

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE
VYUŽITÍ DEEP-SEQUENCING PŘI STUDIU ZÁVISLOSTÍ
PRŮBĚHU LENTIVIROVÉ INFEKCE NA VARIABILITĚ
RECEPTORŮ PŘIROZENÉ IMUNITY

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. PETR JÍLEK, CSc.

Konzultant: prof. MUDr. PAVEL BOŠTÍK, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2014

JANA ZELNÍKOVÁ

Poděkování

Děkuji vedoucímu práce PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za pomoc a vstřícnost při realizaci diplomové práce. Především bych chtěla poděkovat prof. MUDr. Pavlu Boštíkovi, Ph.D. za jedinečnou příležitost podílet se na výzkumném projektu, za jeho odborné vedení a osobní přínos. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lence Kaislerové za odborné vedení a ochotu pomoci při vypracování experimentální části. Chtěla bych také poděkovat Bc. Janu Kalužovi za obrovskou ochotu, podporu a pomoc v analýze dat. Další poděkování patří Mgr. Monice Schmidt. Děkuji také mé rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali a byli mi oporou.

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, dne 30.04.2014

Jana Zelníková

1 Obsah

1	Obsah	4
2	Úvod	7
3	Zadání diplomové práce – Cíl práce	9
4	Teoretická část	10
4.1	Makakové jako modelový organismus	10
4.2	HIV a SIV	11
4.2.1	HIV – historie a současnost	11
4.2.2	SIV - historie	11
4.2.3	Původ viru HIV-1,-2	11
4.2.4	Popis viru	12
4.2.5	Chování viru v organismu	12
4.2.6	Vyčerpání imunitního systému = AIDS	13
4.3	MHC	14
4.3.1	Popis MHC, rozdělení	14
4.3.2	Polymorfismus MHC	14
4.3.3	MHC molekuly I. třídy	15
4.3.4	MHC a její role v rozvoji imunitní odpovědi na HIV/SIV	16
4.3.5	Výhodné a nevýhodné typy MHC molekul	17
4.4	Pyrosekvenování	19
4.4.1	Postup sekvenace	20
4.4.2	Přesnost a limitující faktory sekvenace	23
4.4.3	Využití	23
4.4.4	Výhody a nevýhody metody	24
5	Experimentální část	25
5.1	Vzorky	25
5.2	RNA purifikace s použitím RNeasy Mini Kit od společnosti Qiagen	26
5.2.1	Postup purifikace RNA	26
5.3	Stanovení koncentrace a čistoty izolovaných nukleových kyselin	27

5.3.1	Postup stanoví koncentrace a čistoty RNA	28
5.4	Příprava cDNA pomocí reverzní transkriptázy	28
5.4.1	Postup přípravy cDNA	29
5.5	Polymerázová řetězová reakce	30
5.5.1	Gradientová PCR	30
5.5.2	Postup PCR	33
5.6	Kontrola produktů pomocí gelové elektroforézy	37
5.7	Gelová elektroforéza s GTG agarosou	37
5.8	Izolace a čištění cDNA z GTG agarosy	38
5.9	Kvantifikace DNA pomocí Quant-It™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen)	39
5.10	Výpočet koncentrace cDNA pomocí Microsoft Excel 2010	40
5.11	Emulzní PCR amplifikace	42
5.11.1	Příprava reagensů	43
5.11.2	Příprava Mock mix a Pre-Emulsion	44
5.11.3	Příprava DNA knihovny	45
5.11.4	Emulzifikace	45
5.11.5	Amplifikace	46
5.11.6	Sběr emulze a první promytí	46
5.11.7	Promytí mikrokuliček	47
5.11.8	Obohacení DNA knihovny	47
5.11.9	Sbírání obohacených DNA mikrokuliček	49
5.11.10	Přidání Seq primerů	50
5.12	Sekvenování DNA na GS Junior	50
5.12.1	Promytí přístroje GS Junior pomocí Pre-Wash Buffer	52
5.12.2	Příprava a skladování kuliček v Bead Deposition Device	52
5.12.3	Aplikování jednotlivých vrstev mikročástic do PTP a Prime přístroje	56
5.12.4	Sekvenování	58
5.13	Problémy a řešení při přípravě a procesu pyrosekvenování	59
6	Výsledky	61
6.1.1	Analýza dat	61
6.1.2	Analýza nalezených MHC molekul I. třídy	63

6.1.3	Určení haplotypu	65
6.1.4	Analýza artefaktů a nových sekvencí	66
6.1.5	Analýza chyb	72
6.1.6	Srovnání jednotlivých alel u LVL a HVL makaků.....	76
7	Diskuse.....	84
7.1.1	Srovnání makaků s odlišným vývojem onemocnění.....	84
7.1.2	Určování názvu alel dle nové a staré nomenklatury pro MHC I.	86
7.1.3	Analýza nových sekvencí.....	87
7.1.4	Analýza chybových čtení.....	90
7.1.5	Vyhodnocení domnělých výhodných alel MHC I. třídy.....	92
8	Závěr	97
9	Abstrakt.....	99
10	Abstract.....	100
11	Použité zkratky.....	101
12	Seznam tabulek.....	103
13	Seznam obrázků.....	104
14	Seznam grafů	104
15	Použitá literatura	105

2 Úvod

Human Immunodeficiency virus = HIV (virus lidské imunodeficiency) představuje reálnou hrozbu pro mnoho lidí na celém světě. Od objevení tohoto viru na počátku 80. let se odhaduje, že na onemocnění Acquired Immune Deficiency Syndrome = AIDS (Syndrom získané imunodeficiency) zemřelo okolo 50 milionů lidí. Proto se vědci snaží co nejvíce objasnit biologické procesy, které se odehrávají v lidském těle po napadení tímto virem a vyvinout vakcínu proti HIV nebo lék, který by vyléčil onemocnění AIDS. Podrobná znalost mechanismu vstupu viru do organismu, jeho působení a také reakce přirozené imunity, můžou velmi významně usnadnit vývoj těchto léků.

Již se zjistilo, že nejen získaná, ale i přirozená imunita má významnou roli v dalším rozvoji HIV infekce a ovlivňuje její průběh. Přirozená imunita představuje první bariéru, kterou musí infekční patogen překonat, aby se mohl dál rozvíjet. Přirozená imunita nemá paměť a reaguje na patogen vždy stejně. Jednou ze zásadních součástí přirozené i získané imunity jsou determinanty Human Leukocyte Antigen = HLA (hlavní histokompatibilní komplex). Každý jedinec vlastní svoji unikátní sadu genů, které jsou zodpovědné za expresi těchto determinantů.

Jelikož se ale nedá testovat nové léky a postupy na lidech, musejí se vědci zaměřit na organismus, u kterého by probíhala infekce obdobně a který by byl také relativně podobný člověku. Významným modelovým organismem pro studium HIV infekce jsou makakové. Makakové jsou náchylní k onemocnění virem Simian Immunodeficiency Virus = SIV, který je podobný lidskému HIV a vyvolává u těchto opic onemocnění podobné AIDS.

Při studiu HIV infekce se objevilo, že důležitou roli v akutní fázi AIDS mají u člověka HLA molekuly ve spojení s CD8⁺ T lymfocyty. Všechny lidské jaderné buňky exprimují na svém povrchu molekuly HLA I. třídy. Tyto HLA molekuly I. třídy mají za úkol vystavit fragmenty peptidů zevnitř buňky a dávat najevo cytotoxickým CD8⁺ T buňkám, jaký obsah je uvnitř buňky. CD8⁺ T lymfocyty se dále rozhodnou, jestli vystavený fragment je vlastní a budou ho tolerovat, anebo je cizí a buňka, která obsahuje tento patogen, bude zničena.

Každý lidský jedinec má svůj jedinečný haplotyp HLA molekul I. třídy. Molekuly HLA jsou známy svým polymorfismem, který je nesmírně důležitý pro rozmanitost odpovědí přirozené imunity. Díky tomuto polymorfismu se u některých jedinců můžou vytvořit takové kombinace Major Histocompatibility Complex (MHC, hlavní histokompatibilní komplex – obecný pojem, u člověka nazývaný HLA) molekul, které přispívají k odolnosti vůči některým nemocem.

U člověka existují 3 klasické třídy MHC I. molekul, avšak u makaků existuje více jak 20 tříd těchto molekul, proto makakové disponují ještě větší variabilitou MHC molekul I. tř. než u člověka. Dosud u makaků nebyly objeveny všechny varianty MHC molekul I. třídy. Existují již však důkazy o tom, že některé varianty MHC molekul poskytují výhodu při SIV/HIV infekci, která se manifestuje pomalejším průběhem onemocnění.

Při využití klasických metod sekvenace DNA nemůžeme dosáhnout úplného zdokumentování všech variant MHC I. třídy. Klasickou Sangerovou metodou umíme nasekvenovat pouze nejfrekventovanější varianty. Nová metoda pyrosekvenování nám umožňuje odhalit i méně frekventované varianty a dává také informaci o poměrném zastoupení jednotlivých variant ve vzorku, což umožňuje získat komplexní informaci o MHC molekulách I. třídy.

3 Zadání diplomové práce – Cíl práce

Získali jsme vzorky RNA z opic druhu makak rhesus z buněk periferní krve, lymfatických orgánů a gastrointestinálního traktu z Yerkes National Primate Research Center, Emory University, Atlanta, GA, USA. Tyto opice byly záměrně infikovány virem SIV239, nebo SHIV clade C a byl u nich sledován průběh onemocnění. U těchto primátů byla sledována virová nálož v průběhu onemocnění.

Cíl naší práce spočívá ve využití nové metody pyrosekvenování při studiu MHC molekul I. třídy u opic druhu makak rhesus. Bude nás zajímat rozdíl v expresi MHC molekul I. třídy u dvou skupin makaků. Jedna skupina makaků s rychlou progresí onemocnění SIV a druhá skupina s pomalou progresí onemocnění. Očekáváme, že najdeme korelaci frekvence některých variant MHC I. třídy s průběhem onemocnění a objevíme nové molekuly MHC I. třídy, které ještě nebyly nikdy nalezeny.

Dále se zaměříme na metodu pyrosekvenování a její využití při sekvenaci velmi náročných vzorků. Zhodnotíme chybovost naší metody a pokusíme se identifikovat jednotlivé chyby.

4 Teoretická část

4.1 Makakové jako modelový organismus

Makakové jsou v současnosti téměř jediným modelovým organismem pro studium patogeneze HIV/SIV onemocnění a vývoj vakcín (Riza Daza-Vamenta a spol., 2004). Již v roce 1989 byl poprvé použit druh makak rhesus pro studium HIV infekce (Desrosiers a spol., 1989). Byly na něm zkoušeny potenciální HIV vakcíny. Po tomto experimentu došlo k obrovskému nárůstu v používání makaků jako experimentálních modelů pro výzkum v oblasti HIV (Desrosiers a spol., 1989),(Yu Zhou a spol., 2013). K nárůstu používání makaků celkově přispělo to, že v současnosti existuje stále množství léků a potenciálních vakcín proti HIV, které jsou v preklinických fázích studia a musejí být testovány na velkém počtu zvířat (Walker a spol., 2011).

Dalším z faktorů přispívajícím k rozsáhlejšímu používání makaků je, že dříve bylo zvykem infikovat experimentální makaky virem SIV intravenózní cestou. Nyní se upouští od této tendence a makakové jsou infikováni opakovaně nízkými dávkami SIV skrz mukózní cestu přenosu infekce, protože tento způsob se jeví jako více podobný infekci HIV u lidí (Reynolds a spol., 2010).

Už mnoho let se vědci snaží rozpoznat jemné rozdíly mezi imunologickými a virologickými výsledky u makaků, kteří byli infikováni skrz slizniční cestu infekce, a zjistit tím komplexní proces rozvoje SIV a HIV infekce (MCDermott a spol., 2004).

Při rozvoji SIV infekce můžeme nalézt v periferní krvi makaků různě vysoké hladiny virové nálože. Tato virová nálož se využívá k předpovědi, jak rychle bude infekce dále progredovat (Watson a spol., 1997). Podle rychlosti rozvoje AIDS lze infikované jedince řadit do několika skupin. Takže například když jedinec zemře v průběhu prvního roku po infekci, jedná se o rychlý a agresivní průběh onemocnění (tzv. "fast progressor"), zatímco u velmi pomalého průběhu onemocnění se mluví o tzv. "long-term non-progressor", kde můžeme nalézt v chronické fázi onemocnění velmi nízké hodnoty virové nálože v řádech 10^4 - 10^5 RNA kopií/ml (Smith a spol., 1999).

V praxi jsou nejčastěji používány tři druhy makaků, kteří jsou vnímaví k SIV infekci a rozvoji nemoci podobné AIDS. Jsou to: *Macaca mulatta* = Makak rhesus

(indický a čínský podtyp), *Macaca fascicularis* = Makak jávský a *Macaca nemestrina* = Makak vepří (Daniel a spol., 1985). Z těchto tří druhů byl nejvíce prozkoumán indický druh makak rhesus v souvislosti s infekcí SIV (Walker a spol., 2004). Především u makaků druhu rhesus infikovaných SIV byla zkoumána imunitní odpověď v závislosti na dynamice viru a obzvláště ve změnách v počtu CD4⁺ buněk (Monceaux a spol., 2007). Zjistilo se, že infekce SIV u indického typu makak rhesus probíhá mnohem rychleji než u člověka, a proto je třeba opatrnost při hodnocení studií a přímém přenášení získaných poznatků na HIV onemocnění u člověka (Walker a spol., 2004).

4.2 HIV a SIV

4.2.1 HIV – historie a současnost

Viry HIV-1 a 2 (Human immunodeficiency virus = virus lidské imunodeficience) mohou významně ohrozit lidskou populaci. Virus HIV-1 je původcem většiny onemocnění současné pandemie AIDS. V současnosti je nakaženo okolo 35,3 milionů lidí po celém světě, z toho jich umírá na AIDS každý rok 1,6 milionu (web HIV/AIDS, 2013). Od objevení tohoto infekčního onemocnění byla na jeho léčbu spotřebována nemalá částka, a proto se i velký zájem od počátku soustředil na výzkum a vývoj léků a vakcín proti HIV.

4.2.2 SIV - historie

Simian immunodeficiency viruses (SIVs) jsou lentiviry, které jsou schopny přirozeně infikovat až 45 druhů afrických primátů (Peeters a spol., 2001). Dle studie založené na analýze 4 druhů opic, žijících izolovaně okolo 11 000 let na ostrově Bioko, se zjistilo, že SIV je přítomný u těchto opic minimálně 32 000 let a pravděpodobně mnohem déle (Donald a spol., 2010), (Worobey a spol., 2010).

4.2.3 Původ viru HIV-1,-2

Epidemiologické a fylogenetické analýzy zjistily, že viry HIV-1 a HIV-2 se vyvinuly z SIVcpz šimpanzů a SIVsm mangabejů černošavlých z centrální a východní Afriky po mezidruhové transmissi na člověka (Lara E. Pereira a spol., 2012).

