrifugen). Použitá reverzní transkriptáza má velkou afinitu k RNA a je schopná syntetizovat cDNA z 10-1000 pg RNA.

- 1) Do tenkostěnné zkumavky jsme napipetovali tyto reagenty: 2 μ l gDNA Wipeout Buffer, 2 μ l PCR H₂O, 10 μ l RNA templátu.
- 2) Obsah jsme jemně zamíchali a krátce jsme nechali centrifugovat.
- 3) Nachali jsme inkubovat v termocykleru 2 minuty při 42 °C.
- 4) Zkumavku jsme umístili na led a přidali jsme další reagenty: 1 μ l Quantiscript RT, 4 μ l Quantiscript RT Buffer, 1 μ l RT Primer Mix.
- 5) Směs jsme po promíchání a centrifugaci nechali inkubovat 20 minut při 42 °C.
- 6) Inaktivaci reverzní transkriptázy jsme provedli při 95 °C po dobu 3 minut.
- 7) Následně jsme směs inkubovali 5 minut při 4 °C.
- 8) Přidali jsme 180 μ l PCR H₂O.

Takto připravenou cDNA jsme použili jako templát k real-time PCR.

3.9 Real-time PCR

Primery (Invitrogen, Carlsbad, USA) dodané v lyofilizovaném stavu (50 nM) jsme podle pokynů výrobce rekonstituovali na 100 μ M koncentraci přidáním odpovídajícího množství vody pro PCR (Invitrogen). Dále jsme použili master mix FastStart TaqMan® Probe Master (Roche, Mannheim, SRN), vodu pro PCR a odpovídající LNA sondy (Roche). Reagenty jsme ředili podle následující tabulky:

Reakční směs pro PCR		
Reagencie	Objem [μ l]	Výsledná koncentrace
FastStart Universal Probe Master 2x	10,0	1
PCR H ₂ O	7,4	
LNA sonda (25 μ M)	0,2	250 nM
Left primer (20 μ M)	0,2	200 nM
Right primer (20 μ M)	0,2	200 nM
cDNA	2,0	
Celkový objem reakční směsi	20,0	

Tab. 1: Tabulka s reagensiiemi pro real-time PCR

Reakční směs jsme rozpipetovali po 20 μ l do 200 μ l zkumavek 96-jamkové destičky, přelepili jsme fólií, mírně centrifugovali, protřepali, opět mírně centrifugovali a uložili do termocyklu iQ5 pro real-time PCR s iQ5 Optical System Software verze 1.0 (Bio-Rad, Hercules, USA). PCR proběhla podle režimu:

1. 95 °C – 10 min. (1 x)
2. 95 °C po 15 s a 60 °C po 60 s (40 x)
3. 4 °C (∞)

Vyhodnocení PCR jsme provedli pomocí iQ5 Optical System Software (Bio-Rad), normalizaci a relativizaci v programu GenEx Pro, verze 5 (Multid, Göteborg, Švédsko) a GraphPad Prism, verze 5.0 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornie, USA).

HMGB1-9 (NM_001004034) 76 nt	5'-aggagagcatcctggcctatccattggtgatgttcaaagaaactgggagagatgtggaataacaccgctgcagat-3'
L primer pHMGB1-9	5'-aggagagcatcctggccta-3'
R primer pHMGB1-9	5'-atctgcagcgggttattcc-3'
IL8-41 (M99367) 63 nt	5'-ttcttctttatcccaactggagaaaaagcttcagccccatccttgaggacatgtgg-3'
L primer pIL8-41	5'-ttcttctttatcccaactgg-3'
R primer pIL8-41	5'-ccacatgtcctcaaggttagga-3'
IL10-8 (L20001) 60 nt	5'-tccagttttacctggaagacgtaatgccgaaggcagagatgatggggaggatcaagg-3'
L primer pIL10-8	5'-tccagttttacctggaagacg-3'
R primer pIL10-8	5'-ccttgatcctccccatca-3'
TNFα-77 (NM_214022) 71 nt	5'-tcagggattcagggatgtgtggcctggacaaccaggcactgaccaccaccaagaattggaactggggcttc-3'
L primer pTNF α -77	5'-tcagggattcagggatgtgt-3'
R primer pTNF α -77	5'-gaagccccagttccaattc-3'

TLR4-33 (AB188301) 90 nt	5'-ccatggcctttctctcctgagatctgagagctgggaccttgcgtgcagggtggtcctaaccattagttaccaatgcatggagctga-3'
L primer pTLR4-33	5'-ccatggcctttctctcctg-3'
R primer pTLR4-33	5'-tcagctccatgcattggtaa-3'
β-aktin-9 (U07786) 83 nt	5'-tccctggagaagagctacgagctgcccgacgggcaggatcaccatcggcaacgagcgtccgggtgccagaggcgctctt-3'
L primer p β -Actin-9	5'-tccctggagaagagctacga-3'
R primer p β -Actin-9	5'-aagagcgcctctggacac-3'

Tab. 2: Použité detekční systémy s LNA sondami

3.10 ELISA

3.10.1 Stanovení HMGB1

Protein HMGB1 jsme stanovovali ve vzorcích plasmy a výplachu tenkého střeva pomocí 2 kitů: ELISA Kit for Porcine HMG1 (USCN Live Science Inc. Wuhan, Čína, kat.č. E0399Po) a HMGB1 ELISA Shino-Test Corporation (IBL, Hamburg, SRN). Pro automatický odečet absorbancí jsme použili Multiskan RC ELISA reader (Thermo Labsystems, Helsinky, Finsko) a výsledky jsme vyhodnocovali pomocí softwaru Genesis (Thermo Labsystems).

Postup pro ELISA Kit for Porcine High Mobility Group Protein 1(USCN Live Science):

- 1) Do jamek mikrotitrační destičky jsme napipetovali 100 μ l standardu nebo vzorků v odpovídajícím ředění a inkubovali jsme 2 hodiny při 37 $^{\circ}$ C.
- 2) Bez promývání jsme odsáli roztok z jamek.
- 3) Přidali jsme 100 μ l detekčního reagens A a inkubovali jsme 1 hodinu při 37 $^{\circ}$ C.
- 4) Přidali jsme 400 μ l promývacího roztoku a nechali jsme stát 1-2 minuty. Roztok jsme odsáli a zbytek roztoku jsme odstranili převrácením na absorpční papír a poklepáním. Tento krok jsme opakovali 3x.
- 5) Přidali jsme 100 μ l detekčního reagens B a inkubovali jsme 30 minut při 37 $^{\circ}$ C.
- 6) Přidali jsme 400 μ l promývacího roztoku a nechali jsme stát 1-2 minuty. Roztok jsme odsáli a zbytek odstranili vyklepáním na absorpční papír. Tento krok jsme opakovali 3x.
- 7) Přidali jsme 90 μ l roztoku substrátu a přikrytou destičku jsme inkubovali ve tmě 15-25 minut při 37 $^{\circ}$ C.
- 8) Přidali jsme 50 μ l zastavovacího roztoku.
- 9) Změřili jsme absorbance při 450 a 620 nm.

Postup pro HMGB1 ELISA Shino-Test Corporation (IBL)

- 1) Do jamek pro standardy, kontroly a vzorky jsme napipetovali 80 μ l Sample Diluent.
- 2) Do jamky pro negativní kontrolu jsme napipetovali 30 μ l Sample Diluent.
- 3) Do příslušných jamek jsme napipetovali 30 μ l standardu, pozitivní kontroly a vzorku.
- 4) Obsah jsme jemně zamíchali a destičku jsme přelepili adhezivní fólií. Inkubovali jsme 20-24 hodin při 37 °C.
- 5) Jamky jsme 5x promyli promývacím roztokem a po posledním promytí jsme odstranili zbytky roztoku převrácením destičky na absorpční papír a poklepáním.
- 6) Do každé jamky jsme přidali 100 μ l roztoku POD-konjugátu a přikrytou destičku jsme inkubovali 2 hodiny při laboratorní teplotě.
- 7) Jamky jsme 5x promyli a vysušili pomocí papíru.
- 8) Přidali jsme 100 μ l roztoku substrátu a inkubovali jsme 30 minut při laboratorní teplotě.
- 9) Přidali jsme 100 μ l zastavovacího roztoku, opatrně jsme zamíchali a odsáli.
- 10) Odečetli jsme absorbance při 450 a 620 nm a absorbance negativní kontroly.

3.10.2 Stanovení cytokinů

Pro kvantifikaci cytokinů jsme použili vzorky plasmy a výplachu tenkého střeva.

Sledovali jsme hladiny cytokinů IL-8, IL-10 a TNF- α způsobem využívajícím amplifikační (systém streptavidin-biotin) sendvičovou ELISA metodu. Pro stanovení TNF- α jsme použili páry monoklonálních protilátek Swine TNF- α CytoSet™ (kat. č. CSC1753) a pro IL-10 Swine IL-10 CytoSet™ (kat. č. CSC0103) od firmy Invitrogen (Carlsbad, USA). IL-8 jsme stanovili podle vlastní metody [95]. Použili jsme 96-jamkové destičky Maxisorp pro ELISA, (NUNC, Roskilde, Dánsko) (kat. č. 442404). Protilátky a standardy pro jednotlivá měření jsou uvedeny v tabulce. Pro automatický odečet absorbance jsme použili Multiskan RC ELISA reader (Thermo Labsystems, Helsinky, Finsko) a výsledky jsme vyhodnocovali pomocí softwaru Genesis (Thermo Labsystems).

	Vazebná protilátka	Detekční protilátka	Standard
IL-8	Anti-pig IL-8 (IZ8.03)	Anti-pig IL-8 (IZ8.04)	rpIL-8
IL-10	Ms Anti-Sw IL-10 ^a	Ms Anti-Sw IL-10 Biotin ^a	Recombinant Sw IL-10 ^a
TNF-α	Anti-Swine TNF- α ^b	Anti- Swine TNF- α Biotin ^b	Recombinant Swine TNF- α ^b

Tab. 3: Vazebné a detekční protilátky a standardy pro ELISA

^a Swine TNF- α CytoSet™ (Invitrogen)

^b Swine IL-10 CytoSet™ (Invitrogen)

- 1) Do jamek jsme napipetovali 100 μ l vazebné protilátky. Inkubovali jsme 36 hodin při 4 °C a potom jsme 4x promyli WS.
- 2) Přidali jsme 100 μ l standardu nebo vzorku ředěného v DS, inkubovali jsme 18 hodin při -4 °C a 4 x promyli WS.
- 3) Nanesli jsme 100 μ l biotinylované detekční protilátky v DS, inkubovali jsme 1 hodinu při laboratorní teplotě a potom jsme promyli 4x WS.
- 4) Potom jsme napipetovali 100 μ l streptavidinu-HRP (Invitrogen) ředěného 1:5000 v DS 45 minut při RT a 4x jsme promyli WS.
- 5) Přidali jsme 100 μ l TMB-substrátu a inkubovali jsme v temnotě 10-30 min při laboratorní teplotě.
- 6) Reakci jsme zastavili přidáním 100 μ l 2 M H₂SO₄ a změřili jsme absorbanci při 450 a 620 nm.

Příprava reagensí:

Protilátky byly skladovány v 50% glycerolu při -20 °C a ředěné v 0.05 M uhličitanovém pufru pH 9.6, 0,01% thimerosalu podle následujících poměrů:

Vazebná protilátka IL-8 1/200, detekční IL-8 1/2000

Všechny protilátky pro IL-10 a TNF- α jsme ředili 1/1000.

Složení ředícího roztoku (DS): 0,1 M Tris-HCl pH 7.2-7.4, 0,15 NaCl, 0,1% odstředěné mléko (Difco), 0,05% Tween 20 (Sigma-Aldrich)

Složení promývacího roztoku (WS): 0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween 20.

3.11 Statistické vyhodnocení

Jednotlivé skupiny selat jsme srovnávali s bezmikrobními selaty jako kontrolní skupinou. Použili jsme Dunettův test. K vyhodnocení statistických rozdílů mezi skupinami jsme použili InStat, verze 3.10 (GraphPad Software, San Diego, USA).

3.12 Tvorba citací

K tvorbě citací jsme použili software Reference Manager[®] 12 od firmy Thomson Reuters, který usnadňuje práci s bibliografickými záznamy. Umožňuje vyhledávání v online bibliografických databázích či knihovnách a sestavení vlastní databáze, dále doplňování, řazení a úpravu záznamů. Software také nabízí několik předdefinovaných stylů, podle kterých se naformátují citace v textu a seznam zdrojové literatury.

Zdroje informací jsme vyhledávali v databázi PubMed a ze stažených záznamů jsme pomocí softwaru Reference Manager vytvořili vlastní databázi. Bibliografické údaje, zejména českých prací, které nejsou v databázi PubMed, jsme do vlastní databáze doplnili manuálně. Citace vložené do textu byly zformátovány podle stylu časopisu Journal of Parallel and Distributed Computing.

4 Výsledky

4.1 Srovnání nukleotidových a proteinových sekvencí HMGB1

Následující tabulky obsahují výsledky srovnání pro vybrané druhy. Podrobné srovnání nukleotidové sekvence jsme doplnili v příloze (obr. 36).

Program BLASTN 2.2.23+	Přístupové číslo	Max. score	Total score	Sekvenční shoda (%)	E-value
Prase	NM_001004034.1	4048	4048	100	0.0
Člověk	NM_002128.4	3037	3037	99	0.0
Pes	NM_001002937.1	3129	3129	98	0.0
Šimpanz	XM_509611.2	3025	3025	99	0.0
Kůň	NM_001081835.1	1844	1844	51	0.0
Skot	NM_176612.1	1807	1807	50	0.0

Tab. 4: Srovnání nukleotidových sekvencí HMGB1 (mRNA)

Program BLASTP2.2.23+	Přístupové číslo	Max. score	Total score	Sekvenční shoda (%)	E-value
Prase	NP_001004034.1	420	420	100	4e-116
Skot	NP_788785.1	418	418	100	2e-115
Člověk	NP_002119.1	416	416	100	7e-115
Šimpanz	XP_509611.1	415	415	100	2e-114
Myš	NP_034569.1	413	413	100	6e-114
Potkan	NP_001102843.1	335	335	81	2e-90
Pes	XP_543194.2	290	290	86	7e-77

Tab. 5: Srovnání proteinových sekvencí (HMGB1)

4.2 Navržení systému pro stanovení genového přepisu HMGB1

Software ProbeFinder nám umožnil navrhnout 2 detekční systémy (se sondou 9 a 48), z nichž jsme na základě posouzení efektivity zvolili systém se sondou 9 (nedokumentováno).

[gll51592116|reflnm_001004034.1|sus scrofa high-mobility group box 1 \(lungb1\), mrna](#)

Use Universal ProbeLibrary probe: #9, cat.no. 04685075001

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left Primer	19	1 - 19	59	58	aggagagcatcctggccta
Right Primer	20	57 - 76	60	50	atctgcagcgggttattcc

Amplicon (76 nt)

```
aggagagcatcctggcctatccattggtgatgttgcaaagaactgggagagatgtgga  
taacaccgctgcagat
```

[Download pack insert](#) [PDF report](#) [Text report](#) [Order probes or set](#)

Transcript overview:

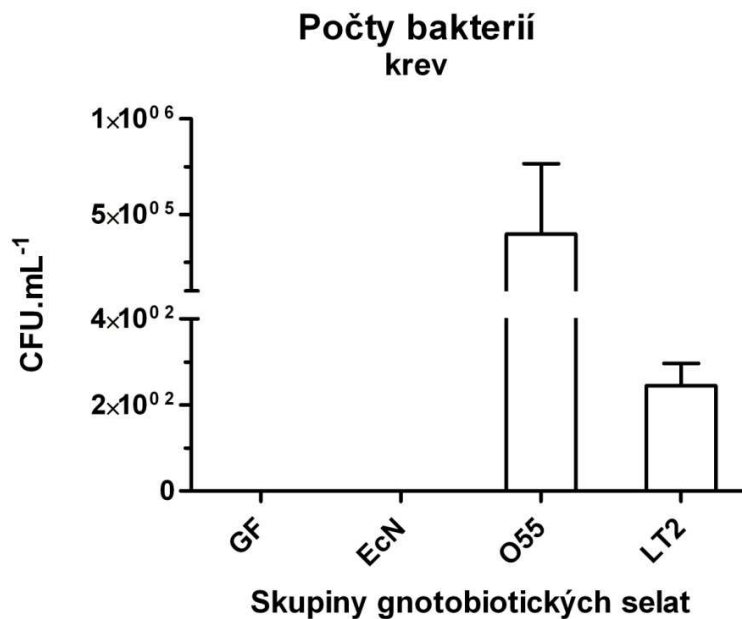
Detailed view:

```
aggagagcatcctggccta   tgggata   ccttattgtggcagctcta  
aggagagcatcctggcctatccattggtgatgttgcaaagaactgggagagatgtggaataacaccgctgcagat  
1                                                                 76
```

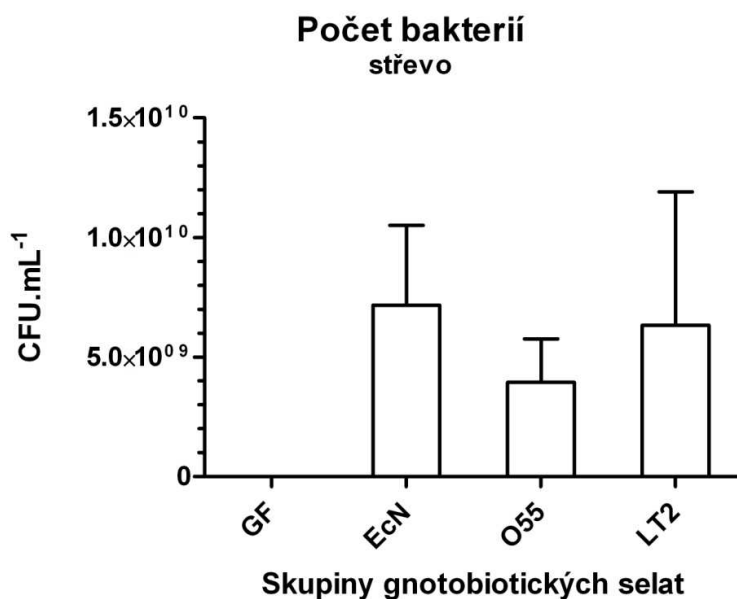
Obr. 14: Vybraný detekční systém pro stanovení genového přepisu HMGB1 se sondou 9.

4.3 Stanovení počtu bakterií v krvi a tenkém střevě

Počty CFU (kolonie tvořící jednotky) v krvi a ve výplachu tenkého střeva jsme uváděli se SEM (standard error of mean). V popisech grafů jsou jednotlivé skupiny selat označovány jako GF (bezmikrobní), *E. coli* Nissle 1917 (EcN), *E. coli* O55 (O55) a *S. Typhimurium* (LT2).



Obr. 15: Počty bakterií v krvi



Obr. 16: Počty bakterií v tenkém střevě

4.4 Měření koncentrace RNA a její čistoty

V následující tabulce jsou uvedeny výsledky měření absorbance při vlnových délkách 230, 260 a 280 nm a vypočtené hodnoty koncentrací a čistoty izolované celkové RNA z daných vzorků. Tabulka také obsahuje vypočtené hodnoty objemů roztoků pipetovaných do reakční směsi pro syntézu cDNA.

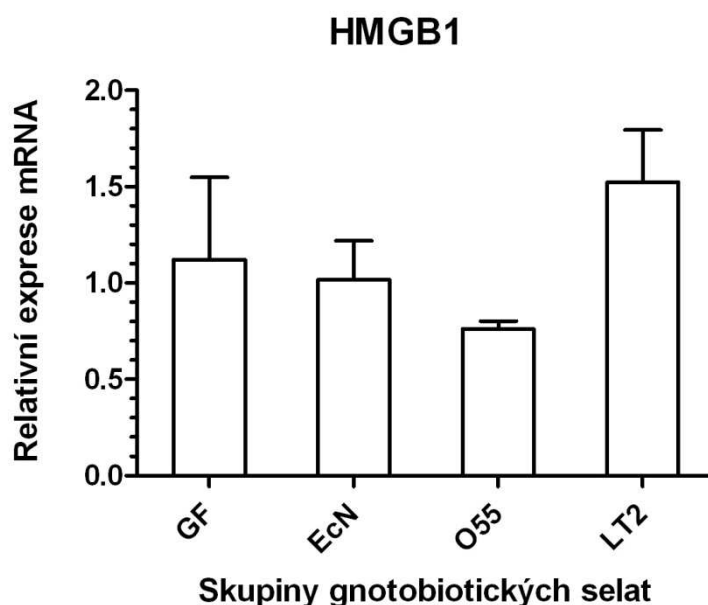
Vzorek	Syntéza cDNA		Izolace celkové RNA						
	H ₂ O	0,5 µg RNA	Konc.	Poměry		Absorbance			Ředění v 0,1 mM Tris
	[µL]	[µL]	[µg/µL]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀	A ₂₃₀	A ₂₆₀	A ₂₈₀	
1 GF	8,9	1,1	0,467	2,08	2,22	0,251	0,556	0,267	21
2 GF	0,8	9,2	0,055	1,91	1,41	0,046	0,065	0,034	21
3 GF	8,9	1,1	0,467	2,08	2,22	0,251	0,556	0,267	21
4 GF	4,9	5,1	0,097	2,04	1,87	0,062	0,116	0,057	21
1 EcN	7,6	2,4	0,207	2,06	2,17	0,114	0,247	0,120	21
2 EcN	8,5	1,5	0,344	2,05	1,47	0,279	0,410	0,200	21
3 EcN	8,3	1,7	0,292	2,01	1,99	0,175	0,348	0,173	21
4 EcN	8,6	1,4	0,350	2,00	0,58	0,725	0,417	0,209	21
1 O55	8,5	1,5	0,341	2,03	2,13	0,191	0,406	0,200	21
2 O55	6,8	3,2	0,158	2,02	0,21	0,894	0,188	0,093	21
3 O55	7,9	2,1	0,234	2,01	1,82	0,153	0,279	0,139	21
4 O55	7,7	2,3	0,217	1,95	1,24	0,208	0,258	0,132	21
1 LT2	7,0	3,0	0,165	1,95	2,12	0,093	0,197	0,101	21
2 LT2	7,0	3,0	0,168	2,08	2,44	0,082	0,200	0,096	21
3 LT2	8,4	1,6	0,312	2,08	0,70	0,534	0,372	0,179	21
4 LT2	3,4	6,6	0,076	1,96	1,70	0,053	0,090	0,046	21