V poslední době byl také zaznamenán důkaz o mezidruhové transmisi mezi odlišnými SIV liniemi původem z goril (Plantier a spol., 2009). Na člověka se přenesly tyto viry pravděpodobně při zpracování uloveného masa z opic (Krejsek, J., 2004).

4.2.4 Popis viru

Viry HIV a SIV patří do čeledi Retroviridae, podčeleď Lentivirinae. Virus obsahuje jednovláknovou RNA, která je přepisována pomocí reverzní transkriptázy do DNA. Další složky zahrnují enzym integrázu, která zodpovídá za integrování nově vzniklé DNA do DNA buňky. Nukleová kyselina je obalena proteinovým obalem kapsidou a na povrchu viru je membrána utvořená jak z virových proteinů, tak i ze struktur buněčné membrány hostitelské buňky. Na membráně můžeme nalézt významné povrchové glykoproteiny gp120 a gp41, které se vážou na receptor buňky a zahajují průnik viru do této buňky (web wikipedia, 2013).

4.2.5 Chování viru v organismu

Virus HIV v organismu nejdříve infikuje makrofágy a následně CD4⁺ T lymfocyty. Pro vniknutí viru do makrofágů a CD4⁺ T lymfocytů je důležitý hlavní receptor CD4 a celá řada dalších koreceptorů pro buněčné chemokiny. Pro vniknutí do makrofágů je důležitý chemokinový receptor C-CR5 a pro vniknutí do T lymfocytů je důležitý chemokinový receptor C-X-CR4. U některých jedinců se můžeme setkat s rezistencí vůči nákaze HIV virem. Může to být dáno tím, že mají delecí 32 nukleotidových bazí v genu pro C-CR5. Receptor C-CR5 se díky této delecí neobjeví na povrchu makrofágů a virus HIV není schopen pronikat do buňky. Tato delecí byla objevena jenom u bělošské populace a v homozygotní podobě se objevuje zhruba u 1% lidí (Krejsek, J., 2004).

Virus HIV-1 se přepisuje pomocí reverzní transkriptázy z RNA do DNA a díky integráze se integruje do genetické informace hostitele a stává se takzvaným provirem. Ke zvýšené tvorbě nových virových částic dochází zejména v době, kdy je buňka antigenně stimulována. Ve fázi proviru může virus přebývat i několik desítek let. Po antigenní stimulaci dochází k přepisu viru do jednořetězcové RNA a následně na ribozomech hostitelské buňky do polyproteinů. Nový virus je složen ze dvou molekul

jednořetězcové RNA a při průchodu hostitelskou membránou získává povrchový obal a dochází k lýze buňky (Krejsek, J., 2004).

Virus SIV je viru HIV velmi podobný. Virus SIV přirozeně infikuje některé primáty, kteří jsou vůči rozvoji onemocnění odolní. Jeho životní cyklus se významně neodlišuje od viru HIV a pro makaky je patogenní, tj. způsobuje opičí AIDS. Proto byly také zahájeny studie s virem SIV pro výzkum onemocnění AIDS. Je samozřejmé, že výsledky získané těmito studii nemůžeme zcela přenášet na člověka, ale v mnoha případech nám může studium SIV na zvířatech hodně napovědět.

Existují významné rozdíly ve vnímavosti vůči infekci HIV/SIV a také v rychlosti rozvoji onemocnění AIDS. Tento proces je ovlivňován celou řadou jednotlivých kroků, které v souhrnu mohou vyústit v nejrůznější reakci. Důležitou roli hraje konkrétní typ HIV/SIV, protože HIV/SIV je značně genově polymorfní a v přepisu jeho genetické informace se objevují časté chyby, které mohou vyústit jak v tvorbu defektních virionů, tak i v jeho lepší životaschopnost. Vir HIV/SIV může mít různé varianty sekvencí, které mají vliv na jeho infekční potenciál. U kontrolorů onemocnění byl objeven neobvyklý polymorfismus v nef (Rhodes a spol., 2000), (Salvi a spol., 1998) vpr (Lum a spol., 2003) a dalších sekvencích (Alexander a spol., 2000).

Nesmíme také zanedbat vliv prostředí. Pro jedince je však důležitá zejména jeho individuální vnímavost a genetická výbava. Imunitní systém geneticky významně determinuje komplex HLA molekul (Krejsek, J., 2004).

4.2.6 Vyčerpání imunitního systému = AIDS

Infekce HIV probíhá v několika stádiích. Od bezpříznakového nosičství až po rozvinuté stádium AIDS, které je charakterizováno výrazným úbytkem $CD4^+$ T lymfocytů pod 200/ μ l krve (web AIDS, 2010).

Úbytek $CD4^+$ T lymfocytů, je způsoben jednak přímo virovou infekcí, jednak i nepřímo, kdy i neinfikované buňky ztrácejí své funkce a podléhají apoptóze. $CD4^+$ lymfocyty, neboli pomocné T lymfocyty (Th) jsou zodpovědné za podporu a stimulaci ostatních buněk imunitního systému. Ve chvíli, kdy množství $CD4^+$ T lymfocytů klesne

pod určitou hladinu, nastane selhávání imunitního systému a organismus nedokáže odolat ani běžné infekci (web AIDS, 2010).

4.3 MHC

4.3.1 Popis MHC, rozdělení

MHC je soubor povrchových glykoproteinů, které můžeme nalézt na téměř všech buňkách obratlovců. Hrají významnou roli v transplantacích, kde jsou příčinou tkáňové neslučitelnosti a jsou jedním z klíčových determinant rozvoje imunitní odpovědi (Krejsek, J., 2004).

U jednotlivých obratlovců se soubor těchto povrchových glykoproteinů nazývá jinak. U člověka se soubor MHC molekul nazývá HLA (Human leukocyte antigen). Je to z toho důvodu, že v minulosti bylo nejvíc těchto molekul nalezeno právě na leukocytech (Krejsek, J., 2004).

U lidí rozdělujeme HLA molekuly do dvou hlavních tříd - HLA I. třídy a HLA II. třídy. HLA molekuly I. třídy můžeme nalézt na všech jaderných buňkách v těle, kdežto HLA molekuly II. třídy můžeme nalézt na všech antigen prezentujících buňkách. Mezi hlavní antigen prezentující buňky můžeme zařadit dendritické buňky, makrofágy, Langerhansovy buňky a B lymfocyty. Hlavní rozdíl mezi HLA I. třídou a II. třídou je ten, že HLA I. třídy prezentují endogenní cizorodý fragment, který následně prezentují cytotoxickým $CD8^+$ T lymfocytům. Antigen prezentující buňky zpracovávají exogenní fragmenty, které jsou posléze vystaveny na HLA glykoproteinech II. třídy a rozpoznávány pomocnými $CD4^+$ T lymfocyty (Krejsek, J., 2004).

4.3.2 Polymorfismus MHC

Každý jedinec nese svůj vlastní, jedinečný soubor genů pro MHC (kromě homozygotních dvojčat), který je jedinečnou kombinací genů matky a otce - tzv. haplotypů. Existuje nespočet různých variant MHC genů v celé populaci. Tento polymorfismus zajistí, že každý antigen má pravděpodobnost, že bude moci být vázán určitými MHC glykoproteiny. Komplex HLA molekul I. a II. třídy určuje individuální

imunologickou reaktivitu daného jedince, jeho náchylnost nebo odolnost vůči onemocněním (Krejsek, J., 2004).

4.3.3 MHC molekuly I. třídy

Geny MHC I. třídy (HLA I. třídy) mají důležitou úlohu ve vývoji získané a přirozené imunity. Jak již bylo zmíněno výše, produkty těchto genů jsou glykoproteiny, které jsou na povrchu jaderných buněk. Tyto molekuly mají za úkol vázat fragmenty endogenních proteinů z buňky a umožnit jejich rozeznávání $CD8^+$ T lymfocyty. Dále také slouží jako ligandy pro killer cell immunoglobulin-like receptors (KIRs) na povrchu natural killer (NK) buněk, které tím rozeznávají buňky vlastní a buňky cizí, nebo nějak pozměněné (Krejsek, J., 2004).

Buňky neustále vystavují fragmenty proteinů na svém povrchu v kooperaci s MHC glykoproteiny, aby tak ukázaly imunitnímu systému, jestli obsahují jenom vlastní vhodné proteiny či ne. Když je buňka napadena intracelulárním patogenem, MHC alely I. třídy prezentují cizí peptidy z patogenu $CD8^+$ T buňkám. Většina $CD8^+$ T odpovědí vyžaduje zapojení $CD4^+$ T buněk – ty musí rozpoznat stejný antigen na APC = antigen prezentujících buňkách (Lašovička, 2012, web imunologie).

$CD8^+$ T buňky, jinak také cytotoxické T lymfocyty (CTL) umí vytvořit specifické cytokiny a tím zabít buňku, která prezentuje tento cizí peptid. Tímto mechanismem se imunitní systém brání proti případnému šíření infekce a růstu nádoru. Když nastane situace, že buňka vystavuje na svém povrchu málo těchto proteinů MHC I. třídy, může se stát, že $CD8^+$ T buňky tuto buňku nerozpoznají a dojde tak k šíření infekce nebo nekontrolovatelnému růstu nádorů (Krejsek, J., 2004).

Lidské HLA lokusy I. třídy se rozdělují do tří hlavních, klasických tříd: HLA-A, -B a -C. Na rozdíl od lidí, můžeme nalézt u makaků v lokusech MHC I. třídy značné delece a duplikace v genech. Makakové nemají MHC lokus I-C, na místo toho, ale mají více různých lokusů pro MHC třídu I-A a I-B. U makaků můžeme nalézt až 22 potenciálně aktivních lokusů pro MHC třídu I na jediném haplotypu (Daza-Vamenta a spol., 2004). Konkrétně druh makak rhesus má více jak 200 různých linií MHC I. třídy a každá linie může obsahovat 1 až téměř 60 alelických variant, které se vyskytují mezi exony 2-4 (de Groot a spol., 2012).

4.3.4 MHC a její role v rozvoji imunitní odpovědi na HIV/SIV

Protože více než jedna třetina MHC genů může být zapojena v imunitních odpovědích (MHC Consortium, 1999), znalost těchto genů by mohla být základem pro evoluční a klinické studie. Stejně jako u lidí, bylo u makaků zjištěno, že určité MHC alely jsou spojovány s větší náchylností, nebo naopak s rezistencí k onemocnění AIDS (Bontrop a spol., 2005).

Důležitou roli má nejenom repertoár MHC alel, ale také stupeň jejich exprese. Právě míra exprese a různorodost MHC glykoproteinů vyjádřených na buňkách může definovat velikost imunitní odpovědi na HIV nebo SIV infekci (Grossman a spol., 2006), (Okoye a spol., 2007), (Grossman a spol., 2008).

Nedávno bylo také zjištěno, že glykoproteiny MHC I. třídy mohou být také vstupními receptory pro vniknutí viru do buňky (Kurtz a spol., 2010). MHC molekuly jsou také aktivačními nebo inhibičními ligandy pro NK buňky a tím jsou schopny dále ovlivňovat imunitu jedince (Parham a spol., 2005).

Vědci stále diskutují, jestli různorodost MHC molekul, která je důležitá pro vznik nejrůznějších imunitních odpovědí, nezapříčiní také přílišnou negativní selekci T lymfocytů brzlíkem a tím sníženou funkci imunity (Daza-Vamanta a spol., 2004). Modelové situace, které zkoumaly optimální poměr mezi počtem funkčních heterozygotních lokusů (u obou tříd I a II) a pravděpodobnosti přežití, předpokládají optimální počet lokusů okolo šesti, a když počet funkčních lokusů převyší 12, pravděpodobnost přežití klesne (Takahata a spol., 1995). Zatím není objasněno, jak dokážou mít makakové více jak 10 funkčních MHC alel třídy I a stále udržovat funkční CD8⁺ T imunitní odpověď. Nedávno bylo objeveno, že MHC molekuly exprimované u makaků na PBMC (peripheral blood mononuclear cell = jaderné buňky periferní krve) v malém procentu nemají významnou roli v restrikci SIV CD8⁺ T buňkami (Budde a spol., 2011).

Výsledky získané díky výzkumu Budde (2011) napovídají, že jenom MHC molekuly I. třídy exprimované ve velkém množství v periferní krvi jsou zásadní pro restrikci SIV infekce v akutní fázi pomocí CD8⁺ T buněk. Naproti tomu bylo zjištěno, že minoritní část CD8⁺ T buněčných reakcí je zodpovědná za kontrolu chronické fáze

HIV/SIV reakce (Frahm a spol., 2006), (Friedrich a spol., 2007). V současnosti je již známo velké množství informací o expresi MHC I třídy, bohužel zatím nevíme, jak velký přínos má jednotlivá exprese každé alely MHC I třídy.

Před časem bylo zjištěno, při použití kvantitativní real-time PCR, která umožňuje srovnat výši exprese HLA-A, -B a -C lokusů, které jsou běžně nalezeny v lidských tkáních, že u některých jedinců můžeme nalézt na PBMC preferenční transkripci HLA-B lokusu (Garcia-Ruano a spol., 2010). Thomas (2009) ve své práci uvedl, že u jedinců s vysoce exprimovanými HLA-C alelami můžeme nalézt nižší virovou nálož v chronické fázi HIV.

Green (2011) provedl pokus, ve kterém zkoumal, zda se MHC alely liší v jednotlivých subtypech leukocytů. Zjistil, že u člověka se tato genové výbava mezi jednotlivými subtypy leukocytů neliší. Avšak u makaků rhesus a mauritian cynomolgus macaques (MCM) našel významné rozdíly. U MCM makaků našel rozdíl v genech pro MHC u jednotlivých leukocytů až v 45%, u druhu makak rhesus v 14%. Tato rozdílná výbava v genech měla také svoje důsledky v genové expresi jednotlivých MHC glykoproteinů a také zvláště těch, které zapříčiňují restrikci SIV CD8⁺ T buňkami.

Často se také můžeme setkat se situací, kdy jedinec, který dobře zvládá SIV infekci má jenom jedinou protektivní MHC I alelu (např. Mamu-B*008 nebo Mamu-B*017) (Loffredo a spol., 2007).

4.3.5 Výhodné a nevýhodné typy MHC molekul

Určité HLA alely třídy I mají velký vliv na průběh onemocnění virem HIV (Carrington a spol., 1999), (McNeil a spol., 1996), (Migueles a spol., 2000). Ve skupině HIV pozitivních lidí nazývaných „elitní kontrolaři“ je výrazně vyšší výskyt výhodných alel HLA-B27 a HLA-B57. Naproti tomu HLA-B35 je spojována s rychlým průběhem onemocnění AIDS, mechanismus reakce však není dosud znám (Jin a spol., 2002). Dále HLA-B alely, které obsahují Bw4 epitop (definovaný aminokyselinou v pozici 77-83), ukazují jistou odolnost vůči HIV onemocnění (Flores-Villanueva a spol., 2001), která je pravděpodobně důsledkem jejich funkce ligandu pro inhibiční receptory KIR3DL17 a aktivační receptory KIR3DS1 na NK buňkách (Martin a spol., 2002), (Qi a spol., 2006).