Tab. 6: Hodnoty naměřených absorbancí a vypočtených koncentrací

4.5 Stanovení genového přepisu HMGB1, cytokinů a TLR4 ve střevě

Grafy zobrazují výsledky stanovení aktivace přepisu jednotlivých genů po normalizaci k β -aktinu a jejich relativizaci vzhledem k průměrné hodnotě. Hodnoty v grafu jsou vztažené k hodnotám u kontrolní skupiny - bezmikrobní selata (GF) a je vyznačená SEM. V grafech jsme vyznačili statisticky významné hodnoty (*), kde $p < 0,05$, a statisticky vysoce významné hodnoty (**) s $p < 0,01$.

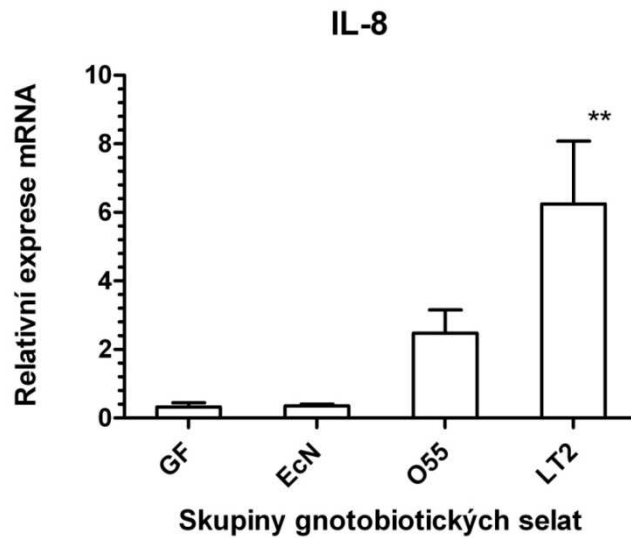
Při stanovení genového přepisu HMGB1 v ileu jsme zjistili vyšší hodnoty u selat infikovaných bakterií *S. Typhimurium*. Hodnoty exprese v ileu selat infikovaných *E. coli* O55 jsou nižší než u kontrolní skupiny bezmikrobních selat. Po osazení *E. coli* Nissle 1917 se genový přepis téměř nezměnil. Rozdíly mezi hodnotami kontrolních selat a ostatních skupin však nejsou statisticky významné.



Obr. 17: Aktivace genového přepisu HMGB1 v tenkém střevě

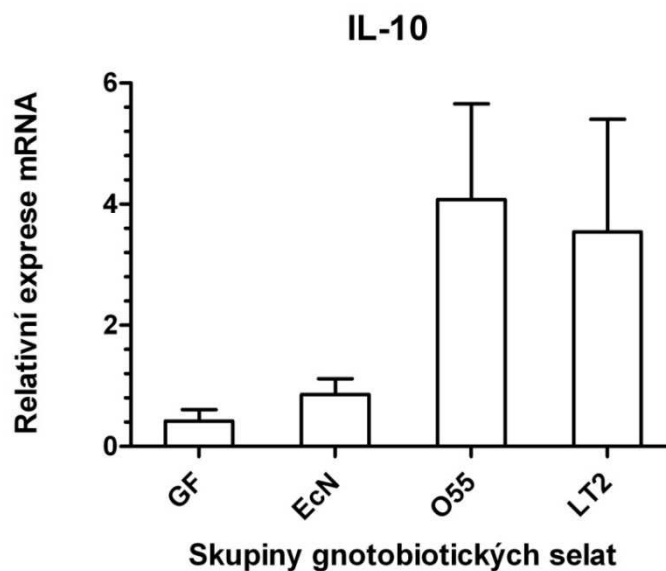
Zatímco u skupiny EcN zůstala exprese mRNA pro IL-8 na úrovni bezmikrobních selat, v případě enteropatogenních bakterií *E.coli* O55 došlo k

výraznému zvýšení exprese, které bylo v případě O55 statisticky neprůkazné, avšak u kmene LT2 salmonel se jednalo o zvýšení statisticky vysoce průkazné ($p < 0,01$).



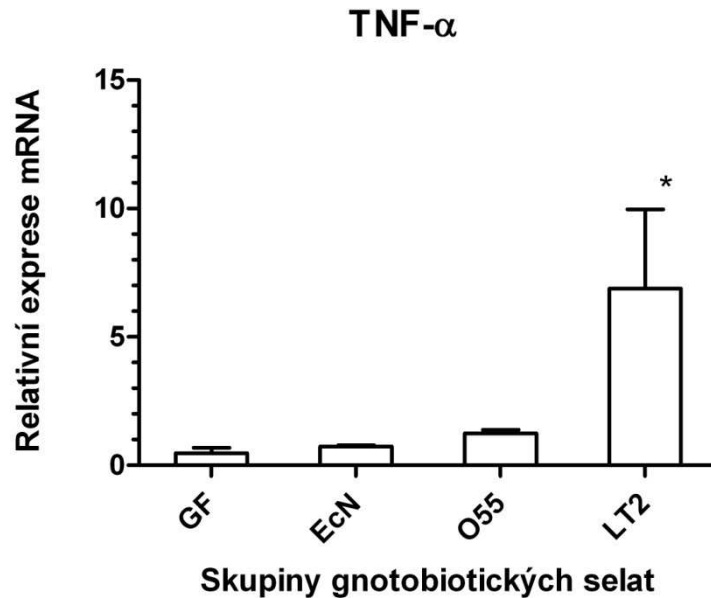
Obr. 18: Aktivace genového přepisu IL-8 v tenkém střevě

Gen pro IL-10 byl ve střevní tkáni výrazně přepisován u selat infikovaných *S. Typhimurium* LT2 a o něco výrazněji u skupiny infikované *E.coli* O55. U skupiny asociované EcN byly hodnoty vyšší vzhledem k hodnotám bezmikrobních selat. Získané výsledky však nejsou statisticky významné.



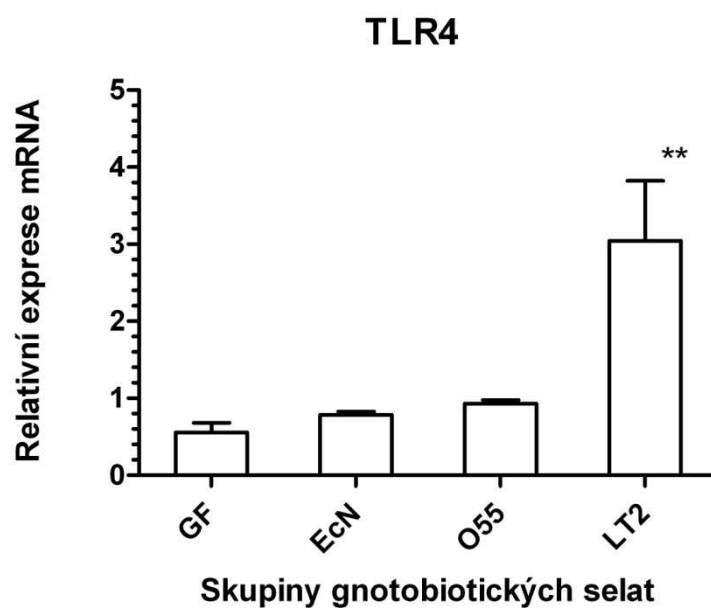
Obr. 19: Aktivace genového přepisu IL-10 v tenkém střevě

Vzhledem ke kontrolní skupině byla exprese TNF- α zvýšená u všech skupin. Statisticky průkazný ($p < 0,05$) zvýšený přepis genu pro TNF- α ve střevě jsme ale našli pouze u selat infikovaných *S. Typhimurium* LT2.



Obr. 20: Aktivace genového přepisu TNF- α v tenkém střevě

Při stanovení exprese genu Toll-like receptoru 4 jsme našli zvýšený přepis u všech osazených selat. Nejvyšší hodnoty byly nalezeny u skupiny infikované *S. Typhimurium* LT2, jedná se o statisticky vysoce průkazné rozdíly ($p < 0,01$).

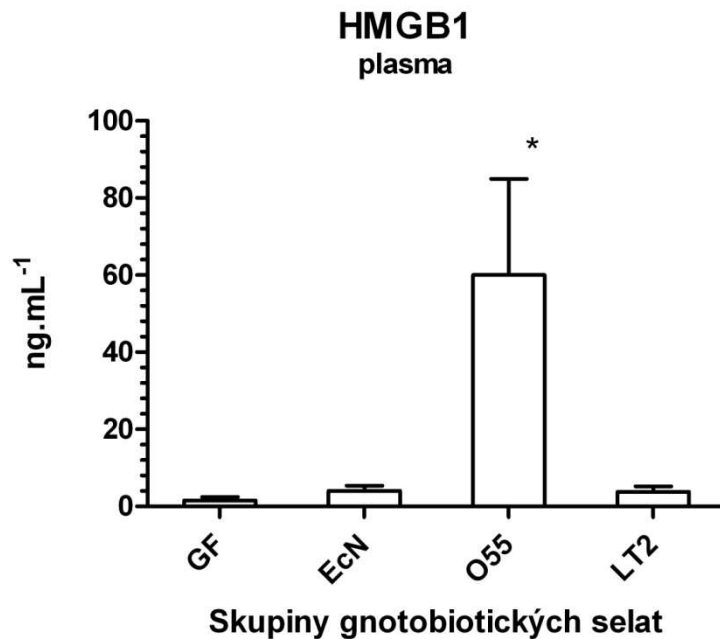


Obr. 21: Aktivace genového přepisu TLR4 v tenkém střevě

4.6 Stanovení hladiny HMGB1 a cytokinů v plasmě metodou ELISA

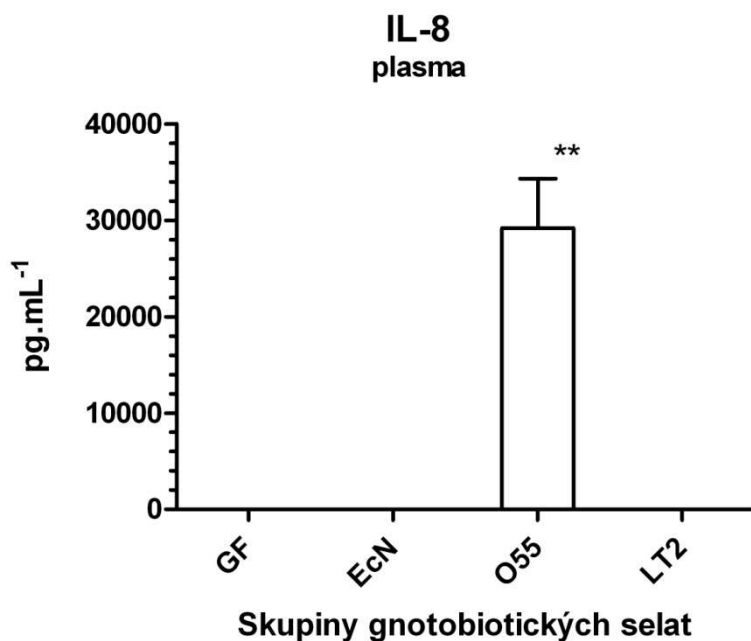
Ačkoliv jsme použili ELISA kit pro HMGB1 (USCN Live Science) podle instrukcí výrobce, nezískali jsme žádné pozitivní hodnoty a standardní křivka neodpovídala předpokládaným hodnotám. Uvádíme výsledky získané pomocí ELISA kitu od firmy IBL.

Nalezená hladina HMGB1 ve střevě selat infikovaných bakterií *E. coli* O55 je signifikantně vyšší ve srovnání s ostatními skupinami ($p < 0,05$).



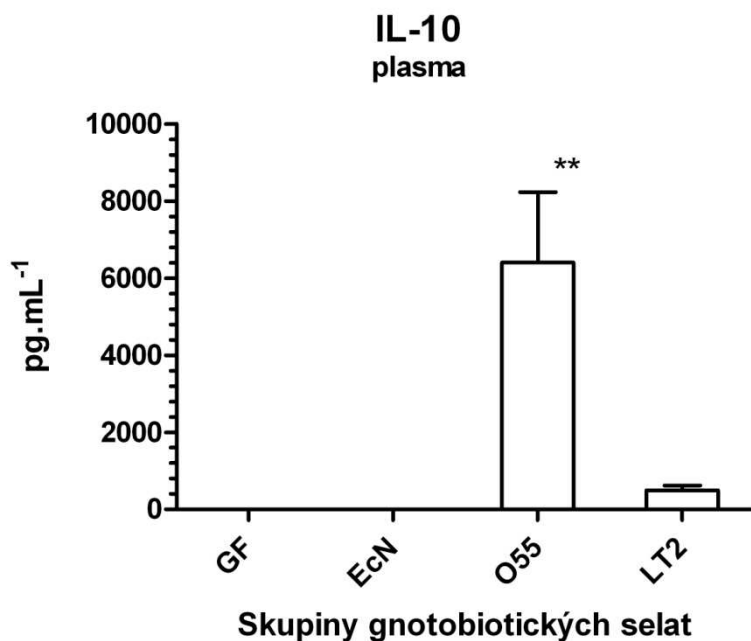
Obr. 22: Hladiny HMGB1 v plasmě

Zvýšenou hladinu IL-8 v plasmě jsme zjistili pouze u selat infikovaných *E. coli* O55. Výsledky jsou statisticky vysoce průkazné ($p < 0,01$).



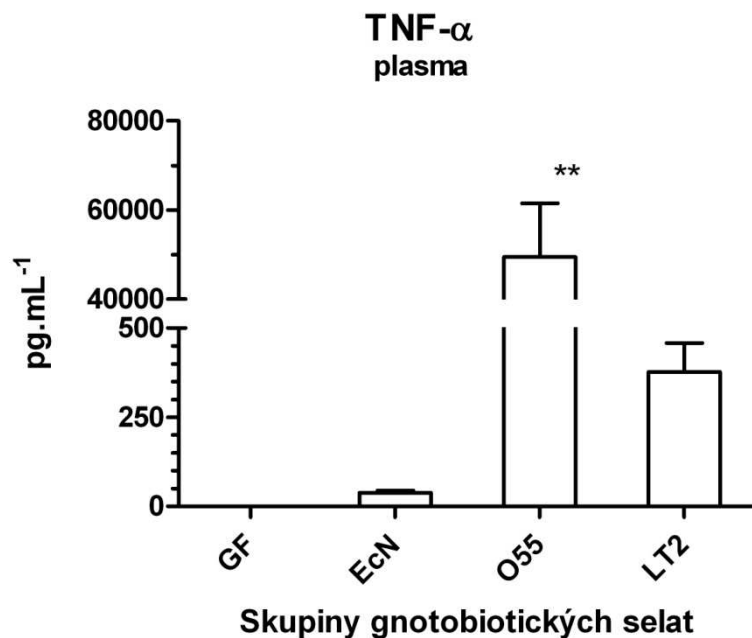
Obr. 23: Hladiny IL-8 v plasmě

Hladina IL-10 v plasmě byla se statisticky vysokou průkazností ($p < 0,01$) vyšší při infekci bakterií *E. coli* O55. Mírně byla zvýšená i při infekci *S. Typhimurium*.



Obr. 24: Hladiny IL-10 v plasmě

Nalezená zvýšená hladina TNF- α v plasmě byla u skupiny selat infikovaných *E. coli* O55 statisticky vysoce významná ($p < 0,01$). Zvýšené hladiny jsme zjistili i u skupiny infikované *S. Typhimurium* LT2, ale hodnoty nebyly statisticky průkazné.



Obr. 25: Hladiny TNF- α v plasmě

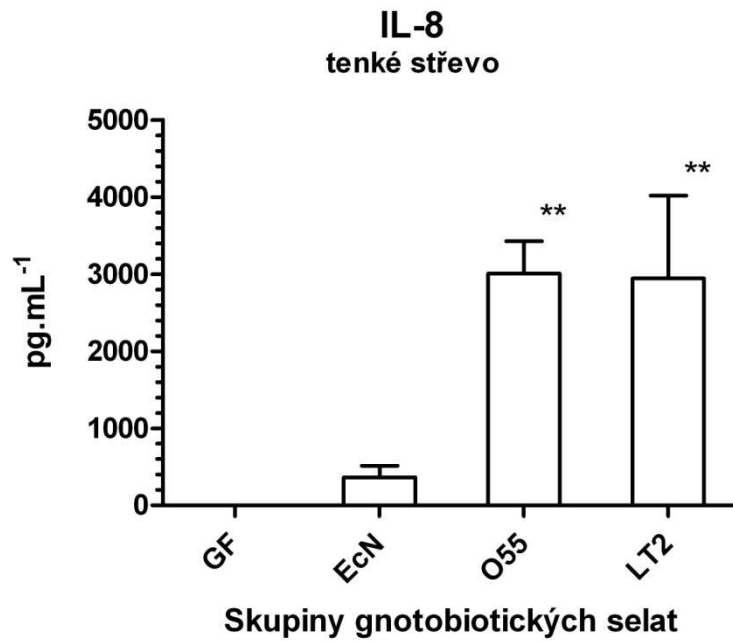
4.7 Stanovení hladiny HMGB1 a cytokinů ve střevě metodou ELISA

Nalezli jsme statisticky významně vysoké hladiny HMGB1 se střevě selat infikovaných bakteriemi *E.coli* O55 a *S. Typhimurium*, zatímco u selat bezmikrobních a asociovaných bakterií *E. coli* Nissle 1917 byly koncentrace nedetekovatelné.



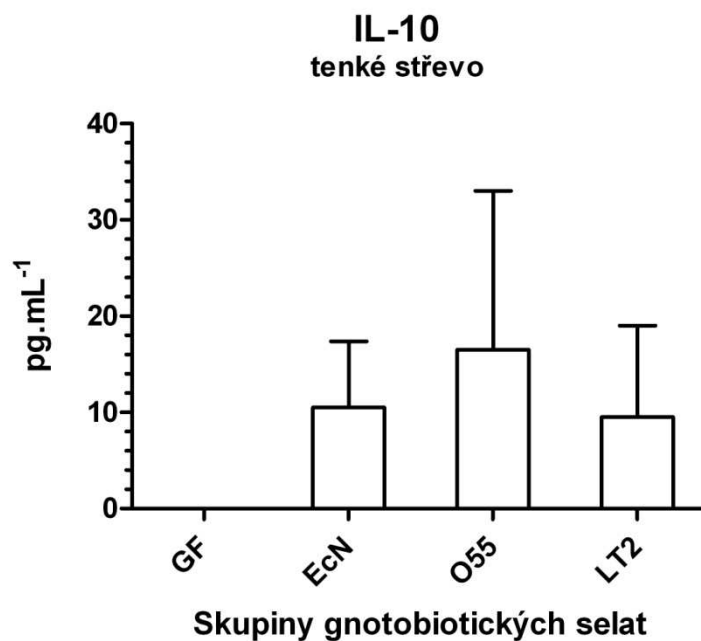
Obr. 26: Hladiny HMGB1 v tenkém střevě

Hladiny IL-8 ve střevě byly zvýšené u selat infikovaných bakteriemi *E. coli* O55 a *S. Typhimurim* LT2 s vysoce významnou statistickou výpovědní hodnotou ($p < 0,01$).



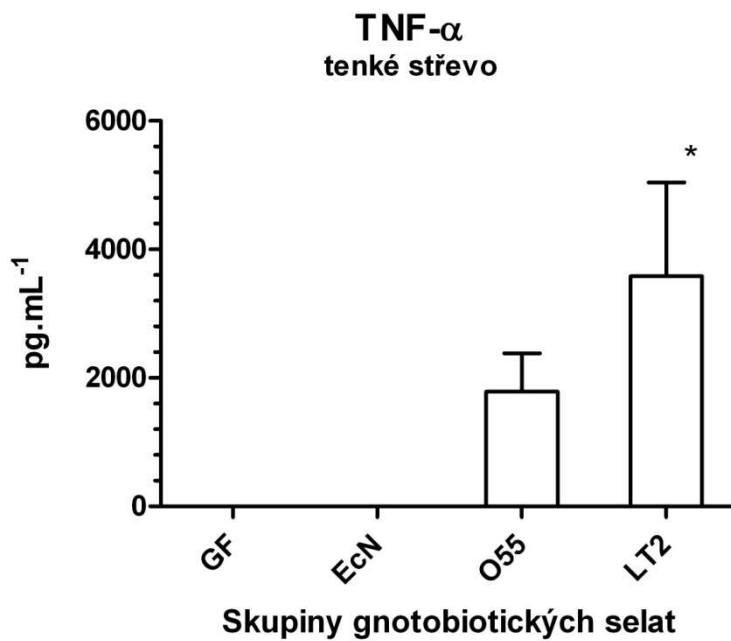
Obr. 27: Hladiny IL-8 v tenkém střevě

Hladiny IL-10 ve střevě byly zvýšené po osazení všemi vybranými bakteriálními kmeny. Nejvíce u skupiny osazené enteropatogenní O55. Hodnoty ale nejsou statisticky průkazné.