Po celém světě se můžeme setkat v různých populacích s rozdílnou výbavou HLA molekul. Například v africké populaci jsou lidé, kteří mají HLA-A2/A*6802 a HLADR1, které je relativně chrání před infekcí HIV-1, kdežto osoby s HLA-A23 mají tu nevýhodu, že jsou náchylnější k HIV (Krejsek, J., 2004).

Mnoho studií se podílelo na studiu MHC molekul, které se efektivně podílejí na HIV specifické CD8⁺ T buněčné odpovědi (Altfeld a spol., 2006), (Feeney a spol., 2004). Pro podrobné studium MHC molekul, ale existují určité obtíže. Lidé nakažení virem HIV většinou zjistí tuto skutečnost až po několika týdnech. Velmi výjimečně se stává, že tuto informaci zjistí již v akutní fázi onemocnění.

Nejčastěji se využívá viru SIV a makaků jako experimentálních zvířat pro studium HIV/SIV onemocnění. Určité MHC alely třídy I, zahrnující Mamu-A*01 (Mamu = *Macaca mulatta*) a Mamu-B*017, jsou spojovány s pomalým vývojem onemocnění u SIV infikovaných makaků (Mothe a spol., 2003), (Yant a spol., 2006). Nezávisle ale přítomnost těchto alel nepředpovídá vývoj onemocnění. V případě Mamu-B*017, jenom ¼ z Mamu-B*017 pozitivních makaků se stane „elitním kontrolorem“ a má v chronické fázi onemocnění hodnotu virové nálože RNA pod 1000 kopií/ml plasmy (Yant a spol., 2006). Dokonce Mamu-B*017 pozitivní makakové nesoucí identické haplotypy MHC třídy I, mají velmi rozdílný vývoj onemocnění (Wojcechowskyj a spol., 2007).

Studie provedená Yant a spol. (2006) se 181 indickými makaky objevila čtyři dominantní MHC alely I. třídy u skupiny „elitních kontrolorů“: Mamu-B*017, Mamu-B*029, Mamu-A*002 a Mamu-A*011. Také zjistili, že u těchto „elitních kontrolorů“ se neobjevuje Mamu-B*01, ačkoli byl tento typ nalezen u 60 ze 181 pokusných zvířat (Yant a spol., 2006). Zajímavou informací je fakt, že 13 „elitních kontrolorů“ v této studii činí 7% z celkového počtu 181 jedinců a u lidí můžeme nalézt v průměru 8% jedinců, kteří jsou schopni podobně jako makakové („elitní kontroloři“) kontrolovat replikaci HIV a tím i průběh onemocnění (Mellors a spol., 1997).

Studie zaměřená na Mamu-B*008 odhalila, že v 38% „elitních kontrolorů“ bylo Mamu-B*008 pozitivních ve srovnání se skupinou 3% Mamu-B*008 pozitivních u progresorů onemocnění (Loffredo a spol., 2007). Alela Mamu-B*008 byla také

spojována až se 7,34x nižší virovou náloží v chronické fázi nemoci (Loffredo a spol., 2007).

V celé kaskádě imunitních reakcí v odpovědi na infekci HIV/SIV mají významnou roli také subpopulace CD8⁺ T lymfocytů vyvinuté v akutní fázi onemocnění (Thomas a spol., 2007). Po prvních týdnech a měsících onemocnění můžeme vidět, že specifické epitopy CD8⁺ T buněk urychleně vybírají ze svých sekvenčních variant, zatímco CD8⁺ T buňky vyvinuté během chronické fáze infekce, velmi zřídka provádějí tuto selekci (Thomas a spol., 2007).

4.4 Pyrosekvenování

Pyrosekvenování je molekulární biologická technika, která může být použita pro analýzu a kvantifikaci genetické informace (web Pyrosequencing, 2013). První zmínky o této metodě jsou z roku 1987, kdy P. Nyren poprvé zdokumentoval, jak lze měřit aktivitu DNA polymerázy pomocí bioluminiscence (Pětrošová, H., 2009).

Metoda pyrosekvenování byla poprvé použita v praxi v roce 1998 a od této doby se metoda velmi rychle rozvíjí kupředu (Pětrošová, H., 2009). Nejmodernější přístroj od firmy Roche GS FLX Titanium XL+ umí v současné době (2013) nasekvenovat až 1 000 bp s přesností 99,997 % (web GS FLX+ System, 2013).

V našem experimentu jsme použili přístroj od firmy Roche GS Junior System, který umí nasekvenovat přibližně 400 bp (base pair = párů bazí) s přesností více jak 99%.

Metoda pyrosekvenování je založena na sekvenaci syntézou komplementární DNA. V systému jsou použity 4 enzymy – DNA polymeráza, ATP = adenosin trifosfát sulfuryláza, luciferáza a apyráza. Dále důležitou roli mají také další substráty: adenosin fosfosulfát (APS), d-luciferin a sekvenační produkt s příslušnými primery a Multiplex identifiers (MIDs). MID je skupina 10 nukleotidových bazí, které slouží k jednotlivé identifikaci každého vzorku (Pětrošová, H., 2009).

4.4.1 Postup sekvenace

Postup sekvenace je popsán dle manuálů pro přístroje GS Junior Titanium Series, 454 Sequencing, Roche.

4.4.1.1 Příprava DNA knihovny

Nejdříve se musí upravit fragmenty DNA na požadovanou délku. Pro menší vzorky např. malé nekódující RNA nebo amplikony PCR není potřeba tato fragmentace. U přístroje GS FLX/XLR 70 na délku o 300 až 800 bp.

Dále se navrhnu vhodné fúzní primery A a B. Každý primer musí obsahovat na 5' konci adaptor, za ním musí následovat klíčová sekvence 4 nukleotidů TCAG, dále MID složený z 10 nukleotidových bazí a na konci je templátová sekvence vzorku.

Adaptéry jsou důležité pro čištění, amplifikaci a sekvenaci. Adaptor B obsahuje na 5' konci biotinovou značku, která je určena k imobilizaci DNA knihovny na kuličky potažené streptavidinem.

Připravené fúzní primery se následně inkorporují do jednořetězcové ssDNA.

4.4.1.2 Emulzní PCR

V tomto kroku se upevní DNA knihovna na speciální kuličky pomocí reakce streptavidin-biotin. Na každou kuličku by se měl připojit jeden fragment DNA, ostatní kuličky obsahující více fragmentů nevstupují do dalšího kroku reakce. Proveďte se emulzní PCR, kdy vzorky jsou umístěny v prostředí olej-voda a každá kulička v kapičce oleje slouží jako mikroreaktor. Na konci emulzní PCR je celá kulička obalena fragmenty DNA. Soubor všech kuliček utváří knihovnu DNA využívanou v dalších krocích experimentu.

4.4.1.3 Sekvenování

V tomto kroku se přenesou kuličky z emulze na PicoTiterPlate destičku, která obsahuje mikrojamky, kdy do každé jamky může být umístěna pouze jedna kulička.

PicoTiterPlate je čip z optických vláken o velikosti 70 x 75 mm, ve kterém jsou jamky hluboké 55 µm a vzdálenost jednotlivých středů jamek činí 50 µm. Jedna jamka

má objem zhruba 75 pl a hustota jamek činí 480 jamek/mm². Do těchto jamek proto zapadají jenom kuličky o přesné velikosti. Tento čip je vyroben opakovaným prodlužováním a spojováním optických vláken do svazků s hexagonálním uspořádáním, následně je čip odříznut a jádro každého svazku vyleptáno. Na čipu můžeme nalézt až 1,6 milionů jamek, to poskytuje obrovské množství místa pro umístění vzorků a přitom ne všechny ve výsledku jsou obsazeny těmito kuličkami.

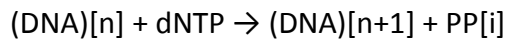
Po přidání kuliček na destičku následuje centrifugace, aby jednotlivé kuličky přesně zapadly do jamky. Dále se přidají další reagenty, které obsahují již zmiňované enzymy: DNA polymerázu, luciferázu a sulfurylázu, které jsou rovněž imobilizované na kuličkách, avšak o menším průměru. Konečná centrifugace způsobí usednutí kuliček s enzymy do jamek (Pětrošová, H., 2009).

Tato destička je v následujícím kroku umístěna do reakční komory, kde nad jamkami je vytvořen 300 μm vysoký sloupec, skrz který protékají reagenty při sekvenování. Naleptaná základna destičky je v optickém kontaktu díky druhému zobrazovacímu bloku optických vláken s CCD (z anglického „the charge-coupled device“ = CCD kamera) senzorem umožňujícím snímání emitovaných fotonů z každé jednotlivé jamky (Margulies a spol., 2005).

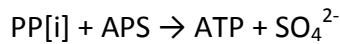
PicoTiterPlate destička se umístí do sekvenátoru. Princip sekvenace spočívá v postupném přidávání DNA polymerázy a jednotlivých nukleotidů. Nastává začleňování komplementárních nukleotidů k templátu pomocí DNA polymerázy a uvolnění pyrofosfátu. Ten slouží jako substrát pro ATP sulfurylázu a uvolní se ATP. ATP je pomocí luciferázy přeměněno na světelný signál, který je ve formě fotonů zachycen CCD kamerou. Začlenění jednoho nukleotidu do templátu DNA řetězce odpovídá uvolnění zhruba 10 000 fotonů. (Margulies a spol., 2005). Množství uvolněného světla je přímo úměrné začleněným nukleotidům. Pokud jsou v templátu umístěny za sebou více jak 4 stejné nukleotidy, tak tato přímá úměra neplatí a výsledky jsou nepřesné. Ukončení reakce je zahájeno přidáním apyrázy, která odstraní nadbytečné, nezačleněné nukleotidy a ATP. Pokud by se tak nestalo, mohly by být výsledky chybné, protože by docházelo k začleňování více různých nukleotidů v jedné reakci a vzniku falešně pozitivních světelných signálů (Pětrošová, H., 2009).

Podrobné reakce můžete vidět zde:

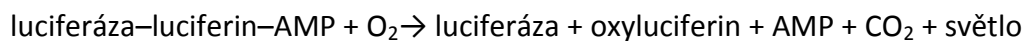
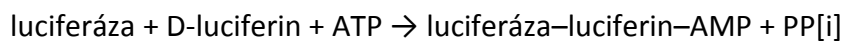
Přidání deoxynukleotid trifosfátu (dNTPs) k templátové DNA:



Uvolněný anorganický pyrofosfát slouží jako substrát pro ATP sulfurylázu, uvolňuje se ATP:



ATP je pomocí luciferázy přeměněno na světelný signál, který je zachycen CCD senzorem:



Apyráza odstraňuje nezapojené nukleotidy a zbylé ATP:



(Ahmadian, A., 2006)

4.4.1.4 **Vyhodnocování**

Počítač umí najednou zpracovat až 100 000 čtení z jednotlivých jamek. Surová data se většinou zpracovávají na přiloženém softwaru od firmy *Roche*, je však možno použít i jiný komerčně dostupný software. Nejprve software detekuje počáteční, klíčové 4 nukleotidy, které slouží jako standard. Jednotlivé záblesky jsou zpracovány ve formě „Flow“ grafů, kde můžeme vidět průběh sekvenace. Vyhodnocování je založeno na důkladné analýze získaných dat. Nejprve nastává seskupení stejných čtení. Následně se většinou přidává filtrační krok pro odstranění případných chyb. Většinou se odstraňují čtení, které jsou přečteny méně než 2-5x (Wiseman a spol., 2009). Následuje blastování = přiřazení sekvencí k již už známým sekvencím v genových bankách a analýza nově objevených sekvencí.

4.4.2 Přesnost a limitující faktory sekvenace

Limitující faktory sekvenace jsou způsobeny negativními a pozitivními posuny čtecího rámce. Jde zřejmě o důsledek exonukleázové aktivity DNA polymerázy ve směru 3'-5', která způsobuje neúplné začlenění nukleotidu do rostoucího řetězce a způsobí tak negativní posun čtecího rámce. Tyto chyby můžeme především nalézt v úsecích, kde je za sebou umístěno více stejných nukleotidů. Většinou nastává tato situace po 3-4 stejných nukleotidech = tzv. homopolymerní úseky. Pozitivní posuny čtecího rámce můžeme vidět tehdy, pokud funkce apyrázy je nedostačující (Pětrošová, H., 2009). Negativní posuny se vyskytují v 0,1 – 0,3 % a projevují se delecemi ve výsledné sekvenci. Pozitivní posuny můžeme nalézt častěji a nejčastěji se projevují insercemi (Margulies a spol., 2005) s četností 1 – 2 %.

Můžeme usoudit, že na chybovosti pyrosekvenování závisí také konkrétní typ dané sekvence, která má být nasekvenována. Velmi závisí na obsahu AT a CG. Sekvence, které obsahují více AT nebo CG, vykazují delší čtené úseky než sekvence, které mají vyrovnaný poměr AT k CG (Droege a spol., 2008).

Každá báze při pyrosekvenaci je zaznamenána emitováním fotonů a ty jsou čteny CCD kamerou. Tyto fotony jsou zaznamenány jako číslo Quality score (454 Sequencing System Software Manual v2.7). Když se hodnota Quality score pohybuje nad 30, tak je zaznamenána báze čtena ve vysoké kvalitě. Když se ale hodnota Quality score dostane pod 20 (25), znamená to že, GS Junior neuměl přesně zaznamenat danou bázi. Touto hodnotou Quality score umíme rozeznat báze, které jsou hůře čtené přístrojem GS Junior.

4.4.3 Využití

Metoda pyrosekvenování je metodou volby pro analýzu druhové diverzity velmi komplexních společenstev = metagenomů (například půdy, vody, sedimentu, mikroflóry střeva), (web Pyrosekvenace 454 Roche, 2013). Umožňuje nám odhalit celkovou genovou diverzitu obsaženou v daném prostředí během velmi krátké doby za relativně nízkou cenu. V Tabulka 1 - Srovnání metod sekvenace můžete vidět srovnání metody pyrosekvenování s běžnou Sangerovou metodou, Illumina a Solid metodou (web Pyrosekvenace 454 Roche, 2013).

Tabulka 1 - Srovnání metod sekvenace

	Cena / sekvenci (bez přípravy)	Délka v bazích	Přesnost
Klasická sekvenace	60 - 70 Kč	800 – 1000 b	99,9 %
Pyrosekvenování	0,36 – 0,50 Kč	až 1000 b	99.997 %
Illumina, Solid	0,001 – 0,003 Kč	do 150 b	99,9 %

Další využití pyrosekvenace je tzv. amplikonové sekvenování, kde vlastní sekvenaci předchází PCR zaměřená na určité geny prokaryot a eukaryot. Můžeme také analyzovat sekvence genomů, kdy je náhodně naštěpená genomová DNA sekvenována a sestavena. Analýza typu „shotgun“ umožňuje získat sekvenci veškerou DNA/RNA získanou ze vzorku.

4.4.4 Výhody a nevýhody metody

Pyrosekvenace umožňuje získat velkou taxonomickou hloubku identifikací sekvencí přítomných jen ve velmi malém množství, řádově několik setin procenta (web Pyrosekvenace 454 Roche, 2013). Tato metoda je jedinou alternativou pro tvorbu metagenomů. Je to také rychlá metoda v porovnání s ostatními sekvenačními metodami a i relativně levná v poměru k získané informaci (web Pyrosekvenace 454 Roche, 2013).

Pyrosekvenaci nemůžeme využít v každé situaci. Vždy musíme zhodnotit i ostatní metody a jejich výhody a nevýhody. Obtížně se konstruuje amplikony pomocí komplexních a dlouhých primerů. Poměr informace/cena stoupá s velikostí vzorku. Dále metoda je stále o trochu více chybnější než ostatní sekvenační metody (web Pyrosekvenace 454 Roche, 2013).

5 Experimentální část

5.1 Vzorky

Obdrželi jsme 15 vzorků RNA z opic druhu makak rhesus z buněk periferní krve, lymfatických orgánů a lymfatických tkání gastrointestinálního traktu z Yerkes National Primate Research Center, Emory University, Atlanta, GA, USA. Makakové byli záměrně infikováni virem SIV239 a jeden ze vzorků byl infikován virem SHIV clade C (Simian – Human Immunodeficiency Virus), konkrétně S12 – Rek11, a byl u nich sledován vývoj onemocnění v souvislosti s virovou náloží. Dle virové nálože, byla skupina makaků rozdělena do dvou skupin.

a) nízká virová nálož = N (low viral load = LVL)

b) vysoká virová nálož = V (high viral load = HVL)

Tabulka 2. Vzorky.

	Označení vzorku	Původ vzorku	Virová nálož N = nízká V = vysoká
S1	RSb8	Slezina	N
S2	RCv7	Slezina	N
S3	RKr11	Tříselné mízní uzliny	V
S4	RAI11	Periferní mononukleární buňky	V
S5	RZb9	Periferní mononukleární buňky	V
S6	KKf12	Slezina	V
S7	RTi12	Periferní mononukleární buňky	V
S8	RDu8	Periferní mononukleární buňky	N
S9	RJi8	Tříselné mízní uzliny	V
S10	RMi10	Slezina	V
S11	RFb9	Periferní mononukleární buňky	V
S12	REk11	Mezenterické mízní uzliny	N

S13	Rlz9	Periferní mononukleární buňky	V
S14	RMp10	Periferní mononukleární buňky	V
S15	RKy5	Periferní mononukleární buňky	N

V celém experimentu byly použity tyto ochranné pomůcky: ochranné brýle, laboratorní plášť, jednorázové latexové nebo vinylové rukavice.

5.2 RNA purifikace s použitím RNeasy Mini Kit od společnosti Qiagen

V našem experimentu využíváme RNeasy Mini Kit od společnosti *Qiagen* pro izolaci celkové RNA z buněk či tkání. Pro získání celkové RNA ze vzorku buněk či tkáně využíváme RNeasy technologii. Tato metoda je založena na používání speciálních silikonových membrán, které specificky vážou RNA.

Biologické vzorky buněk a tkání jsou nejdříve lyzovány a homogenizovány v přítomnosti vysoce denaturujícího guanidin-thiokyanátového pufru, který ihned inaktivuje všechny přítomné RNázy. K lyzovaným vzorkům se přidá ethanol k zajištění vhodných podmínek reakce a následuje přenesení biologického vzorku na silikonové membrány, na které se specificky váže RNA a zbylé nečistoty procházejí silikonovou membránou do odpadní zkumavky.

Máme na paměti, že RNA je velmi nestabilní a při nevhodných podmínkách nám RNA může změnit expresi genů. Proto ihned po izolaci, buňky zmrazíme v tekutém dusíku a skladujeme při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo můžeme buňky ponořit do roztoku, který zabezpečí stabilizaci RNA, v našem případě to je: RNAlater RNA stabilizátor.

5.2.1 Postup purifikace RNA

Naše vzorky byly skladovány v RLT Buffer při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. U části vzorků již byla RNA izolovaná a my jsme změřili jenom koncentraci RNA ve vzorcích. Druhá část vzorků byly homogenizované buňky, u těchto vzorků jsme začali krokem přidávání 70% ethanolu.

Podmínky: Celá purifikace byla prováděná na ledu, z důvodu nestability RNA, při laboratorní teplotě v rozmezí $20\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Materiál a chemikálie: RNeasy Mini Kit, *Qiagen*: RNeasy Mini Spin kolonky, sběrné zkumavky 1,5 ml, sběrné zkumavky 2,0 ml, Buffer RLT, Buffer RW1, Buffer RPE, RNase-Free water; špičky pro pipety *Eppendorf*, ethanol 70 %.

Přístroje: pipety *Eppendorf*, stolní minicentrifuga *Eppendorf* Minispin Plus.

Rozmrazíme homogenizované vzorky na ledu. Po rozmrazení vzorků, do každého pipetujeme 1 objem 70% ethanolu, promícháme důkladně pipetou (můžou se objevit případné precipitace, které ale neovlivní reakci). Z každého vzorku přeneseme nanejvýš 700 µl do RNeasy spin kolonek umístěných ve 2 ml sběrných zkumavkách. Kolonky důkladně uzavřeme a centrifugujeme 15 s na >10 000 rpm, následně vyhodíme obsah ze sběrných zkumavek a sběrné zkumavky opětovně použijeme. Přidáme 700 µl Buffer RW1 do RNeasy spin kolonek, důkladně uzavřeme kolonky, centrifugujeme 15 s na >10 000 rpm, následně vyhodíme obsah ze sběrných zkumavek a sběrné zkumavky opětovně použijeme. Přidáme 500 µl Buffer RPE do RNeasy spin kolonek, důkladně uzavřeme kolonky, centrifugujeme na 15 s při >10 000 rpm, následně vyhodíme obsah ze sběrných zkumavek a sběrné zkumavky opětovně použijeme. Opětovně přidáme 500 µl Buffer RPE do RNeasy spin kolonek, důkladně uzavřeme kolonky, centrifugujeme na 2 min při >10 000 rpm. RNeasy spin kolonky umístíme do nových sběrných zkumavek o objemu 2 ml. Staré sběrné zkumavky i s obsahem vyhodíme. Kolonky v nových zkumavkách centrifugujeme na maximální rychlost 1 min. RNeasy spin kolonky umístíme do nových 1,5 ml sběrných zkumavek, pipetujeme velice opatrně a přesně doprostřed silikonové membrány 30-50 µl vody bez ribonukleáz (nedotýkáme se špičkou silikonové membrány!), uzavřeme kolonky a centrifugujeme 1 min na 8 000 rpm. RNeasy kolonky vyhodíme a sběrné zkumavky 1,5 ml s izolovanou RNA skladujeme při -70 °C až do dalšího použití RNA.

5.3 Stanovení koncentrace a čistoty izolovaných nukleových kyselin

Pro stanovení koncentrace nukleových kyselin se používají v praxi dvě metody. První metoda je založena na faktu, že nukleové kyseliny absorbují ultrafialové světlo (UV). Přičemž, čím je nukleových kyselin přítomno ve vzorku více, tím více absorbují UV-světla.

Spektrofotometr je přístroj, který se používá pro měření těchto absorbancí. Spektrofotometr vysílá monochromatické UV-světlo o hodnotě 260 nm. Uvnitř přístroje je umístěné čidlo, které měří, kolik % vysílaného světla absorbuje vzorek. V případě plně automatizovaného přístroje nám přístroj zobrazí hodnotu koncentrace vzorku spočítanou dle Lambert-Beerova zákona ihned po naměření.

Další parametr, který nás zajímá, je hodnota čistoty vzorku. Počítá se jako poměr absorbancí 260 nm/ 280 nm, kde výsledný poměr absorbancí u DNA by měl být kolem hodnoty 1,8 a u RNA v rozmezí 1,8-2. Pokud je hodnota mimo uvedené optimum, tak může vzorek obsahovat nečistoty. Lze říci, že čím více se hodnota odchyluje od optima, tím více je vzorek kontaminován bílkovinami, jinou genetickou informací nebo nečistotami z čištění (např. fenolem).

Druhou metodou pro měření koncentrace nukleových kyselin je měření koncentrace nukleových kyselin pomocí fluorescenčních barviv.

5.3.1 Postup stanování koncentrace a čistoty RNA

Podmínky: laboratorní teplota 20-25 °C.

Materiál a chemikálie: špičky *Eppendorf*, voda bez ribonukleáz.

Přístroje: pipeta *Eppendorf*, nanophotometr *Impen*.

Přístroj nastavíme dle vzorku a koncentrace, kterou očekáváme (jelikož naše vzorky obsahují RNA). Změříme „blank“ s použitím roztoku, do kterého jsme dávali naši genetickou informaci (tzn. vody bez ribonukleáz). Pipetujeme přibližně 3-5 µl roztoku na čtecí zařízení, přikryjeme filtrem a zmáčkneme tlačítko „blank“. Filtr odstraníme a kouskem vaty nebo ubrousku otřeme filtr a čtecí zařízení. Pipetujeme 3-5 µl rozmraženého vzorku genetické informace na čtecí zařízení, přikryjeme filtrem a zmáčkneme start. Zapišeme hodnotu koncentrace a čistoty. Vyhodnotíme výsledky koncentrace a čistoty.

5.4 Příprava cDNA pomocí reverzní transkriptázy

Centrální dogma molekulární biologie nám říká, že RNA vzniká na podkladě DNA. Reverzní transkriptáza je enzym, který tuto teorii vyvrací. Tento enzym katalyzuje

přepis genetické informace z RNA do DNA. V praxi můžeme tento enzym nalézt u virů, jež přepisují svojí genetickou do genetické informace hostitele. V molekulární biologii používáme reverzní transkriptázu pro přepis genetické informace zapsané v RNA do DNA, výsledný produkt se nazývá cDNA (copy DNA = kopie DNA).

Připravujeme cDNA z RNA templátu pomocí reverzní transkriptázy. Použili jsme sadu Tetro cDNA Synthesis Kit od společnosti *Bioline* (Německo). Postupovali jsme dle přiloženého protokolu.

5.4.1 Postup přípravy cDNA

Podmínky: Vzorky a reagentie musí být umístěny na ledu při laboratorní teplotě v rozmezí 20-25 °C.

Materiál a chemikálie: zkumavky 1,5 ml, špičky *Eppendorf*, Tetro cDNA Synthesis Kit, *Bioline*: 5x RT pufr, reverzní transkriptáza (200u/μl), RNase inhibitor (10u/μl), dNTP mix 10 mM, Oligo (dT)₁₈ primer mix, random hexamer primer mix, DEPC (Diethylpyrocarbonate – inaktivuje Rnázy) voda.

Přístroje: termomixér – Thermomixer® comfort *Eppendorf*, pipety – *Eppendorf*, stolní minicentrifuga *Eppendorf* Minispin Plus.

Reagentie vyndáme z mrazicího boxu, kde byly uskladněny při -70 °C a necháme je volně rozmrznout na ledu, vortexujeme je a centrifugujeme těsně před použitím. Smícháme 5 μl vzorku RNA + 1 μl Oligo (dT)₁₈ primer mix + 1 μl dNTP mix + 3 μl DEPC vody. Připravenou směs inkubujeme 5 min na 70 °C na termomixéru a poté ihned zchladíme na ledu, alespoň na 1 min. Mezitím si připravíme další směs obsahující 4 μl 5x RT pufru + 1 μl RNase inhibitor + 1 μl tetro reverzní transkriptázy a doplníme na 10 μl vodou DEPC. Smícháme obě připravené směsi, důkladně je promícháme a inkubujeme 30 min na 45 °C na termomixéru, dále 5 min na 85 °C, ochladíme na ledu. Připravenou cDNA skladujeme při -20 °C.

5.5 Polymerázová řetězová reakce

Získanou cDNA ze vzorků amplifikujeme pomocí PCR (= polymerázová řetězová reakce). Použijeme k tomu již připravenou sadu reagensů, kterou vyrobila firma *Roche*, FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack.

Tato sada obsahuje modifikovanou Taq polymerázu - FastStart High Fidelity Taq DNA polymerázu a termostabilní protein. Tento protein zajišťuje následnou korekturu vytvořených amplikonů, přičemž ale sám nemá polymerázovou aktivitu. Polymerázu a protein aktivujeme zahřátím na 95 °C. Polymeráza a protein vytvářejí ideální kombinaci pro vytvoření amplikonů s minimální chybovostí. Oproti Taq polymeráze je tato chybovost snížena přibližně 4x. Tato sada pro PCR se výhodně užívá pro vzorky, které obsahují minimální množství DNA nebo kde potřebujeme dosáhnout vysoké preciznosti a bezchybnosti vytvořených amplikonů. V našem případě jsme výhodně využili této vlastnosti.

Navrhli jsme fúzní primery, které obsahují na 5' konci adaptor, následuje klíčová sekvence TCAG, sekvence MID a templátová sekvence. Tyto fúzní primery jsme nechali vyrobit firmou *Generi Biotech*. Otestovali jsme ideální teplotu pro nasednutí primerů na templátovou DNA pomocí gradientové PCR.

5.5.1 Gradientová PCR

Primery nasedají na templát při určité teplotě. Tuto teplotu si umíme spočítat dle vzorce. V praxi se ale stává, že vypočtená teplota není ideální a primery specificky nenedávají na templát. Ke zjištění vhodné teploty jsme se rozhodli provést gradientovou PCR. Zvolili jsme rozmezí teplot ± 10 °C od ideální vypočtené teploty. Po gradientové PCR následuje kontrola produktů a volba optimální teploty. My jsme použili ke kontrole gelovou elektroforézu.

5.5.1.1 *Gradientovou PCR jsme prováděli na jiných vzorcích, než byly nakonec použity pro náš experiment. Postup Gradientové PCR*

Vzorky:

- Rji8, Ing LN, SIV 239 HVL, koncentrace 186,1 ng/nl

- RDu8, Slezina, SIV 239 LVL LTNP, koncentrace 140,5 ng/nl

Použité primery:

forward primer - *836Z0 KIR-MID1-MMO1F

sekvence forward primeru 5' – CGT ATC GCC TCC CTC GCG CCA TCA GAC GAG
TGC GTA GGT CCC CTG GTG AAA TCA G - 3'

reverse primer - *836Z1 KIR-MID1-MMO1R

sekvence reverse primeru 5' – CTA TGC TTG CCA GCC CGC TCA GAC GAG TGC
GTC TTG GTT CAG TGG GTG AAG G - 3'

Podmínky: Pracujeme při laboratorní teplotě v rozmezí 20-25 °C.

Materiál a chemikálie: zkumavky 1,5 ml *Eppendorf*, PCR stripy *Neptune™*, špičky *Eppendorf*, FastStart PCR Master *Roche*: Master mix 2x koncentrovaný, gradientová PCR voda.

Přístroje: termocyklér – *Mastercycler®* pro *Eppendorf*, pipety *Eppendorf*.

Pro každý vzorek si připravíme 12 zkumavek. Do každé zkumavky dáme směs: 25 µl Master Mix + 5 µl forward primeru + 5µl reverse primeru + 14 µl gradientové PCR vody + 1 µl vzorku. Nastavení gradientové PCR je uvedeno v tabulce č. 3.