Obr. 28: Hladiny IL-10 v tenkém střevě

Hladiny TNF- α ve střevě byly zvýšené u obou virulentních bakterií – *E.coli* O55 a *S. Typhimurium* LT2. Avšak statisticky významné jsou pouze hodnoty pro infekci *Salmonellou* ($p < 0,05$).



Obr. 29: Hladiny TNF- α v tenkém střevě

5 Diskuze

High mobility group box 1 (HMGB1) je fylogeneticky velmi stará struktura. Z výsledků srovnávání sekvencí (nukleotidy a aminokyseliny) je patrné, že HMGB1 je u všech uváděných druhů evolučně vysoce konzervovaný, jak uváděla literatura [67]. To naznačuje, že je HMGB1 pro přežití velmi významný a přirozený výběr zachovává (konzervuje) jeho sekvenci a tedy i 3D strukturu, která určuje funkci proteinu. Sekvence nukleotidů vybraných živočišných druhů jsou méně sekvencně identické, než je tomu u proteinových sekvencí (tab. 4 a 5), což vyplývá z degenerovanosti genetického kódu.

HMGB1 provází zánět jako struktura spojená s poškozením buněk, která zároveň zesiluje zánětovou reakci jako „damage associated molecular pattern molekule“ (DAMP) [51]. Pro srovnání výskytu HMGB1 jako znaku buněčného poškození jsme vybrali tři cytokiny reprezentující odlišné mechanismy buněčné signalizace: chemokin interleukin 8 (IL-8), prozánětový cytokin interleukin 10 (IL-10) a faktor nekrotizující nádory (TNF- α). Pro stanovení aktivaci genového přepisu jsme použili metodu reverzní transkripce s následnou polymerázovou řetězovou reakcí v reálném čase (qRT-PCR). Pro stanovení na úrovni proteinu metodu ELISA.

Při výběru primerů máme u člověka a myši možnost využít znalosti polohy intronů, což by nám umožnilo eliminovat riziko amplifikace kontaminující genomové DNA (gDNA). Volně přístupný software firmy Roche [8] po zadání sekvence nebo jejího přístupového čísla automaticky tuto sekvenci rozlišil včetně rozlišení poloh exonů a intronů. To by nám umožnilo zvolit umístění primerů tak, aby byly komplementární k sekvencím dvou sousedních exonů. Pokud by došlo ke kontaminaci genomovou DNA a její amplifikaci, vzrostla by délka produktu nad hranici únosnou pro podmínky prováděné PCR. Prakticky je vznik takového produktu vlivem nastavených podmínek znevýhodněn.

U prasete ale tuto možnost nastavení primerů většinou nemáme, neznáme polohu intronů, a proto jsme museli věnovat větší pozornost eliminaci kontaminující gDNA při izolaci RNA. Navíc mRNA tvoří jen malý podíl z celkové RNA, což opět zvyšuje nároky na kvalitu izolované RNA. Je také nutné zabránit její degradaci všudypřítomnými RNázami. Hlavním zdrojem RNáz je samotný vzorek, takže je důležité použít lyzační pufr, který obsahuje látky inaktivující RNázy. Při manipulaci se

vzorkem se proto musí používat sterilní materiál a rukavice a dále použité reagenty a pufr musí být RNáz prosté. Zde by mohlo dojít ke kontaminaci RNázami bakterií a RNázami přítomnými na ruce a laboratorním vybavení, což by vedlo k degradaci RNA [16;24].

Eliminaci kontaminující gDNA jsme zajistili ve dvou různých krocích používající odlišné přístupy různých výrobců komerčních reagentů pro izolaci RNA a syntézu cDNA. Při izolaci RNA jsme použili metodu adsorpce DNA na částice v Lysis solution DCT (Invitex) a odstranění kontaminující gDNA navázané na částice centrifugací a při reverzní transkripci použitím pufru „gDNA Wipeout Buffer“ (Qiagen), kdy princip výrobce nepopisuje, ale je možné, že se jedná o použití DNázy. DNáza jako například v kitu pro syntézu cDNA od Thermo Fisher Scientific, který využívá princip fenol-chloroformové extrakce a Macherey-Nagel, který izoluje RNA pomocí vazby na silikátovou membránu.

Navíc jsme zařadili kontrolu v místě syntézy cDNA, kde jsme chtěli mít jistotu, že jako templát neslouží kontaminující gDNA. Místo reverzní transkriptázy jsme do jedné zkumavky přidali vodu, vše ostatní jsme provedli jako u normálních vzorků.

Pro stanovení mRNA pro IL-8, IL-10, TNF- α , TLR4 jsme použili zavedené systémy. Pro stanovení HMGB1 jsme navrhli 2 systémy, z nichž jsme vybrali systém s LNA sondou 9, který dosahoval vyšší efektivity než srovnávaný systém s LNA sondou 48. Pro všechna stanovení jsme použili jednotný cyklus amplifikace při 60 °C po dobu 1 min.

Podle našich informací výskyt HMGB1 u prasete jako markeru sepse doposud nebyl popsán, proto jsme zvolili infekci dvěma různými Gram-negativními bakteriemi – *E.coli* O55 (extracelulární patogen) a *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium (intracelulární patogen). V případě *E.coli* jsme záměrně vybrali selata infikovaná *E.coli ante finem*, abychom zvýšili pravděpodobnost nálezu HMGB1 jako markeru buněčného poškození [83]. To je možná důvod, proč předpokládaně konstitutivní exprese mRNA pro HMGB1 byla nečekaně nejnižší právě u selat infikovaných enteropatogenní *E.coli*, která byla ve velice špatném zdravotním stavu, zatímco nález HMGB1 proteinu byl vzhledem k největšímu buněčnému poškození nejvyšší u selat a to jak v plasmě, tak ve výplachu tenkého střeva. Hodnoty exprese mRNA pro kontrolní skupinu bezmikrobních selat, selat asociovaných probiotickou *E.coli* Nissle 1917 a *S.Typhimurium* byly srovnatelné, což by potvrdilo naši domněnku o konstitutivní produkci mRNA pro HMGB1. Zvýšený výskyt proteinu HMGB1 byl dále výrazně zvýšen ve střevě selat infikovaných *S.Typhimurium*, ačkoliv v plasmě byly hodnoty na úrovni kontrolní skupiny

a skupiny asociované probiotickou *E.coli*. Domníváme se, že k výraznému zvýšení hladiny HMGB1 by došlo v případě *S. Typhimurium* v pozdější době v souladu s předpokládaným multiorgánovým poškozením a zhoršením zdravotního stavu selat.

Zdá se, že od prvotního nadšení využití HMGB1 jako markeru sepse dochází k postupnému vystřízlivění. Jak uvádějí někteří autoři ve svých pracích [77], HMGB1 nevykazoval statisticky významné rozdíly mezi skupinami dětí s různými úrovněmi sepse s nebo bez detekované bakteriémie. Podobná studie se stejnými závěry byla provedena i u dospělých septických pacientů [35]. Na rozdíl od HMGB1 se prokalcitonin, CRP, IL-6, případně CD163 ukazují jako výrazně vhodnější markery a v jejich prospěch hovoří i fakt, že jsou, kromě CD163, obecně zavedeny v klinické praxi.

Jiní autoři [36] na základě stanovení plasmatických hladin HMGB1 konstatovali, že jeho plasmatické hladiny korelují s těžkostí sepse a že na základě tohoto stanovení lze podle hodnot předpokládat přežití či úmrtí (ve 3. dni více než 4 ng/ml). Opět se ale objevily jiné skupiny [49], které ukazují, že hladiny HMGB1 se statisticky významně nelišily mezi skupinami přeživších a nepřeživších pacientů.

Přesto molekula HMGB1 ve svém extracelulárním výskytu neztrácí na své přitažlivosti, protože pro svou reaktivitu s různými receptory pro molekuly přirozené imunity [108] a schopnost zesilovat zánětové podněty [90] se jeví vhodnou molekulou pro terapeutický zásah, který byl mnohokrát experimentálně ověřen na myších modelech [19;107;109;111].

IL-8 s jeho funkcí atrakce a aktivace neutrofilních leukocytů považujeme podle svých zkušeností za indikátor obranné reakce, který je pozitivním článkem mechanismů přirozené imunity, pokud nepřesáhne určitou hranici, kdy už je indikátorem patogeneze [97].

IL-10 je pokládán za protizánětový cytokin. Jeho zvýšený výskyt v plasmě u gnotobiotických selat je spojen se špatnou prognózou přežívání selat [96] a odráží i závažnost stavu u infikovaných myší [80].

Faktor nekrotizující nádory (TNF- α) je časným indikátorem sepse [48] vedoucí k multiorgánovému poškození. Extrémní hodnoty proteinu řádově v nanogramech u selat infikovaných enteropatogenní *E.coli* potvrzují orgánové poškození a špatnou prognózu přežívání selat. Zajímavé jsou výsledky v genovém přepisu, kdy je aktivace nejvyšší u selat infikovaných *Salmonellou*. Nízké hodnoty pro skupinu selat infikovaných *E.coli* O55, které jsou srovnatelné s hodnotami kontrolní skupiny mohou

souviset s rozvratem homeostázy celého organismu těsně před předpokládaným úmrtím. Když vezmeme v úvahu kinetiku TNF- α popsanou Myersem a kol. [69], je možné se domnívat, že TNF- α jako časný indikátor (vrcholící 1 hodinu po stimulaci) není v pozdějších stádiích (zde 24 hodin) přepisován u infekce vedoucí k letálním stavům jako je to v případě selat infikovaných *E.coli* O55 [48]. Výrazné hodnoty v případě *S. Typhimurium* jako intracelulárního patogena mohou být způsobeny odlišnými obrannými mechanismy, kdy významnou úlohu sehrává především buněčná imunita [32] a také výrazně lepším zdravotním stavem selat v době eutanázie selat.

Posledním znakem, který jsme sledovali, je TLR4, tj. receptor pro LPS [88]. Z důvodu nedostatku reagensů jsme stanovovali pouze aktivaci genového přepisu na úrovni mRNA. Poměrně překvapivé je pro nás to, že stimulace u *E.coli* O55 zůstala na úrovni *E.coli* Nissle 1917, přičemž obě vykazovaly jen nepatrné a neprůkazné zvýšení v porovnání se skupinou bezmikrobních selat. V případě *E.coli* O55 by to mohlo být v souvislosti s nevýraznými přepisy pro TNF- α a jen mírně zvýšenými pro IL-8 plynoucími pravděpodobně ze špatného zdravotního stavu. Naopak statisticky vysoce průkazné zvýšení transkripce TLR4 nastalo u další Gram-negativní bakterie – *S. Typhimurium*.