Tabulka 3 – Nastavení termocykléru pro gradientovou PCR

	Počet cyklů	Čas	Teplota
Počáteční denaturace	1	5 min	95 °C
Denaturace	30	30 s	95 °C
Navázání primerů		30 s	41,9 – 62,1 °C
Elongace		1 min	72 °C
Konečná elongace	1	5 min	72 °C
Chlazení	Neomezený čas		4 °C

Tabulka 4 – Tabulka s jednotlivými teplotami ve sloupcích pro gradientovou PCR

sloupec	teplota	sloupec	teplota
1.	41,9 °C	7.	53,1 °C
2.	42,4 °C	8.	55,8 °C
3.	43,6 °C	9.	58,1 °C
4.	45,5 °C	10.	60,1 °C
5.	47,8 °C	11.	61,5 °C
6.	50,4 °C	12.	62,1 °C

5.5.1.2 *Vyhodnocení gradientové PCR pomocí gelové elektroforézy*

Podmínky: Pracujeme při laboratorní teplotě v rozmezí 20-25 °C.

Materiál a chemikálie: skleněná kádinka 200 ml, odměrný válec 1000 ml, nerezová lžička, parafínový papír, špičky *Eppendorf*, TAE Buffer 50x *SERVA*, Agarose *SERVA*, Gel Red Nucleic acid 10 000x *Biotium*, 100 bp Ladder *Invitrogen™*, Blue juice 10x *Invitrogen™*, deionizovaná voda.

Přístroje: pipety *Eppendorf*, mikrovlnná trouba, analytické váhy *PowerPac™*, Basic Power Supply *Bio Rad*, Mini-Sub® Cell GT Systems *Bio Rad*, transiluminátor *Vilber Lourmat*.

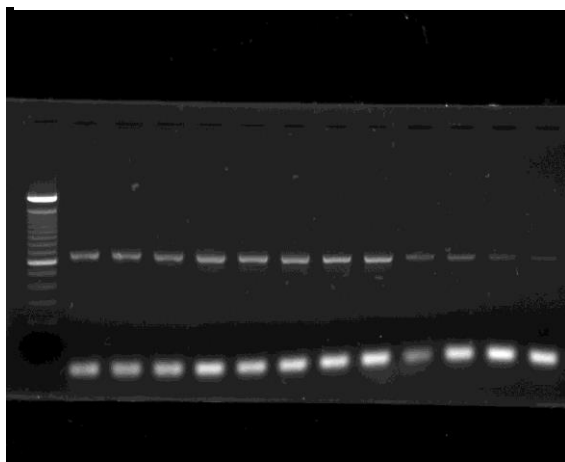
Postup: Připravíme si 1,5 % agarosový gel smícháním 1,5 g agarosy s 98,5 g TAE Buffer 1x. Agarosu opatrně zahříváním rozpustíme v mikrovlnné troubě. Přibližně když se směs agarosy ochladí na 50 °C, přidáme 3 µl Gel Red Nucleic acid 10 000x a vlijeme do připravené nádoby pro tvorbu gelu. Po ztuhnutí gelu (20-30 min), vyjmeme gel a přeneseme ho do nádoby na gelovou elektroforézu. Gel umístíme tak, aby jamky v gelu byly blíže negativnímu pólu. Do této nádoby vlijeme TAE Buffer 1x po značku. Do 1. jamky v gelu pipetujeme 5 µl 100 bp Ladder *Invitrogen™* a do dalších jamek pipetujeme vzorky dle následujícího postupu:

- na parafilm pipetujeme odděleně 1 µl Blue juice 10x pro každý vzorek

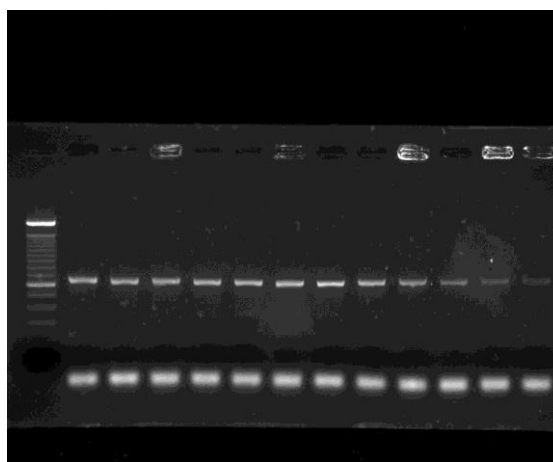
- k jednotlivým kapkám Blue juice 10x přidáme 5 μ l vzorku, důkladně promícháme a pipetujeme do jamek v gelu

Po napipetování všech vzorků zapneme přístroj PowerPac™ Basic Power Supply, nastavíme 100 V, 400 mA a čas 40 min. Po proběhnutí elektroforézy vzorky na gelu kontrolujeme pomocí transiluminátoru BIO VISION.

Obrázek 1 - Kontrola gradientové PCR



Obrázek 2 - Kontrola gradientové PCR



Dle výsledků z elektroforézy jsme zjistili, že ideální teplota pro nasedání primerů je 53,1 °C.

5.5.2 Postup PCR

Použili jsme kombinaci 4 MID, které nám následně budou sloužit pro identifikaci jednotlivých vzorků. Jednotlivé kombinace použitých MID jsou přiloženy v Tabulka 5 – Vzorky s jednotlivými primery s MID.

Postupovali jsme dle přiloženého protokolu FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack, Roche s malými úpravami. PCR jsme dělali pro každý vzorek 2x, z důvodu získání většího výtěžku PCR reakce.

Podmínky: Vzorky a reagentie musí být umístěny na ledu při laboratorní teplotě v rozmezí 20-25 °C.

Materiál a chemikálie: zkumavky 1,5 ml, špičky – Eppendorf, PCR stripy Neptune™, FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack, Roche: FastStart High Fidelity enzymová směs 5 U/ μ l, FastStart High Fidelity reakční pufr 10x s MgCl₂ 18mM, PCR Grade nukleotidový mix 10mM.

Přístroje: termocyklér – Mastercycler® pro *Eppendorf*, pipety *Eppendorf*, stolní minitřepačka *Velp Scientifica*.

Sekvence forward primeru:

MHC-MID1-MM01F

5' - CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGAGTGCCTGCTACGTGGACGACACG – 3'

MHC-MID2-MM01F

5' - CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGCTCGACAGCTACGTGGACGACACG – 3'

MHC-MID3-MM01F

5' - CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACGCACTCGCTACGTGGACGACACG – 3'

MHC-MID4-MM01F

5' - CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCACTGTAGGCTACGTGGACGACACG – 3'

Sekvence reverse primeru:

MHC-MID1-MM01R

5' - CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGCCTTCGCTCTGGTTGTAGTAGC – 3'

MHC-MID2-MM01R

5' - CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACATCGCTCTGGTTGTAGTAGC – 3'

MHC-MID3-MM01R

5' - CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGACGCACTCTCGCTCTGGTTGTAGTAGC – 3'

MHC-MID4-MM01R

5' - CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCACTGTAGTCGCTCTGGTTGTAGTAGC – 3'

Zelená – adaptor, oranžová – klíčová sekvence pro rozpoznávání, červená – MID, modrá – primer.

Tabulka 5 – Vzorky s jednotlivými primery s MID

č. vzorku	Vzorek (původ vzorku)	Sekvence forward primeru	Sekvence reverse primeru
S1	RSb8 (Slezina)	MHC-MID1-MM01F	MHC-MID1-MM01R
S2	RCv7 (Slezina)	MHC-MID1-MM01F	MHC-MID2-MM01R
S3	RKr11 (IngLN)	MHC-MID1-MM01F	MHC-MID3-MM01R
S4	RAI11 (PBMC)	MHC-MID1-MM01F	MHC-MID4-MM01R
S5	RZb9 (PBMC)	MHC-MID2-MM01F	MHC-MID1-MM01R
S6	RKF12 (Slezina)	MHC-MID2-MM01F	MHC-MID2-MM01R
S7	RTi12 (PBMC)	MHC-MID2-MM01F	MHC-MID3-MM01R
S8	RDu8 (PBMC)	MHC-MID2-MM01F	MHC-MID4-MM01R
S9	RJi8 (IngLN)	MHC-MID3-MM01F	MHC-MID1-MM01R
S10	RMi10 (Slezina)	MHC-MID3-MM01F	MHC-MID2-MM01R
S11	RFb9 (PBMC)	MHC-MID3-MM01F	MHC-MID3-MM01R
S12	REk11 (MesLN)	MHC-MID3-MM01F	MHC-MID4-MM01R
S13	RIz9 (PBMC)	MHC-MID4-MM01F	MHC-MID1-MM01R
S14	RMp10 (PBMC)	MHC-MID4-MM01F	MHC-MID2-MM01R
S15	RKy5 (PBMC)	MHC-MID4-MM01F	MHC-MID3-MM01R

Reagencie a vzorky cDNA rozmrazíme na ledu, těsně před použitím reagencie vortexujeme a centrifugujeme. Zředíme si primery na koncentraci 0,1 mM dle pokynů uvedených v příloženém protokolu. Do reakce si připravíme následně koncentraci 4 μ M tzn., vezmeme 4 μ l roztoku primerů a doplníme vodou na objem 100 μ l. Na každou

PCR reakci o celkovém objemu 50 μl pipetujeme do stripů dle následující tabulky
 Tabulka 6 – Tabulka komponent pro PCR reakci.

Tabulka 6 – Tabulka komponent pro PCR reakci

Komponenty	Objem
voda PCR Grade	18,75 μl
FastStart High Fidelity reakční pufr 10x s MgCl_2 18mM	2,5 μl
PCR Grade nukleotidový mix 10 mM	0,5 μl
forward primer (10 μM)	2,5 μl
reverse primer (10 μM)	2,5 μl
FastStart High Fidelity enzymová směs 5 U/ μl	0,25 μl
templátová cDNA	1 μl

Směs ve stripech promícháme, zároveň si připravíme negativní kontrolu, která obsahuje vše kromě vzorku DNA. Vzorky umístíme na termocyklér a nastavíme PCR program dle následující tabulky Tabulka 7 – Nastavení termocykléru pro PCR.

Tabulka 7 – Nastavení termocykléru pro PCR

	Počet cyklů	Čas	Teplota
Počáteční denaturace	1	5 min	95 °C
Denaturace	30	30 s	95 °C
Navázání primerů		30 s	53,1 °C
Elongace		1 min	72 °C
Konečná elongace	1	5 min	72 °C
Chlazení	Neomezený čas		4 °C

Po PCR reakci můžeme vzorky uchovávat zmražené pro další použití při -18 °C.

5.6 **Kontrola produktů pomocí gelové elektroforézy**

Postupujeme obdobně, jako jsme postupovali u kapitoly: Vyhodnocení gradientové PCR pomocí gelové elektroforézy.

Po ověření správné velikosti produktů, pokračujeme dále v čistění produktů.

5.7 **Gelová elektroforéza s GTG agarosou**

V tomto kroku používáme agarosu SeaKem® GTG™ Agarose. GTG agarosa je vhodná pro následné získávání genetické informace z gelu.

Podmínky: Pracujeme při laboratorní teplotě v rozmezí 20-25 °C.

Materiál a chemikálie: TAE Buffer 50x *SERVA*, SeaKem® GTG™ Agarose *Lonza*, Gel Red Nucleic acid 10 000x *Biotium*, 100 bp Ladder *Invitrogen™*, Blue juice 10x *Invitrogen™*, kádinka 100 ml, odměrný válec 100 ml, nerezová lžička, parafínový papír, špičky – *Eppendorf*.

Přístroje: analytické váhy, PowerPac Basic Supply *Bio Rad*, mikrovlnná trouba, pipety *Eppendorf*, transiluminátor *Vilber Lourmat*.

Připravíme si 1% roztok GTG agarosy smícháním 0,5 g GTG agarosy s 49,5 ml TAE Buffer 1x. Směs důkladně zahřátím rozpustíme a promícháme, při ochladnutí na teplotu cca 50 °C přidáme 3 µl Gel Red Nucleic acid 10 000x, promícháme a vlijeme do připravené nádoby na tvorbu gelu. Po ztuhnutí gelu (20-30 min) gel přeneseme do nádoby na gelovou elektroforézu, přilijeme TAE Buffer 1x po značku. Do 1. jamky v gelu pipetujeme 3 µl 100 bp Ladder *Invitrogen™*. Máme 2 zkumavky od každého vzorku, které si smícháme dohromady a přidáme 10 µl Blue juice 10x do zkumavky, tzn. výsledný objem, který nanášíme do jamek na gelu je cca 100 µl. Zapneme PowerPac Basic Supply a nastavíme 100 V, 400 mA a 35 min. Po skončení elektroforézy, gel zkontrolujeme na transiluminátoru *Vilber Lourmat*.

5.8 Izolace a čištění cDNA z GTG agarosy

Vzorky cDNA po PCR reakci jsme si nanесли na GTG gel a provedli elektroforézu. Vzorky se nám rozdělily na gelu podle molekulových hmotností a my můžeme přesně lokalizovat námi požadovanou cDNA. Tuto cDNA si vyřízneme skalpelem a následně přečistíme od nečistot z PCR a gelu pomocí sady QIAquick Gel Extraction Kit od společnosti *Qiagen*®. Tato sada umí izolovat DNA o velikosti 70bp – 10kbp. Během reakce musíme zajistit pH menší nebo rovno 7,5, abychom zajistili dostatečnou účinnost eluce cDNA. Žlutá barva QG pufru indikuje toto rozmezí pH. Pokud máme barvu směsi červenou nebo oranžovou, acidifikujeme směs s použitím natrium acetátu.

Podmínky: Pracujeme při laboratorní teplotě v rozmezí 20-25 °C, vzorky musí být umístěny na ledu. Centrifugujeme vždy za laboratorní teploty při 13 000 rpm.

Materiál a chemikálie: průhledné zkumavky 2 ml, zkumavky 1,5 ml *Eppendorf*, 15 ml zkumavky, špičky *Eppendorf*, skalpel, natrium acetát 3M, QIAquick Gel Extraction Kit *Qiagen*®: QIAquick spin kolonky, sběrné zkumavky 2 ml, Buffer QG, Buffer PE, Bufferr EB.

Přístroje: termomixér – Thermomixer® comfort *Eppendorf*, pipety *Eppendorf*, stolní minicentrifuga *Eppendorf* Minispin Plus, transiluminátor *Vilber Lourmat*, analytické váhy, stolní minitřepačka *Velp Scientifica*.

Postup izolace a čištění z GTG gelu:

Skalpelem vyřízneme z gelu konkrétní proužek, kde se nachází námi stanovovaná cDNA (snažíme se zajistit vyříznutí kompletní DNA, ale s co nejmenším objemem nadbytečného gelu). Umístění cDNA vidíme pomocí transluminátoru. Zvážíme vyříznutý proužek gelu v průhledné zkumavce 1,5 ml, přidáme 3x více QG Buffer (maximální hmotnost gelu v 1 zkumavce je 400 mg). Inkubujeme při 50 °C na 10 min v termomixéru až do úplného rozpuštění gelu (průběžně můžeme vortexovat, v případě potřeby, inkubujeme déle). V případě, že hmotnost gelu je větší než 400 mg, přidáme nejdříve QG Buffer do celkového objemu 1,5 ml, následně převedeme rozpuštěný gel do 15 ml zkumavky a přidáme zbytek požadovaného objemu QG Buffer a promícháme. Zkontrolujeme barvu směsi, v případě jiné barvy než žluté, přidáváme 10 µl 3M natrium acetátu a vortexujeme. Přidáme 1 objem isopropanolu než je

vyříznutý proužek gelu a promícháme. Umístíme QIAquick spin kolonky do 2 ml sběrných zkumavek. Směs rozpuštěného gelu pipetujeme do QIAquick spin kolonek (maximálně však 800 µl), centrifugujeme 1 min, v případě většího objemu jednoduše pipetujeme znovu a centrifugujeme. Vyhodíme protečený odpad a sběrnou zkumavku opětovně použijeme. Přidáme 0,5 ml Buffer QG do QIAquick spin kolonky a centrifugujeme 1 min. Přidáme 0,75 ml Buffer PE do QIAquick spin kolonky a centrifugujeme 1 min. Vyhodíme protečený odpad a centrifugujeme QIAquick spin kolonky 1 min. QIAquick spin kolonky umístíme do nových 1,5 ml zkumavek. K eluci cDNA přidáme 25 µl EB Buffer nebo vody o pH 7,0-8,5 přímo na střed kolonky a centrifugujeme 1 min. Přečištěnou cDNA uchováváme při -20 °C.

5.9 Kvantifikace DNA pomocí Quant-It™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen)

Podmínky: Pracujeme při laboratorní teplotě v rozmezí 20-25 °C, vzorky musí být umístěny na ledu. Centrifugujeme vždy za laboratorní teploty při 13 000 rpm.

Materiál a chemikálie: zkumavky *Eppendorf* 1,5 ml, 15 ml, špičky *Eppendorf*, Quant-It™ PicoGreen® dsDNA *Invitrogen*: 20x TE pufr, 200x Quant-iT PicoGreen® dsDNA, Lambda DNA standard, voda o molekulární kvalitě.

Přístroje: florimetr – *DQ 315*, CUVETTE, GL, BORO - MINICELL, 400PK, *Hoefler*, pipety *Eppendorf*, stolní minitřepačka *Velp Scientifica*.

Postup: Připravíme si 1x naředěný TE pufr naředěním 20x zásobního pufru, na přípravu 5 ml tohoto roztoku pipetujeme do 15 ml zkumavky:

- 0,25 ml TE 20x + 4,75 ml voda o molekulární kvalitě
- důkladně promísíme

Připravíme si pracovní roztok PicoGreen® 200x naředěním zásobního roztoku, tento roztok se musí připravovat vždy nový v den experimentu. Tento roztok je velmi viskózní za nízké teploty, proto je nutné ho vytáhnout z lednice asi 30 min – 1 hod před započítím pokusu a nesmí být vystaven slunečnímu záření. Pro přípravu 5 ml pipetujeme do 15 ml zkumavky:

- 0,25 ml TE 20x + 4,75 ml voda o molekulární kvalitě + 0,025 ml PicoGreen® 200x.
- směs důkladně promícháme a chráníme před slunečním zářením

Připravíme si sadu standardů pro kalibrační křivku. Nachystáme si 8 zkumavek o objemu 1,5 ml a označíme je 1-8, 1 = největší koncentrace cDNA, 8 = žádná cDNA. Do zkumavky č. 1 pipetujeme 99 µl 1x TE pufru a 1µl Lambda DNA standardu. Do zkumavek 2-8 napipetujeme 50 µl 1xTE pufru. Důkladně vortexujeme zkumavku č. 1 a převedeme z ní 50 µl do zkumavky č. 2, opět důkladně vortexujeme a převedeme 50 µl ze zkumavky č. 2 do zkumavky č. 3, tenhle postup opakujeme i s dalšími zkumavkami kromě zkumavky č. 8, která nám slouží jako negativní kontrola. Do zkumavek 1-8 přidáme do každé 50 µl naředěného roztoku PicoGreen® 1x.

Příprava vzorků:

Označíme si potřebný počet nových zkumavek o objemu 1,5 ml. Do zkumavek pipetujeme 99 µl 1x TE pufru a přidáme 1µl vzorku DNA. Přidáme 100 µl naředěného 1x PicoGreen® a vortexujeme.

Měření standardů a vzorků:

Využíváme fluorimetr a 200 µl skleněné kyvety. Do skleněných kyvet pipetujeme více než 50 µl roztoků z koncentrační řady. Následně změříme koncentraci v koncentrační řadě na přístroji DQ 315, cuvette, GL, Boro – minicell 400 PK, *Hoefler*. Začneme zkumavkou číslo 8, která nám slouží jako negativní kontrola a dále pokračujeme zkumavkami číslo 1-7, tímto vytvoříme kalibrační křivku.

Vzorky změříme obdobným způsobem. Do skleněné kyvety pipetujeme více jak 50 µl vzorku.

5.10 Výpočet koncentrace cDNA pomocí Microsoft Excel 2010

Nejdříve si spočítáme hodnotu rovnici regrese dle hodnot, které nám vyšly při měření kalibrační křivky.

Rovnice regrese je $y = ax + b$, kde y značí hodnotu fluorescence, a je vypočítaná hodnota sklonu křivky, x je hodnota koncentrace a b je konstanta.

Vypočítaná rovnice regrese: $f(y) = 248,23x - 0,7595$, $R^2 = 0,9998$

Když si z rovnice regrese vyjádříme x : $x = (y - b)/a$, tak můžeme dopočítat hodnotu koncentrace pro naše vzorky.

$$\text{Koncentrace} = (\text{fluorescence} - (-0,7595))/248,23$$

Dále můžeme dopočítat počet molekul v 1 μl dle vzorce:

$$\text{Počet molekul v 1 } \mu\text{l} = (\text{koncentrace} \times 100 \times 6,022 \times 10^{23}) / (656,6 \times 10^9 \times \text{délka cDNA v bp}).$$

Dále potřebujeme vzorky naředit s TE pufrém na koncentraci 10^9 kopií v 1 μl .

$$\text{Množství přidaného TE pufru 1x} = (\text{počet molekul v 1 } \mu\text{l} / 10^9) - 1$$

Tabulka 8 – Kalibrační křivka pro výpočet koncentrace cDNA.

Kapilára (kyveta)	Koncentrace standardu ng/ μl	Fluorescence
1	1	249
2	0,5	122,1
3	0,25	60,2
4	0,13	29,52
5	0,06	14,76
6	0,03	7,52
7	0,02	3,69
8	0	0

Tabulka 9 – Tabulka se vzorky, naměřenou fluorescence, vypočítaným počtem molekul a objem přidávaného TE pufru 1x.

Č. vzorku	Koncentrace ng/ul	fluorescence	Délka cDNA v bp	Počet molekul v μl	μl TE 1x
S1	0,304	74,74	260	1,07289 ^{^11}	106
S2	0,257	63,01	260	90620252792	90
S3	0,280	68,68	260	98677660069	98
S4	0,311	76,39	260	1,09634 ^{^11}	109
S5	0,331	81,41	260	1,16768 ^{^11}	116
S6	0,302	74,26	260	1,06607 ^{^11}	106
S7	0,315	77,54	260	1,11268 ^{^11}	110
S8	0,287	70,45	260	1,01193 ^{^11}	101
S9	0,280	68,77	260	98805555423	98
S10	0,332	81,73	260	1,17222 ^{^11}	116
S11	0,130	31,32	260	45586877731	45
S12	0,239	58,55	260	84282327492	83
S13	0,247	60,39	260	86897076943	86
S14	0,197	47,73	260	68906463870	68
S15	0,203	49,54	260	71478581537	71

5.11 Emulzní PCR amplifikace

Postupovali jsme dle protokolu: emPCR Amplification method manual – Lib-A, GS Junior Titanium Series, March 2012.

Podmínky: Pracujeme při laboratorní teplotě v rozmezí 15 – 25 °C.

Materiál a chemikálie: GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-A), 454 Sequencing, Roche:

- Bead Recovery Reagents: Annealing Buffer, Enhancing Buffer, Enrichment Beads
- emPCR Reagents, Lib-A: Additive, Amp Mix, Mock Mix, Enzyme Mix, Amp Primer A, Enrich Primer A, Capture Beads A, Seq Primer A, Amp Primer B, Capture Beads B, Enrich Primer B, Seq Primer B, Wash Buffer, PPIase, voda o molekulární kvalitě
- Oil and Breaking Kit: Emulsion Oil, Stirring Tube, Low Binding Tube, Custom Conical Cap, Surgical Tubing, Transpette, Transpette Adapter

Další pomůcky a chemikálie: špičky *Eppendorf*, isopropanol *Fisher Scientific*, ethanol 99,5%, NaOH 10 N *Fisher Scientific*, voda o molekulární kvalitě, PCR stripy *Neptune™*.

Přístroje: pipety *Eppendorf*, termomixér – Thermomixer® comfort *Eppendorf*, multikanálová pipeta *Eppendorf*, stolní minicentrifuga *Eppendorf* Minispin Plus, centrifuga CL31R Multispeed *Thermo Scientific*, stolní minitřepačka *Velp Scientifica*, vodní lázeň *Julabo* TW 12, Ultra Turrax Tube Drive (UTTD) zařízení IKA, Combitip *Eppendorf*, *DynaMag™-2* Magnet, *Labquake™* Tube Shaker/Rotators.

5.11.1 Příprava reagensů

Z emPCR Reagents box vytáhneme a necháme roztát komponenty při pokojové teplotě kromě Enzyme mix a PPIase, které musí být umístěny v -15 °C až -25 °C. Po rozmrznutí komponent je vortexujeme na 5 s. Zahřejeme zkumavku s Additive na 55 °C na 5 min tak, aby se nám vše rozpustilo. Kdyby se nerozpustily všechny precipitáty, tak zkumavku centrifugujeme a použijeme supernatant. Následně všechny komponenty (i enzymy) dáme na centrifugu a centrifugujeme na 10 s. Enzymy vrátíme do mrazicího boxu na -15 °C až -25 °C, ostatní reagensie necháme při pokojové teplotě.

5.11.2 Příprava Mock mix a Pre-Emulsion

Důkladně vortexujeme zkumavku s Emulsion Oil na 10 s na maximální rychlost a vylijeme vnitřní obsah do Turrax stirring zkumavky. Připravíme si 1 x Mock mix smícháním: 430 μ l Mock mix, 1,72 ml vody o molekulární biologické kvalitě a směs vortexuje. Přidáme 2,0 ml 1 x Mock mix připraveného v předchozím kroku do Turrax stirring zkumavky obsahující emulzní olej. Nastavíme UTDD zařízení na 4000 rpm na 5 min. Umístíme stirring zkumavky do UTDD a zapneme UTDD.

Příprava Live Amp Mixes A a B

- příprava Live Amp mix A, smícháme ve zkumavce dle tabulky Tabulka 10
– Příprava Live Amp mix A:

Tabulka 10 – Příprava Live Amp mix A

Reagencie	Objem [μ l]
voda molekulární biologické třídy	205
Additive	260
Amp Mix	135
Amp primer A	40
Enzyme mix	35
PPiase	1
Celkem	676

- příprava Live Amp mix B, smícháme ve zkumavce dle tabulky Tabulka 11
– Příprava Live Amp mix B:

Tabulka 11 – Příprava Live Amp mix B

Reagencie	Objem [μ l]
voda molekulární biologické třídy	205
Additive	260
Amp Mix	135
Amp primer B	40
Enzyme mix	35

PPiase	1
Celkem	676

- obě zkumavky vortexujeme na 5 s a umístíme na led

5.11.3 Příprava DNA knihovny

Připravíme si 1x zředěný Wash Buffer smícháním 0,5 ml Wash Buffer s 4,5 ml vody o molekulární biologické kvalitě. Přidáme 1 ml 1x zředěného Wash Buffer do obou zkumavek s Capture Beads (mikrokuličky) a vortexujeme. Zkumavky s mikrokuličkami umístíme do centrifugy a centrifugujeme na 10 s, zkumavky vyjmeme, převrátíme je o 180° a znovu centrifugujeme na 10 s. Opatrně odstraníme supernatant, bez toho aniž bychom narušili mikrokuličky. Promyjeme mikrokuličky ještě jednou 1 ml 1x zředěným Wash Buffer a postupujeme obdobně.

Vytáhneme naši připravenou DNA amplikonovou knihovnu vzorků z mrazicího boxu a necháme ji rozmraznout na ledu. Spočítáme množství DNA potřebného k amplifikaci s použitím následujícího vzorce:

Objem DNA v μl na zkumavku = (požadovaný počet molekul na kuličku (=2) x 5 milionů kuliček)/koncentrace DNA knihovny (v molekulách na μl).

Přidáváme mezi 5-30 μl DNA.

Přidáme spočítané množství amplikonů DNA knihovny do obou zkumavek s mikrokuličkami A a B. Do každé zkumavky přidáváme stejné množství DNA spočítané v předchozím kroku. Zkumavky vortexujeme na 5 s.

5.11.4 Emulzifikace

Přidáme 600 μl Live Amp Mix B do zkumavky s mikrokuličkami B a vortexujeme ji. Přeneseme celý obsah zkumavky B do Turrax stirring zkumavky. Nastavíme UTDD na 2000 rpm na 5 min. Umístíme stirring zkumavku do UTDD a zapneme UTDD. Do zkumavky s mikrokuličkami A přidáme 600 μl Live Amp Mix A, vortexujeme ji a celý obsah přeneseme do stejné Turrax stirring zkumavky z předchozího kroku. Umístíme stirring zkumavku do UTDD, zapneme UTDD na 5 min na 2000 rpm, abychom vytvořili konečnou emulzi. Po ukončení procesu, stirring zkumavky vyjmeme z UTDD.

5.11.5 Amplifikace

S použitím Combitip nasajeme 100 µl emulze ze stirring zkumavky a opatrně pipetujeme emulzi do stripů. Dáváme pozor, abychom nenasáli vzduch. Po rozplnění celé emulze, stripy důkladně uzavřeme a očistíme povrch stripů.

Stripy umístíme na termocyklér a nastavíme amplifikaci dle následujícího programu v Tabulka 12 - Emulzní amplifikace:

Tabulka 12 - Emulzní amplifikace

Počet opakování	Čas	Teplota
1x	4 min	94 °C
50x	30 s	94 °C
	4,5 min	58 °C
	30 s	68 °C
Ukončení		10 °C

5.11.6 Sběr emulze a první promytí

GS Junior Titanium emPCR Oil a Breaking Kit přeneseme do laminárního boxu. Připojíme 50 ml konickou zkumavku k víčku z GS Junior Titanium Oil a Breaking Kit, ověříme se o správném utěsnění víčka s 50 ml zkumavkou. Spojíme modrý konektor s hřebenem na odsávání produktu. Připojíme druhý konec hadice ke zdroji vakua (s kapalným rezervoárem k zachycení isopropanolu).