6 Závěr

V posledních letech se vedle klasických znaků bakteriální sepse, jako jsou CRP, ceruloplasmin, haptoglobin a další, objevují zprávy o nových markerech. Mezi jedny z nejvyužívanějších markerů posledních let patří CRP, prokalcitonin a IL-6. Snaha zpřesnit diagnostiku sepse a možného poškození organismu končícího často úmrtím vede k hledání nových diagnostických markerů. V posledních letech se objevují nové markery sepse, které jsou intenzivně studovány. Je to například TREM-1, CD163 a v neposlední řadě i HMGB1.

V diplomové práci jsme se zabývali možnostmi použití HMGB1 jako markeru sepse s nepříznivou prognózou u gnotobiotických selat, tj. selat chovaných v mikrobiologicky definovaných a řízených podmínkách. Ke srovnání možného použití HMGB1 pro prognózu nepříznivého vývoje vedoucího k úmrtí selete jsme zvolili cytokiny reprezentující odlišné mechanismy: chemokin IL-8, protizáněťový cytokin IL-10 a časný prozáněťový cytokin TNF- α , které bývají při sepsi výrazně zvýšeny.

Při sledování exprese HMGB1 na úrovni mRNA a proteinu jsme na základě našeho pozorování a literárních údajů došli k závěru, že HMGB1 je přepisován konstitutivně a zvýšené množství proteinu v krvi nebo ve střevě při infekci enterálními bakteriálními patogeny je v souladu jak s vybranými cytokiny, tak se skupinami experimentálních selat – bezmikrobní, selata osazená probiotickou bakterií a dvě skupiny infikované různými virulentními bakteriemi. HMGB1 u prasete je proto možno, stejně jako u jiných živočišných druhů a člověka, považovat za pozdní marker sepse, což zatím v literatuře nebylo popsáno.

Z hlediska možného použití v klinické praxi jako markeru sepse se však domníváme, že stanovení HMGB1 nevytěsní již zavedené markery jako jsou CRP, prokalcitonin, IL-6 apod. Extracelulární výskyt HMGB1 jako molekuly indikující poškození a schopnost vázat řadu receptorů, molekul přirozené imunity a jeho schopnost zesilovat záněťové mechanismy by však z HMGB1 mohly udělat molekulu terapeutického zásahu. To je jeden z důvodů, proč považujeme problematiku HMGB1 za velice zajímavou a budeme se jí v širších souvislostech i nadále zabývat v naší budoucí práci.

7 Seznam zkratk

AGEs - produkty pokročilé glykace (advanced glycation end products)

AMV - virus ptačí myeloblastózy (avian myeloblastosis virus)

CD - diferenční skupina (cluster of differentiation)

cDNA - komplementární deoxyribonukleová kyselina (complementary deoxyribonucleic acid)

CFU - kolonie tvořící jednotky (colony-forming units)

CSF - kolonie stimulující faktor (colony-stimulating factor)

DAMPs - danger associated molecular patterns

DNA - deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)

dNTP - deoxynukleotid trifosfát

DPBS - soli podle Dulbecca s fosfátovým pufrém (Dulbecco's phosphate buffered saline)

EcN - *Escherichia coli* Nissle 1917

ELISA - enzymová imunoabsorpční analýza (enzyme-linked immunosorbent assay)

EPEC - enteropatogenní *Escherichia coli*

ERK - extracelulárně regulovaná kináza (extracellular signal-regulated kinase)

FRET - fluorescenční rezonanční přenos energie (fluorescence resonance energy transfer)

GAPDH - glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza

gDNA - genomová DNA

GF - bezmikrobní (germ-free)

GM-CSF - kolonie stimulující faktor pro granulocyty a makrofágy

HMGB1 - high-mobility group box 1

HPRT - hypoxantin fosforibozyl transferáza

HRP – křenová peroxidáza (horse-radish peroxidase)

HSP - proteiny tepelného šoku (heat shock protein)

ICAM - intracelulární adhezní molekula (inter-cellular adhesion molecule)

IFN - interferon

IL - interleukin

JNK - Jun N-terminální kináza (Jun NH2-terminal kinase)

LFA - leukocyte function-associated antigen

LNA - „zamknuté nukleové kyseliny“ (locked nucleic acid)

LPS - lipopolysacharid

mAb - monoklonální protilátka

MCP - monocytární chemotaktický protein (monocyte chemoattractant protein)

MIP - makrofágový zánětlivý protein (macrophage inflammatory protein)

MMLV - Molonyho virus myší leukemie (Moloney murine leukemia virus)

NF-κB - nukleární faktor-κB

PAI - inhibitor aktivátoru plasminogenu (plasminogen activator inhibitor)

PAMPs - patogen associated molecular patterns

PCR - polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PRRs - receptory pro nebezpečné vzory (pattern recognition receptors)

RAG - recombination activating gene

RAGE - receptor pro produkty pokročilé glykace (receptor for advanced glycation end products)

RNA - ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)

rpm - počet otáček za minutu (revolutions per minute)

RT - reverzní transkripce

SAPK - stresem aktivované proteinkinázy (stress-activated protein kinase)

SDS-PAGE - elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis)

SEM – standard error of mean

TLR - Toll-like receptor

TMB - 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin

TNF - faktor nekrotizující nádory (tumor necrosis factor)

tPA - tkáňový aktivátor plasminogenu (tissue plasminogen activator)

TREM-1 - triggering receptor expressed on myeloid cells 1

VCAM - vaskulární cytoadhezivní molekula (vascular cell adhesion molecule)

8 Seznam použité literatury

- [1] S. Akira, S. Uematsu, O. Takeuchi, Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124 (2006) 783-801.
- [2] U. Andersson, K.J. Tracey, HMGB1 as a mediator of necrosis-induced inflammation and a therapeutic target in arthritis. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* 30 (2004) 627-37, xi.
- [3] U. Andersson, H. Wang, K. Palmblad, A.C. Aveberger, O. Bloom, H. Erlandsson-Harris, A. Janson, R. Kokkola, M. Zhang, H. Yang, K.J. Tracey, High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J.Exp.Med.* 192 (2000) 565-570.
- [4] Anonym 1. http://www.biomol.de/infos_epitomics.html?id=817&hersteller=Epitomics . 2010.
- [5] Anonym 2. <http://diagnosticsgenome.com/real-time-pcr.htm> . 2010.
- [6] Anonym 3. <http://www.rt-pcr.com/> . 2010.
- [7] Anonym 4. http://www.top-bio.cz/pdf/izolace_RNA_DNA/RNA_Blue.pdf . 2010.
- [8] Anonym 5. <http://microarrays.ucsd.edu/roche/pdf/Assay%20Design%20Guide.pdf> . 2010.
- [9] Anonym 6. http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/qpcr_technical_guide.Par.0001.File.tmp/qpcr_technical_guide.pdf . 2010.
- [10] R.D. Berg, Probiotics, prebiotics or 'conbiotics'? *Trends Microbiol.* 6 (1998) 89-92.
- [11] M.E. Bianchi, DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J.Leukoc.Biol.* 81 (2007) 1-5.

- [12] M.E. Bianchi, A.A. Manfredi, High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunol.Rev.* 220 (2007) 35-46.
- [13] T. Bonaldi, F. Talamo, P. Scaffidi, D. Ferrera, A. Porto, A. Bachi, A. Rubartelli, A. Agresti, M.E. Bianchi, Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J.* 22 (2003) 5551-5560.
- [14] V. Buchta, P. Jílek, J. Horáček, V. Horák *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*, Karolinum, Praha, 2002.
- [15] M. Bustin, Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol.Cell Biol.* 19 (1999) 5237-5246.
- [16] S.A. Bustin, T. Nolan, Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J.Biomol.Tech.* 15 (2004) 155-166.
- [17] Y. Carton, A.J. Nappi, Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics* 52 (2001) 157-164.
- [18] T. Chavakis, A. Bierhaus, N. Al-Fakhri, D. Schneider, S. Witte, T. Linn, M. Nagashima, J. Morser, B. Arnold, K.T. Preissner, P.P. Nawroth, The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J.Exp.Med.* 198 (2003) 1507-1515.
- [19] G. Chen, J. Li, X. Qiang, C.J. Czura, M. Ochani, K. Ochani, L. Ulloa, H. Yang, K.J. Tracey, P. Wang, A.E. Sama, H. Wang, Suppression of HMGB1 release by stearyl lysophosphatidylcholine: an additional mechanism for its therapeutic effects in experimental sepsis. *J.Lipid Res.* 46 (2005) 623-627.
- [20] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* 162 (1987) 156-159.
- [21] H.R. Christensen, H. Frokiaer, J.J. Pestka, Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J.Immunol.* 168 (2002) 171-178.
- [22] B. Degryse, T. Bonaldi, P. Scaffidi, S. Muller, M. Resnati, F. Sanvito, G. Arrighoni, M.E. Bianchi, The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein

HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J.Cell Biol.* 152 (2001) 1197-1206.

[23] V. Dlabac, I. Trebichavsky, Z. Rehakova, B. Hofmanova, I. Splichal, B. Cukrowska, Pathogenicity and protective effect of rough mutants of *Salmonella* species in germ-free piglets. *Infect.Immun.* 65 (1997) 5238-5243.

[24] C.M. Dozois, E. Oswald, N. Gautier, J.P. Serthelon, J.M. Fairbrother, I.P. Oswald, A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 58 (1997) 287-300.

[25] S. Dudová, R. Hájek. Využití metody real-time PCR (kvantitativní PCR, PCR v reálném čase) v hematologii a studiu mnohočetného myelomu. *Klin.Onkol.* 21[1], 220-222. 2008.

[26] I.E. Dumitriu, P. Baruah, A.A. Manfredi, M.E. Bianchi, P. Rovere-Querini, HMGB1: guiding immunity from within. *Trends Immunol.* 26 (2005) 381-387.

[27] S.C. Duncker, A. Lorentz, B. Schroeder, G. Breves, S.C. Bischoff, Effect of orally administered probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 on intestinal mucosal immune cells of healthy young pigs. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 111 (2006) 239-250.

[28] E. Engvall, P. Perlmann, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 8 (1971) 871-874.

[29] J. Fan, Y. Li, R.M. Levy, J.J. Fan, D.J. Hackam, Y. Vodovotz, H. Yang, K.J. Tracey, T.R. Billiar, M.A. Wilson, Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase activation in neutrophils: role of HMGB1-TLR4 signaling. *J.Immunol.* 178 (2007) 6573-6580.

[30] S. Ferrari, P. Finelli, M. Rocchi, M.E. Bianchi, The active gene that encodes human high mobility group 1 protein (HMG1) contains introns and maps to chromosome 13. *Genomics* 35 (1996) 367-371.

[31] P.I. Fields, R.V. Swanson, C.G. Haidaris, F. Heffron, Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83 (1986) 5189-5193.

[32] B.B. Finlay, J.H. Brumell, *Salmonella* interactions with host cells: in vitro to in vivo. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 355 (2000) 623-631.

- [33] C. Fiuza, M. Bustin, S. Talwar, M. Tropea, E. Gerstenberger, J.H. Shelhamer, A.F. Suffredini, Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 101 (2003) 2652-2660.
- [34] L. Fukal, B. Holubová *Imunochemie a imunoanalýza*, 2007.
- [35] S. Gaini, S.S. Pedersen, O.G. Koldkjaer, C. Pedersen, H.J. Moller, High mobility group box-1 protein in patients with suspected community-acquired infections and sepsis: a prospective study. *Crit Care* 11 (2007) R32.
- [36] S. Gibot, F. Massin, A. Cravoisy, D. Barraud, L. Nace, B. Levy, P.E. Bollaert, High-mobility group box 1 protein plasma concentrations during septic shock. *Intensive Care Med.* 33 (2007) 1347-1353.
- [37] G.H. Goodwin, C. Sanders, E.W. Johns, A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur.J.Biochem.* 38 (1973) 14-19.
- [38] L. Grozdanov, U. Zahringer, G. Blum-Oehler, L. Brade, A. Henne, Y.A. Knirel, U. Schombel, J. Schulze, U. Sonnenborn, G. Gottschalk, J. Hacker, E.T. Rietschel, U. Dobrindt, A single nucleotide exchange in the wzy gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J.Bacteriol.* 184 (2002) 5912-5925.
- [39] Y. Han, J.A. Englert, R. Yang, R.L. Delude, M.P. Fink, Ethyl pyruvate inhibits nuclear factor-kappaB-dependent signaling by directly targeting p65. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 312 (2005) 1097-1105.
- [40] H. Hartmannová, L. Nosková. Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. http://www.udmp.cz/elearning/sborniky_files/cytogen.pdf . 2010.
- [41] Q. He, C.H. Liang, S.J. Lippard, Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97 (2000) 5768-5772.
- [42] J. Henker, M. Laass, B.M. Blokhin, Y.K. Bolbot, V.G. Maydannik, M. Elze, C. Wolff, J. Schulze, The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) stops acute diarrhoea in infants and toddlers. *Eur.J.Pediatr.* 166 (2007) 311-318.

[43] O. Hori, J. Brett, T. Slattery, R. Cao, J. Zhang, J.X. Chen, M. Nagashima, E.R. Lundh, S. Vijay, D. Nitecki, ., The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system. *J.Biol.Chem.* 270 (1995) 25752-25761.

[44] D. Húska, J. Baloun, L. Trnková, V. Adam, R. Kizek. Využití paramagnetických částic pro izolaci mRNA. *CHEMmagazín* 18[3], 14-15. 2008.

[45] H.J. Huttunen, C. Fages, J. Kuja-Panula, A.J. Ridley, H. Rauvala, Receptor for advanced glycation end products-binding COOH-terminal motif of amphotericin inhibits invasive migration and metastasis. *Cancer Res.* 62 (2002) 4805-4811.

[46] H.J. Huttunen, C. Fages, H. Rauvala, Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF- κ B require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J.Biol.Chem.* 274 (1999) 19919-19924.

[47] H. Ibelgauft. Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopedia. <http://www.copewithcytokines.de> . 2010.

[48] G. Jesmok, C. Lindsey, M. Duerr, M. Fournel, T. Emerson, Jr., Efficacy of monoclonal antibody against human recombinant tumor necrosis factor in E. coli-challenged swine. *Am.J.Pathol.* 141 (1992) 1197-1207.

[49] S. Karlsson, V. Pettila, J. Tenhunen, R. Laru-Sompa, M. Hynninen, E. Ruokonen, HMGB1 as a predictor of organ dysfunction and outcome in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 34 (2008) 1046-1053.

[50] T.R. Klaenhammer, Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol.Rev.* 12 (1993) 39-85.

[51] J.R. Klune, R. Dhupar, J. Cardinal, T.R. Billiar, A. Tsung, HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol.Med.* 14 (2008) 476-484.

[52] M. Kodíček. Biochemické pojmy. http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=vlastnosti_chaotropni . 2010.

- [53] R. Kokkola, E. Sundberg, A.K. Ulfgren, K. Palmblad, J. Li, H. Wang, L. Ulloa, H. Yang, X.J. Yan, R. Furie, N. Chiorazzi, K.J. Tracey, U. Andersson, H.E. Harris, High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 2598-2603.
- [54] J. Krejsek, O. Kopecký, *Klinická imunologie*, 2004.
- [55] W. Kruis, P. Fric, J. Pokrotnieks, M. Lukas, B. Fixa, M. Kascak, M.A. Kamm, J. Weismueller, C. Beglinger, M. Stolte, C. Wolff, J. Schulze, Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53 (2004) 1617-1623.
- [56] E.Y. Krynetski, N.F. Krynetskaia, M.E. Bianchi, W.E. Evans, A nuclear protein complex containing high mobility group proteins B1 and B2, heat shock cognate protein 70, ERp60, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in the cytotoxic response to DNA modified by incorporation of anticancer nucleoside analogues. *Cancer Res.* 63 (2003) 100-106.
- [57] Z. Lacinová, M. Doloniková, D. Halizíková, J. Krajíčková, M. Haluzík. Optimalizace postupu izolace celkové RNA z tukové tkáně. *Klin.Biochem.Metab.* [2], 96-100. 2006.
- [58] J. Li, R. Kokkola, S. Tabibzadeh, R. Yang, M. Ochani, X. Qiang, H.E. Harris, C.J. Czura, H. Wang, L. Ulloa, H. Wang, H.S. Warren, L.L. Moldawer, M.P. Fink, U. Andersson, K.J. Tracey, H. Yang, Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol.Med.* 9 (2003) 37-45.
- [59] J. Li, H. Wang, J.M. Mason, J. Levine, M. Yu, L. Ulloa, C.J. Czura, K.J. Tracey, H. Yang, Recombinant HMGB1 with cytokine-stimulating activity. *J.Immunol.Methods* 289 (2004) 211-223.
- [60] A. Libra. Kvantifikace genové exprese pomocí real-time PCR. http://mat.skola-biotechnologie.cz/2006/III.workshop/Q_PCR.pdf . 2010.
- [61] L. Mandel, J. Travnicek, The minipig as a model in gnotobiology. *Nahrung* 31 (1987) 613-618.
- [62] L.L. Mantell, W.R. Parrish, L. Ulloa, Hmgb-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders. *Shock* 25 (2006) 4-11.

- [63] J. Masopust, R. Průša. Patobiochemie buňky. <http://web.telecom.cz/dotdiag/dokument/patobio/bunka.pdf> . 2010.
- [64] D. Messmer, H. Yang, G. Telusma, F. Knoll, J. Li, B. Messmer, K.J. Tracey, N. Chiorazzi, High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J.Immunol.* 173 (2004) 307-313.
- [65] O.P. Miniats, D. Jol, Gnotobiotic pigs-derivation and rearing. *Can.J.Comp Med.* 42 (1978) 428-437.
- [66] H.W. Mittrucker, S.H. Kaufmann, Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J.Leukoc.Biol.* 67 (2000) 457-463.
- [67] S. Muller, L. Ronfani, M.E. Bianchi, Regulated expression and subcellular localization of HMGB1, a chromatin protein with a cytokine function. *J.Intern.Med.* 255 (2004) 332-343.
- [68] K. Mullis, F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, H. Erlich, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 51 Pt 1 (1986) 263-273.
- [69] M.J. Myers, D.E. Farrell, D.C. Palmer, L.O. Post, Inflammatory mediator production in swine following endotoxin challenge with or without co-administration of dexamethasone. *Int.Immunopharmacol.* 3 (2003) 571-579.
- [70] O. Nečas *Obecná biologie pro lékařské fakulty*, H&H, 2000.
- [71] M. Ombrellino, H. Wang, M.S. Ajemian, A. Talhouk, L.A. Scher, S.G. Friedman, K.J. Tracey, Increased serum concentrations of high-mobility-group protein 1 in haemorrhagic shock. *Lancet* 354 (1999) 1446-1447.
- [72] F. Orskov, I. Orskov, *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can.J.Microbiol.* 38 (1992) 699-704.
- [73] R. Palumbo, M. Sampaolesi, M.F. de, R. Tonlorenzi, S. Colombetti, A. Mondino, G. Cossu, M.E. Bianchi, Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J.Cell Biol.* 164 (2004) 441-449.
- [74] J.S. Park, J. Arcaroli, H.K. Yum, H. Yang, H. Wang, K.Y. Yang, K.H. Choe, D. Strassheim, T.M. Pitts, K.J. Tracey, E. Abraham, Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 284 (2003) C870-C879.

- [75] J.S. Park, D. Svetkauskaite, Q. He, J.Y. Kim, D. Strassheim, A. Ishizaka, E. Abraham, Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J.Biol.Chem.* 279 (2004) 7370-7377.
- [76] E.A. Pasheva, I.G. Pashev, A. Favre, Preferential binding of high mobility group 1 protein to UV-damaged DNA. Role of the COOH-terminal domain. *J.Biol.Chem.* 273 (1998) 24730-24736.
- [77] J. Pavare, I. Grope, I. Kalnins, D. Gardovska, High-mobility group box-1 protein, lipopolysaccharide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in children with community acquired infections and bacteraemia: a prospective study. *BMC.Infect.Dis.* 10 (2010) 28.
- [78] E. Pavlík, A. Pavlíková. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 11. *Labor Aktuell* [3], 10-13. 2004.
- [79] L.C. PAYNE, C.L. MARSH, Gamma globulin absorption in the baby pig: the nonselective absorption of heterologous globulins and factors influencing absorption time. *J.Nutr.* 76 (1962) 151-158.
- [80] S. Pie, P. Matsiota-Bernard, P. Truffa-Bachi, C. Nauciel, Gamma interferon and interleukin-10 gene expression in innately susceptible and resistant mice during the early phase of *Salmonella typhimurium* infection. *Infect.Immun.* 64 (1996) 849-854.
- [81] L. Prokesova, J. Rejnek, J. Sterzl, J. Travnicek, Isolation and characterisation of immunoglobulins in the serum of precolostral piglets. *Folia Microbiol.(Praha)* 14 (1969) 372-376.
- [82] R. Průša, J. Lány, J. Vejvalka, V. Karger. Multimediální učebnice DNA diagnostiky. <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa.htm> . 2010.
- [83] A. Raucci, R. Palumbo, M.E. Bianchi, HMGB1: a signal of necrosis. *Autoimmunity* 40 (2007) 285-289.
- [84] H. Rauvala, A. Rouhiainen, Physiological and pathophysiological outcomes of the interactions of HMGB1 with cell surface receptors. *Biochim.Biophys.Acta* 1799 (2010) 164-170.