Zapneme vakuum a aspirujeme emulzní směsi A a B ze všech jamek do 50 ml zkumavky, emulzi nasáváme pomalými kruhovými pohyby sacího hřebenu na dně jamek. Vysajeme vždy dvě řady stripu, poté nasajeme trochu isopropanolu, aby se emulzní směs trochu naředila a mohla odtéci do sběrné 50 ml zkumavky. Jamky vymyjeme 2x 100 µl isopropanolu použitím multikanálové pipety, pro důkladné propláchnutí pohybujeme pístem multikanálové pipety nahoru a dolů, aspirujeme promývací roztok. Po aspiraci všeho isopropanolu z mikrozkuvek, aspirujeme dalších 5 ml isopropanolu k získání všech mikročástic, které by mohly zůstat v hadici.

5.11.7 Promytí mikrokuliček

Vortexujeme 50 ml zkumavku z předchozích kroků k resuspendování všech pelet. Přidáme isopropanol v takovém množství, aby konečný objem v 50 ml zkumavce byl 35 ml, vortexujeme k resuspendování pelet. Centrifugujeme na 2813 rpm na 5 min a opatrně odstraníme supernatant pomocí pipety. Přidáme 10 ml Enhancing Buffer k resuspendování pelet a důkladně vortexujeme (v případě nedostatečného resuspendování můžeme použít skleněnou tyčinku). Přidáme isopropanol v takovém množství, aby konečný objem ve zkumavce byl 40 ml a důkladně vortexujeme. Zkumavku dáme centrifugovat na 2813 rpm na 5 min, následně opatrně odstraníme supernatant pomocí pipety. Přidáme isopropanol na konečný objem 35 ml a důkladně vortexujeme. Zkumavku centrifugujeme na 2813 rpm na 5 min, následně opatrně odstraníme supernatant pomocí pipety. Přidáme ethanol 99,5% na konečný objem 35 ml a důkladně vortexujeme. Zkumavku centrifugujeme na 2813 rpm na 5 min, následně opatrně odstraníme supernatant pomocí pipety. Přidáme Enhancing Buffer na konečný objem 35 ml a důkladně vortexujeme. Zkumavku centrifugujeme na 2813 rpm na 5 min, následně opatrně odstraníme téměř všechny supernatant, necháme ale přibližně 0,5 ml Enhancing Buffer. Přeneseme DNA bead suspenzi do 1,7 ml zkumavky od GS Junior. Zkumavku centrifugujeme na 10 s při maximální rychlosti, převrátíme zkumavku o 180° a opět centrifugujeme, následně odstraníme supernatant. Vymyjeme 50 ml zkumavku pomocí 1 ml Enhancing Buffer a přidáme tento roztok do 1,7 ml zkumavky, následně 1,7 ml zkumavku centrifugujeme na 10 s při maximální rychlosti, převrátíme ji o 180°, znovu centrifugujeme a pomocí pipety odstraníme supernatant. Důkladně promyjeme kuličky 2x pomocí 1 ml Enhancing Buffer, následně 1,7 ml zkumavku centrifugujeme na 10 s při maximální rychlosti, převrátíme ji o 180°, znovu centrifugujeme a pomocí pipety odstraníme supernatant.

5.11.8 Obohacení DNA knihovny

Zapneme termomixér a nastavíme jej na 65 °C. Připravíme si Melt solution smícháním 125 µl NaOH 10 N s 9,875 ml vody o molekulární kvalitě. Přidáme 1 ml Melt solution do 1,7 ml zkumavky s mikrokuličkami a vortexujeme, inkubujeme na 2 minuty

při pokojové teplotě, následně 1,7 ml zkumavku centrifugujeme na 10 s při maximální rychlosti, převrátíme ji o 180°, znovu centrifugujeme a pomocí pipety odstraníme supernatant. Znovu přidáme 1 ml Melt solution do 1,7 ml zkumavky s mikročásticemi a vortexujeme, inkubujeme na 2 minuty při pokojové teplotě. Následně 1,7 ml zkumavku centrifugujeme na 10 s při maximální rychlosti, převrátíme ji o 180°, znovu centrifugujeme a pomocí pipety odstraníme supernatant. Přidáme 1 ml Annealing Buffer do 1,7 ml zkumavky a vortexujeme, následně 1,7 ml zkumavku centrifugujeme na 10 s při maximální rychlosti, převrátíme ji o 180°, znovu centrifugujeme a pomocí pipety odstraníme supernatant. Zopakujeme proces od přidávání Annealing Buffer 2x. Přidáme 45 µl Annealing Buffer, 15 µl Enrich Primer A a 15 µl Enrich primer B do 1,7 ml zkumavky s mikrokuličkami a vortexujeme. Zkumavku umístíme na předehřátý blok na 64 °C na 5 min a následně ihned zchladíme na ledu na 2 minuty. Přidáme 1 ml Enhancing Buffer do 1,7 ml zkumavky s mikročásticemi a vortexujeme, následně 1,7 ml zkumavku centrifugujeme na 10 s při maximální rychlosti, převrátíme ji o 180°, znovu centrifugujeme a pomocí pipety odstraníme supernatant. Znovu přidáme 1 ml Enhancing Buffer do 1,7 ml zkumavky s mikročásticemi a vortexujeme, následně 1,7 ml zkumavku centrifugujeme na 10 s při maximální rychlosti, převrátíme ji o 180°, znovu centrifugujeme a pomocí pipety odstraníme supernatant, přidáme 1 ml Enhancing Buffer do 1,7 ml zkumavky s mikročásticemi a vortexujeme. Zkumavku ponecháme při pokojové teplotě až do kroku: Obohacení mikrokuliček nesoucích vzorky DNA

5.11.8.1 Příprava obohacených mikrokuliček

Zkumavku hnědých obohacených mikrokuliček vortexujeme na 1 min k resuspendování celého objemu zkumavky. Zkumavku umístíme na magnet a počkáme přibližně 3 minuty, aby nám kuličky peletovaly. Odstraníme supernatant pomocí pipety (zkumavka je stále na magnetu), dáváme pozor, abychom nevyhodili žádné obohacené mikročástice. Přidáme 500 µl Enhancing Buffer a vortexujeme. Znovu peletujeme obohacené mikrokuličky na magnetickém koncentrátoru, následně odstraníme supernatant pomocí pipety. Zopakujeme krok od přidávání Enhancing Buffer 1x. Po odstranění supernatantu, odstraníme zkumavku z magnetického koncentrátoru a přidáme 80 µl Enhancing Buffer a vortexujeme.

5.11.8.2 **Obohacení mikrokuliček nesoucích vzorky DNA**

Přidáme 80 µl promytých obohacených (hnědých) mikrokuliček do 1,7 ml zkumavky s mikrokuličkami (capture beads) a vortexujeme. Zkumavku necháme otáčet na LabQuake při pokojové teplotě na 5 min. Následně zkumavku umístíme na magnet a necháme ji tam po 3 – 5 min k vytvoření pelet. Několikrát převrátíme magnetický koncentrátor o 180° a dále počkáme zhruba 3 min až mikročástice znovu peletují. Opatrně odstraníme supernatant pomocí 1000 µl pipety, dáváme pozor, abychom nevyhodili žádné hnědé obohacené mikrokuličky. Promyjeme směs mikrokuliček pomocí Enhancing Buffer tolikrát, dokud nejsou viditelné žádné bílé mikročástice v supernatantu, dle následujícího postupu:

- přidáme 1 ml Enhancing Buffer do zkumavky
- odstraníme zkumavku z magnetu a důkladně vortexujeme
- zkumavku umístíme zpět na magnet, několikrát převrátíme magnet o 180° a počkáme než mikrokuličky znovu peletují
- opatrně vyhodíme supernatant pomocí pipety, dáváme pozor, abychom nevyhodili žádné hnědé obohacené mikročástice
- tyto kroky opakujeme 6 – 10 x dokud bílé DNA mikročástice již nejsou viditelné - optimálně, sbíráme supernatant a následně ho centrifugujeme a zjišťujeme, jestli jsme aspirovali nějaké bílé mikročástice

5.11.9 **Sbírání obohacených DNA mikrokuliček**

Odstraníme zkumavku obohacených mikrokuliček z magnetu a resuspendujeme pelety v 700 µl Melt Solution. Vortexujeme na 5 s, zkumavku umístíme na magnet k peletování mikrokuliček. Přeneseme supernatant obsahující obohacenou DNA mikročástic do nové 1,7 ml mikrocentrifugační zkumavky. Přidáme 700 µl Melt Solution do staré zkumavky ve které byly obohacené mikrokuličky. Starou 1,7 ml zkumavku vortexujeme na 5 s a umístíme ji na magnet přibližně na 5 min. Přeneseme

supernatant ze zkumavky z magnetu do zkumavky, která obsahuje obohacené DNA mikrokuličky. Následně 1,7 ml zkumavku s obohacenými DNA mikrokuličkami centrifugujeme na 10 s při maximální rychlosti, převrátíme ji o 180° tam a zpět, znovu centrifugujeme a pomocí pipety odstraníme supernatant. Přidáme 1 ml Annealing Buffer a vortexujeme na 5 s. Následně 1,7 ml zkumavku centrifugujeme na 10 s při maximální rychlosti, převrátíme ji o 180°, znovu centrifugujeme a pomocí pipety odstraníme supernatant. Opakujeme krok od přidávání Annealing Buffer 2x. Přidáme 100 µl Annealing Buffer a vortexujeme k resuspendování mikrokuliček.

5.11.10 Přidání Seq primerů

Přidáme 15 µl Seq Primer A a 15 µl Seq Primer B a vortexujeme. 1,7 ml zkumavku umístíme na termoblok nastavený na 65 °C na 5 min, následně ihned zchladíme na ledu na 2 min. Přidáme 1 ml Annealing Buffer a vortexujeme na 5 s, následně 1,7 ml zkumavku centrifugujeme na 10 s při maximální rychlosti, převrátíme ji o 180°, znovu centrifugujeme a pomocí pipety odstraníme supernatant, tento krok opakujeme 2x. Přidáme 1 ml Annealing Buffer k peletám a vortexujeme. Následně 1,7 ml zkumavku centrifugujeme na 10 s při maximální rychlosti, převrátíme ji o 180°, znovu centrifugujeme. GS Junior sequencing Run vyžaduje vložení 500 000 obohacených mikrokuliček, zhodnotíme množství obohacených mikročástic pomocí GS Junior Bead Counter. Skladujeme mikročástice v rozmezí teplot 2-8 °C a sekvenujeme v rozmezí dvou týdnů.

5.12 Sekvenování DNA na GS Junior

Podmínky sekvenace: pokojová teplota v rozmezí 15 – 25 °C, všechny 1,7 ml zkumavky musí být silikonové, centrifugační rychlost uváděná v rpm je pro centrifugu Eppendorf 5430.

Materiál a chemikálie: špičky *Eppendorf*, 50 ml serologická pipeta, voda o molekulární kvalitě, FisherBrand Sparkleen *Fisher Scientific*, 18.2 MΩ Water (nanopure voda), 50% ethanol, Tween 20, liquid (100 %) *Fisher Scientific*, KimWipes *Fisher Scientific*.

Reagencie a pufry - GS Junior Titanium Sequencing Kit se skládá z 3 komponent:

- Sequencing Kit Reagents a Enzymes skladované při -15 do -25 °C: Enzyme Beads, Polymerase, Polymerase Cofactor, Apyrase, PPIase Beads, Control Beads XLTF, DTT, Substrate TW
- Sequencing Kit Buffers skladované od +15 do +25 °C: Pre-wash Buffer, Buffer CB, Pre-wash cassette, Buffer CB Sipper Buffer, Buffer CB Sipper Filter, Reagent Sipper Tubes, Reagent Sipper Tube Filters
- Sequencing Kit Packing Beads a Supplement CB skladované od +2 do +8°C: Packing Beads, Supplement CB

GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit: PicoTiterPlate (PTP)Device, Cartridge Seal, BDD (Bead Deposition Device) Gasket

Přístroje: pipety *Eppendorf*, centrifuga CL31R Multispeed *Thermo Scientific*, stolní minicentrifuga *Eppendorf* Minispin Plus, stolní minitřepačka *Velp Scientifica*, *DynaMag™-2* Magnet, *Labquake™* Tube Shaker/Rotators.

Před začátkem sekvenování si musíme připravit reagencie a pufry následujícím způsobem:

- necháme roztát komponenty Reagents a Enzymes box následujícím způsobem:
- z Reagents a Enzymes box vytáhneme 2,0 ml zkumavky a 50 ml konické zkumavky, 2 ml zkumavky umístíme na led, aby roztály
- vyzvedneme ták a naplníme kontejner, který drží deseti zkumavkovou reagenční kazetu, vodou o pokojové teplotě (může být kohoutková voda), přitom dáváme pozor, abychom kazetu neponořili, udržujeme ták ve svislé pozici a chráněný před slunečním světlem
- dáme ták zpátky do kontejneru a 50 ml zkumavky umístíme na ták, aby rozmrzly

- pravidelně převracíme kazety a 50 ml zkumavky 3x, abychom promíchali jejich obsah
- když jsou komponenty rozmrznuté, přeneseme reagenční kazetu a 50 ml zkumavky do +2 až +8 °C do té doby než je budeme potřebovat
- vyndáme Packing Beads a Supplement CB krabici z ledničky a uchovááme je na ledu, dokud nebudou potřeba
- z Buffer krabice vyndáme láhve Buffer CB a Pre-wash Buffer, Buffer Sipper Tube, Reagent Sipper Tubes, Pre-wash cassette a uchovááme je při pokojové teplotě

GS Junior Sequencing procedure se sestává z několika kroků:

- promytí přístroje GS Junior s Pre-wash Buffer
- příprava a skladování beads v Bead Deposition Device
- priming přístroje s reagenциemi a pufry
- sekvenování

5.12.1 Promytí přístroje GS Junior pomocí Pre-Wash Buffer

Bylo postupováno dle manuálu: Sequencing Method Manual, GS Junior Titanium Series, březen 2012.

5.12.2 Příprava a skladování kuliček v Bead Deposition Device

5.12.2.1 Příprava PicoTiterPlate zařízení

Příprava Bead Buffer 2 (BB2): přidáme 6,6 ml Supplement CB do láhve obsahující Buffer CB, důkladně promícháme obsah láhve převrácením 10x. Pomocí 50 ml sérologické pipety přeneseme 40 ml Buffer CB do čisté 50ml konické zkumavky a umístíme ji na led. Centrifugujeme Apyrase zkumavku na mikrocentrifuze na 5 s, 10 000 rpm. Přidáme 6,5 µl Apyrase do 50 ml zkumavky, označíme zkumavku nápisem BB2 (Bead Buffer 2), zkumavku důkladně převrátíme 10x a dáme ji na led.

Příprava Pico Titer Plate (PTP) a Bead Deposition Devices: vezmeme PTP zařízení umístěné na podnosu z GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit a otevřeme jej. Opíšeme si ID z PTP zařízení, které budeme následně potřebovat ke spuštění sekvenování. Z tácku odstraníme bead loading těsnění a cartridge seal, omyjeme je důkladně pomocí Sparkleen roztoku (jemně třepeme), promyjeme důkladně nanopure vodou a položíme na papírový ručník a necháme volně na vzduchu uschnout. Umyjeme Bead Deposition Device pomocí jemného kartáčku a Sparkleen roztoku, propláchneme důkladně pomocí nanopure vody, položíme na papírový ručník a necháme volně na vzduchu oschnout.