- [85] J. Roth, T. Vogl, C. Sorg, C. Sunderkotter, Phagocyte-specific S100 proteins: a novel group of proinflammatory molecules. *Trends Immunol.* 24 (2003) 155-158.
- [86] A. Rouhiainen, J. Kuja-Panula, E. Wilkman, J. Pakkanen, J. Stenfors, R.K. Tuominen, M. Lepantalo, O. Carpen, J. Parkkinen, H. Rauvala, Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1). *Blood* 104 (2004) 1174-1182.
- [87] P. Rovere-Querini, A. Capobianco, P. Scaffidi, B. Valentinis, F. Catalanotti, M. Giazon, I.E. Dumitriu, S. Muller, M. Iannacone, C. Traversari, M.E. Bianchi, A.A. Manfredi, HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep.* 5 (2004) 825-830.
- [88] C. Rumio, D. Besusso, F. Arnaboldi, M. Palazzo, S. Selleri, S. Gariboldi, S. Akira, S. Uematsu, P. Bignami, V. Ceriani, S. Menard, A. Balsari, Activation of smooth muscle and myenteric plexus cells of jejunum via Toll-like receptor 4. *J.Cell Physiol* 208 (2006) 47-54.
- [89] P.L. Sappington, R. Yang, H. Yang, K.J. Tracey, R.L. Delude, M.P. Fink, HMGB1 B box increases the permeability of Caco-2 enterocytic monolayers and impairs intestinal barrier function in mice. *Gastroenterology* 123 (2002) 790-802.
- [90] P. Scaffidi, T. Misteli, M.E. Bianchi, Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418 (2002) 191-195.
- [91] K.A. Scheibner, M.A. Lutz, S. Boodoo, M.J. Fenton, J.D. Powell, M.R. Horton, Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J.Immunol.* 177 (2006) 1272-1281.
- [92] T.W. Shirkey, R.H. Siggers, B.G. Goldade, J.K. Marshall, M.D. Drew, B. Laarveld, A.G. Van Kessel, Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)* 231 (2006) 1333-1345.
- [93] F. Šišák. Tlumení salmonel v Evropské unii. http://www.agroweb.cz/Tlumeni-salmonel-v-Evropske-unii_s76x27908.html . 2010.
- [94] J. Šmarda, J. Doškař, R. Pantůček, V. Růžicková, J. Koptíková *Metody molekulární biologie*, 2005.

- [95] I. Splichal, Y. Muneta, Y. Mori, E. Takahashi, Development and application of a pig IL-8 ELISA detection system. *J.Immunoassay Immunochem.* 24 (2003) 219-232.
- [96] I. Splichal, I. Trebichavsky, Y. Muneta, Y. Mori, Early cytokine response of gnotobiotic piglets to *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Vet.Res.* 33 (2002) 291-297.
- [97] I. Splichal, I. Trebichavsky, A. Splichalova, P.A. Barrow, Protection of gnotobiotic pigs against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium by rough mutant of the same serotype is accompanied by the change of local and systemic cytokine response. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 103 (2005) 155-161.
- [98] D. Stern, S.D. Yan, S.F. Yan, A.M. Schmidt, Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 54 (2002) 1615-1625.
- [99] J. Sterzl, A.M. Silverstein, Developmental aspects of immunity. *Adv.Immunol.* 6 (1967) 337-459.
- [100] M. Talafantova, L. Mandel, Protective activity of *Streptococcus faecalis* against pathogenic action of *Escherichia coli* O55 in gnotobiotic pigs. *Folia Microbiol.(Praha)* 30 (1985) 329-333.
- [101] N. Taniguchi, K. Kawahara, K. Yone, T. Hashiguchi, M. Yamakuchi, M. Goto, K. Inoue, S. Yamada, K. Ijiri, S. Matsunaga, T. Nakajima, S. Komiya, I. Maruyama, High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum.* 48 (2003) 971-981.
- [102] O. Thellin, W. Zorzi, B. Lakaye, B.B. De, B. Coumans, G. Hennen, T. Grisar, A. Igout, E. Heinen, Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J.Biotechnol.* 75 (1999) 291-295.
- [103] J. Tian, A.M. Avalos, S.Y. Mao, B. Chen, K. Senthil, H. Wu, P. Parroche, S. Drabic, D. Golenbock, C. Sirois, J. Hua, L.L. An, L. Audoly, R.G. La, A. Bierhaus, P. Naworth, A. Marshak-Rothstein, M.K. Crow, K.A. Fitzgerald, E. Latz, P.A. Kiener, A.J. Coyle, Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat.Immunol.* 8 (2007) 487-496.

- [104] L.R. Trabulsi, R. Keller, T.A. Tardelli Gomes, Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg.Infect.Dis.* 8 (2002) 508-513.
- [105] J. Travnicek, L. Mandel, Haematology of conventional and germfree miniature Minnesota piglets. II. Serum proteins and immunoglobulins. *Z.Versuchstierkd.* 24 (1982) 308-317.
- [106] C.J. Treutiger, G.E. Mullins, A.S. Johansson, A. Rouhiainen, H.M. Rauvala, H. Erlandsson-Harris, U. Andersson, H. Yang, K.J. Tracey, J. Andersson, J.E. Palmblad, High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium. *J.Intern.Med.* 254 (2003) 375-385.
- [107] L. Ulloa, M. Ochani, H. Yang, M. Tanovic, D. Halperin, R. Yang, C.J. Czura, M.P. Fink, K.J. Tracey, Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99 (2002) 12351-12356.
- [108] V. Urbonaviciute, B.G. Furnrohr, C. Weber, M. Haslbeck, S. Wilhelm, M. Herrmann, R.E. Voll, Factors masking HMGB1 in human serum and plasma. *J.Leukoc.Biol.* 81 (2007) 67-74.
- [109] H. Wang, O. Bloom, M. Zhang, J.M. Vishnubhakat, M. Ombrellino, J. Che, A. Frazier, H. Yang, S. Ivanova, L. Borovikova, K.R. Manogue, E. Faist, E. Abraham, J. Andersson, U. Andersson, P.E. Molina, N.N. Abumrad, A. Sama, K.J. Tracey, HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285 (1999) 248-251.
- [110] H. Wang, H. Liao, M. Ochani, M. Justiniani, X. Lin, L. Yang, Y. Al-Abed, H. Wang, C. Metz, E.J. Miller, K.J. Tracey, L. Ulloa, Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat.Med.* 10 (2004) 1216-1221.
- [111] H. Yang, M. Ochani, J. Li, X. Qiang, M. Tanovic, H.E. Harris, S.M. Susarla, L. Ulloa, H. Wang, R. DiRaimo, C.J. Czura, H. Wang, J. Roth, H.S. Warren, M.P. Fink, M.J. Fenton, U. Andersson, K.J. Tracey, Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101 (2004) 296-301.
- [112] H. Yang, H. Wang, C.J. Czura, K.J. Tracey, The cytokine activity of HMGB1. *J.Leukoc.Biol.* 78 (2005) 1-8.

[113] H. Zayed, Z. Izsvak, D. Khare, U. Heinemann, Z. Ivics, The DNA-bending protein HMGB1 is a cellular cofactor of Sleeping Beauty transposition. *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 2313-2322.

9 Přílohy

9.1 Fotografie pořízené při práci na MBÚ AV ČR, v.v.i.



Obr. 30: Manipulace se zvířaty uvnitř izolátoru



Obr. 31: Gnotobiotická selata v izolátoru



Obr. 32: Gnotobiotické sele v anestezii



Obr. 33: Vykrvění selete



Obr. 34: Odběr materiálu a provádění výplachu tenkého střeva



Obr. 35: Očkování živných pūd

9.2 Srovnání nukleotidových sekvencí HMGB1 u vybraných druhů

Prase-HMGB1	CTCCTTCGGCCTTTTTCTTGTTTTGTTCTGAGTATCGTCCAAAAATCAAAGGAGAGCATC
HMGB1-9-amplikon	-----AGGAGAGCATC
Kůň	CTCCTTCGGCCTTTTTCTTGTTTTGTTCTGAGTATCGCCCCAAAATCAAAGGAGAGCATC
Pes	CTCCCTCGGCCTTTTTCTTGTTTTGTTCTGAGTATCGCCCCAAAATCAAAGGAGAGCATC
Skot	CTCCTTCGGCCTTTTTCTTGTTTTGTTCTGAGTATCGTCCAAAAATCAAAGGCGAACATC
Člověk	CTCCTTCGGCCTTCTTCCTCTTCTGCTCTGAGTATCGCCCCAAAATCAAAGGAGAACATC
Šimpanz	CTCCTTCGGCCTTCTTCCTCTTCTGCTCTGAGTATCGCCCCAAAATCAAAGGAGAACATC
	*** ** ****
Prase-HMGB1	CTGGCCTATCCATTGGTGATGTTGCAAAGAAACTGGGAGAGATGTGGAATAACACCGCTG
HMGB1-9-amplikon	CTGGCCTATCCATTGGTGATGTTGCAAAGAAACTGGGAGAGATGTGGAATAACACCGCTG
Kůň	CTGGCCTATCCATTGGTGATGTTGCAAAGAAACTGGGAGAGATGTGGAATAACACTGCTG
Pes	CCGGCCTATCCATTGGTGATGTTGCAAAGAAACTGGGAGAGATGTGGAATAACACTGCTG
Skot	CTGGCCTGTCTATTGGTGATGTTGCAAAGAAACTGGGAGAGATGTGGAATAACACTGCTG
Člověk	CTGGCCTGTCCATTGGTGATGTTGCGAAGAAACTGGGAGAGATGTGGAATAACACTGCTG
Šimpanz	CTGGCCTGTCCATTGGTGATGTTGCGAAGAAACTGGGAGAGATGTGGAATAACACTGCTG
	* ***** ** *****
Prase-HMGB1	CAGATGACAAGCACCTTATGAAAAGAAGGCTGCTAAGCTGAAGGAGAAGTACGAAAAGG
HMGB1-9-amplikon	CAGAT-----
Kůň	CAGATGACAAGCAGCCTTATGAAAAGAAGGCTGCTAAGCTGAAGGAGAAAATACGAAAAGG
Pes	CAGATGACAAGCAGCCTTATGAAAAGAAGGCTGCTAAGCTGAAGGAAAAATATGAAAAGG
Skot	CGGATGATAAGCAGCCTTATGAGAAAGAAGGCTGCTAAGCTGAAGGAAAAGTATGAAAAGG
Člověk	CAGATGACAAGCAGCCTTATGAAAAGAAGGCTGCGAAGCTGAAGGAAAAATACGAAAAGG
Šimpanz	CAGATGACAAGCAGCCTTATGAAAAGAAGGCTGCGAAGCTGAAGGAAAAATACGAAAAGG
	* ***

Obr. 36: Srovnání sekvencí HMGB1, pouze část obsahující úsek amplifikovaný při real-time PC (vyznačen)