Sestavíme dohromady BDD s promytým těsněním a PTP device, dle následujícího postupu:

- nasadíme si čisté rukavice, orientujeme táč před sebe, držíme táč v jedné ruce a v druhé ruce držíme za rohy PTP zařízení, snažíme se přitom nedotýkat se žádného jiného povrchu nábytku
- umístíme PTP zařízení na BDD, zarovnáme rohy PTP device a BDD
- upevníme umyté a vysušené bead loading gasket na BDD položením na povrch PTP zařízení, zarovnáme rohy od bead loading gasket a BDD base
- opatrně umístíme ochranný kryt BDD přes zarovnané BDD base/PTP zařízení/gasket, zarovnáme kolíky BDD s dírkami na ochranném krytu
- nyní důkladně zabezpečíme celé zařízení, BDD base má na stranách západky, když tyto západky dáme do kolmé pozice, tak zajedou do speciálních drážek, uslyšíme zacvaknutí a celé zařízení se nám důkladně uzavře
- na povrchu BDD jsou dvě jamky, větší jamka slouží jako vstupní okénko pro vzorek, menší jamka slouží k odvětrávání
- do větší jamky pipetujeme 350 μ l BB2 a centrifugujeme BDD na 5 min při 4 013 rpm (pro Eppendorf 5430)
- odstraníme BDD sestavu z centrifugy

5.12.2.2 Příprava Beads

GS Junior System obsahuje 4 rozdílné druhy mikročastic (beads). Každý typ mikročastice musí podstoupit specifickou přípravnou proceduru.

Tyto mikročastice musí být vloženy do PTP zařízení v pořadí, jak je napsáno v následující tabulce Tabulka 13 – Jednotlivé vrstvy částic v PTP zařízení:

Tabulka 13 – Jednotlivé vrstvy částic v PTP zařízení

Vrstva mikročastic	Typ mikročastice
Vrstva 1	Enzyme Beads Pre-layer
Vrstva 2	DNA a Packing Beads
Vrstva 3	Enzyme Beads Post-layer
Vrstva 4	PPIase Beads

Příprava DNA Beads – přidání Control Beads XLTF: máme připravenou obohacenou DNA z emPCR v konkrétním požadovaném množství pro sekvenování na GS Junior. Centrifugujeme Control Beads XLTF v mikrocentrifuze na 5 s, 10 000 rpm, pipetou vzniklé mikročastice znovu resuspendujeme. Přidáme 6 µl Control Beads XLTF k obohaceným DNA mikročasticím. Když je objem vzorku DNA větší než 100 µl, centrifugujeme DNA mikročastice v mikrocentrifuze na 10s, 10 000 rpm, aby nám mikročastice vytvořily pelety, odstraníme dostatečné množství supernatantu, abychom nechali ve zkumavce 100 µl. Přidáme 500 µl BB2 k DNA mikročasticím, důkladně vortexujeme a inkubujeme na 20 min při pokojové teplotě na stolním rotátoru.

Příprava Packing Beads: přidáme 1 ml BB2 do zkumavky obsahující Packing Beads a vortexujeme při vysoké rychlosti. 3x promyjeme Packing Beads. Postup promytí: přidáme 1 ml BB2, pipetou důkladně resuspendujeme všechny mikročastice až do vzniku homogenní suspenze, dále centrifugujeme na 5 min, 10 000 rpm pro každé promytí a po centrifugaci opatrně odstraníme supernatant bez porušení mikročasticových pelet. Po 3. promytí, přidáme 200 µl BB2, vortexováním při vysoké rychlosti resuspendujeme mikročastice a dáme zkumavku na led.

Příprava Enzyme a PPIase Beads: Tyto dva typy mikročastic můžou být promyty paralelně. Dbáme pozor na to, abychom nekontaminovali jednotlivé mikročastice.

Přidáme 1 ml BB2 do každé zkumavky a promixujeme vortexováním při střední rychlosti, peletujeme Enzyme Beads a PPIase Beads pomocí zařízení s magnetem na 30s, překlopíme zařízení s magnetem několikrát a počkáme znovu 30 s, opatrně odstraníme supernatant a zkumavky dáme pryč z magnetu. Promyjeme obě zkumavky 3x pomocí 1 ml BB2, vortexujeme, dáme na zařízení s magnetem na 30s, několikrát obrátíme magnet, počkáme 30 s, opatrně odstraníme supernatant. Po 3. promytí, přidáme 400 µl BB2 k Enzyme Beads a 410 µl BB2 k PPIase Beads, vortexujeme obě zkumavky při střední rychlosti k resuspendování mikročástic a dáme na led. Připravíme si 2 nové 1,7 ml zkumavky, označíme 1. zkumavku - Enzyme Pre-layer a 2. zkumavku – Enzyme Post-layer, do nových zkumavek pipetujeme a následně vortexujeme dle následující tabulky Tabulka 14 - Enzyme Pre-layer a Enzyme Post Layer.

Tabulka 14 - Enzyme Pre-layer a Enzyme Post Layer

Reagencie	BB2	Enzyme Beads	Celkový objem
Enzyme Pre-layer	300 µl	110 µl	410 µl
Enzyme Post-layer	180 µl	230 µl	410 µl

Příprava DNA a Packing Beads Mix: vyndáme zkumavku s DNA mikročásticemi ze stolního rotátoru. Centrifugujeme DNA mikročástice na 10 s, 10 000 rpm. Odstraníme dostatečné množství BB2 ze zkumavky tak, aby zůstalo ve zkumavce 50 µl (spočítáme si dohromady objem obohacené DNA + 6 µl Control Beads XLTF + 500 µl BB2). Centrifugujeme Polymerase a Polymerase Cofactor zkumavky v mikrocentrifuze na 5s, 10 000 rpm. Přidáme postupně dle následujícího postupu k DNA mikročásticím:

- 40 µl Polymerase
- 20 µl Polymerase Cofactor
- 65 µl BB2

Vortexujeme směs při nízké rychlosti na 5 s a inkubujeme na stolním rotátoru při pokojové teplotě na 10 min. Po skončení inkubace, vortexujeme zkumavku Packing Beads při vysoké rychlosti. Přidáme 175 µl Packing Beads k DNA směsi, vortexujeme při nízké rychlosti a inkubujeme na stolním rotátoru při pokojové teplotě na 5 min.

5.12.3 Aplikování jednotlivých vrstev mikročastic do PTP a Prime přístroje

Mikročástice jsou aplikovány do PTP zařízení vstříknutím mikročasticové suspenze skrz větší jamku a následně usazeny na dno PicoTiterPlate pomocí centrifugace. Tento proces je opakován pro každou vrstvu.

- Bead layer 1: Enzyme Beads Pre-layer
- Bead layer 2: DNA a Packing Beads
- Bead layer 3: Enzyme Beads Post-layer
- Bead layer 4: PPIase Beads

Během centrifugace mikročasticových vrstev si připravíme Buffer CB, připravíme GS Junior Instrument s reagensy a vyčistíme zařízení. K nanášení jednotlivých vrstev používáme 1000 µl pipety. Snažíme se minimalizovat čas mezi jednotlivým nanášením vrstvy a startem centrifugace. Dáváme pozor na to, abychom nenanášeli žádné vzduchové bubliny na BDD zařízení.

5.12.3.1 Aplikování 1. vrstvy mikročastic

Enzyme Beads Pre-layer: z BDD opatrně pipetováním odstraníme a vyhodíme co nejvíce BB2, využíváme jamku pro vkládání vzorku. Vortexujeme zkumavku s Enzyme Beads Pre-layer při nízké rychlosti na 5 s, abychom získali homogenní suspenzi. Ihned vnášíme 350 µl suspenze mikročastic do PTP zařízení skrz nanášecí jamku pomalým, ale stálým tlakem. Centrifugujeme BDD na 5 min, 4 013 rpm.

5.12.3.2 Příprava Buffer CB

Vortexujeme zkumavku s DTT při vysoké rychlosti na 5 s, přidáme 1 ml DTT do láhve s Buffer CB. Převrátíme zkumavku Substrate TW 10x, abychom ji důkladně promíchali. Pomocí sérologické pipety přeneseme 44 ml Substrate TW do láhve s Buffer CB. Láhev 10x převrátíme a důkladně promícháme.

5.12.3.3 Aplikování 2. vrstvy mikročastic

DNA a Packing Beads: odstraníme BDD z centrifugy. Pomocí pipety důkladně odstraníme co nejvíce supernatantu skrz nanášecí jamku BDD. Vezmeme zkumavku DNA a Packing Beads Mix ze stolního rotátoru. Centrifugujeme zkumavku na 5 s, 10 000 rpm. Ihned nanášíme 350 μ l této suspenze na PTP zařízení. Centrifugujeme BDD na 10 min, 4 013 rpm.

5.12.3.4 Příprava GS Junior Instrument

Otevřeme víko přístroje a přeneseme a vyhodíme Pre-wash kazetu a Pre-wash láhev. Vyprázdníme odpadní láhev. Vyměníme si rukavice. Převrátíme reagenční kazety 20x, abychom je důkladně promíchaly. Opatrně odstraníme všechny víčka ze zkumavek v reagenční kazetě a dáváme přitom pozor, abychom jednotlivé zkumavky nekontaminovaly navzájem. Upevníme kazetu se zkumavkami do GS Junior a umístíme láhev s CB Buffer. Klikneme na Proceed k začátku priming zařízení, prime bude trvat přibližně 5 min. Když je priming hotové, otevře se nám 3. okno Instrument Procedure, vložíme IDs a barcodes.

5.12.3.5 Aplikování 3. vrstvy mikročastic

Enzyme Beads Post- Layer: vyměníme si rukavice po nanášení reagenčních kazet do přístroje. Vyndáme BDD z centrifugy a pomocí pipety důkladně odstraníme všechny supernatant skrz nanášecí jamku na BDD. Vortexujeme Enzyme Beads Post-layer na 5 s při střední rychlosti, abychom získali homogenní suspenzi. Ihned nanese 350 μ l mikročasticové suspenze na PTP zařízení skrz nanášecí jamku na BDD. Centrifugujeme BDD na 10 min, 4 013 rpm

5.12.3.6 Příprava GS Junior Instrument PTP Cartridge

Když je příprava přístroje hotová, v okně GS Junior se zobrazí: Prime Complete = Příprava je dokončena. Otevřeme víko přístroje a otevřeme dvířka od kamery stlačením na dvou stranách a táhnutím dvířek dolů. Odstraníme PTP zařízení

z předcházejících sekvenování. Opatrně odstraníme cartridge seal pomocí čisté pipetovací špičky a vyhodíme ho. Vyměníme si rukavice. Použijeme vlhkou Kimwape s 50% ethanolem a očistíme povrch PTP Cartridge k odstranění jakýchkoliv mikročástic a reagenčních zbytků, necháme na vzduchu řádně vyschnout. Vložíme cartridge seal do PTP Cartridge. Navlhčíme Kimwipe 10% roztokem Tween – 20 a utřeme povrch PTP Cartridge (dáváme velký pozor na kameru, když čistíme nebo pracujeme poblíž ní, nikdy se kamery nedotýkáme s ničím jiným než Zeiss zvlhčeným čistícím ubrouskem nebo Lens papírem z Thorlabs). Použijeme nový Zeis předvlhčený čistící ubrousek k důkladnému očištění kamery. Na vzduchu necháme vypařit všechny kapalné složky, které mohly ulpět na kameře.

5.12.3.7 **Aplikace 4. vrstvy mikročástic**

PPiase Beads: Vytáhneme BDD z centrifugy a pomocí pipety důkladně odstraníme a následně vyhodíme všechny supernatant z BDD skrz nanášecí jamku na BDD. Vortexujeme PPiase Beads zkumavku na 5 s při střední rychlosti, abychom získali jednotnou suspenzi. Ihned nanášíme 350 µl suspenze PPiase Beads na PTP zařízení skrz nanášecí jamku na BDD. Centrifugujeme BDD na 5 min při 4 013 rpm

5.12.4 **Sekvenování**

Nastavení sekvenování a dalších parametrů: postupujeme dle pokynů na obrazovce u přístroje GS Junior a nastavíme počet cyklů dle našeho experimentu.

Tabulka 15 - Nastavení sekvenace

42 cyklů	100 bazí (3 hod)
100 cyklů	250 bazí (5 hod a 30 min)
200 cyklů	500 bazí (9 hod a 20 min)

Otevře se nám již v pořadí 6. okno a v nabídce si zvolíme typ procesu:

- kompletní proces pro amplikonové knihovny

Zvolili jsme kompletní proces pro amplikonové knihovny. Otevře se 7. okno, kde zaškrtneme políčko u Backup Run upon completion, klikneme na Next. Otevře se 8. okno, kde můžeme napsat poznámky o konkrétním procesu sekvenace, klikneme na

Next. Otevře se 9. a zároveň i poslední okno, kde můžeme vidět kompletní nastavení sekvenace. Klikneme na tlačítko Proceed, navede nás to zpátky k přístrojové tabulce zobrazené v GS Junior Sequencer application window.

Vložení PTP zařízení do GS Junior Instrument: vyjmeme BDD z centrifugy a pomocí pipety jemně vyjmeme a odstraníme všechny supernatant skrz nanášecí jamku. Vyjmeme PTP zařízení z BDD dle následujícího postupu:

- západky dáme dolů a uvolníme tím víko
- opatrně odstraníme BDD víko
- opatrně zvedneme a vyhodíme Bead loading gasket
- otevřeme víko od PTP Cartridge a opatrně přeneseme PTP zařízení, přičemž držíme PTP jenom za jeho rohy
- zavřeme PTP rámeček, ujistíme se, jestli je vše správně uzavřeno západkou
- pečlivě očistíme povrch PTP zařízení pomocí Kimwipe

Zavřeme dvířka od kamery a celý GS Junior. Klikneme na Proceed a přístroj spustí sekvenaci, na obrazovce vidíme odpočítávání, kolik času zbývá do konce sekvenace. Když je proces u konce, GS Junior oznámí na obrazovce zprávu, že sekvenace skončila, klikneme na tlačítko OK a navede nás to na začátek nové sekvenace.

5.13 Problémy a řešení při přípravě a procesu pyrosekvenování

Vyskytlo se pár chyb, které jsme ale dokázali odstranit. Řešení problémů jsme vždy hledali v přiložené dokumentaci.

- Problém – v Bead Counter máme více produktu než je potřeba
 - a. chyba – našli jsme chybu ve výpočtu koncentrace cDNA ve vzorku, měli jsme špatně spočítanou délku DNA v bp
- Problém – v průběhu centrifugace BDD device s PTP zařízením nám PTP destička opakovaně praskla

- a. Chyba – nepoužili jsme doporučenou centrifugu Eppendorf 5430, ale centrifuga CL31R Multispeed *Thermo Scientific*
- b. Řešení – použili jsme centrifuga CL31R Multispeed *Thermo Scientific*, ale snížili jsme počet rpm na polovinu a prodloužili jsme dobu centrifugace na 15 min.

6 Výsledky

6.1.1 Analýza dat

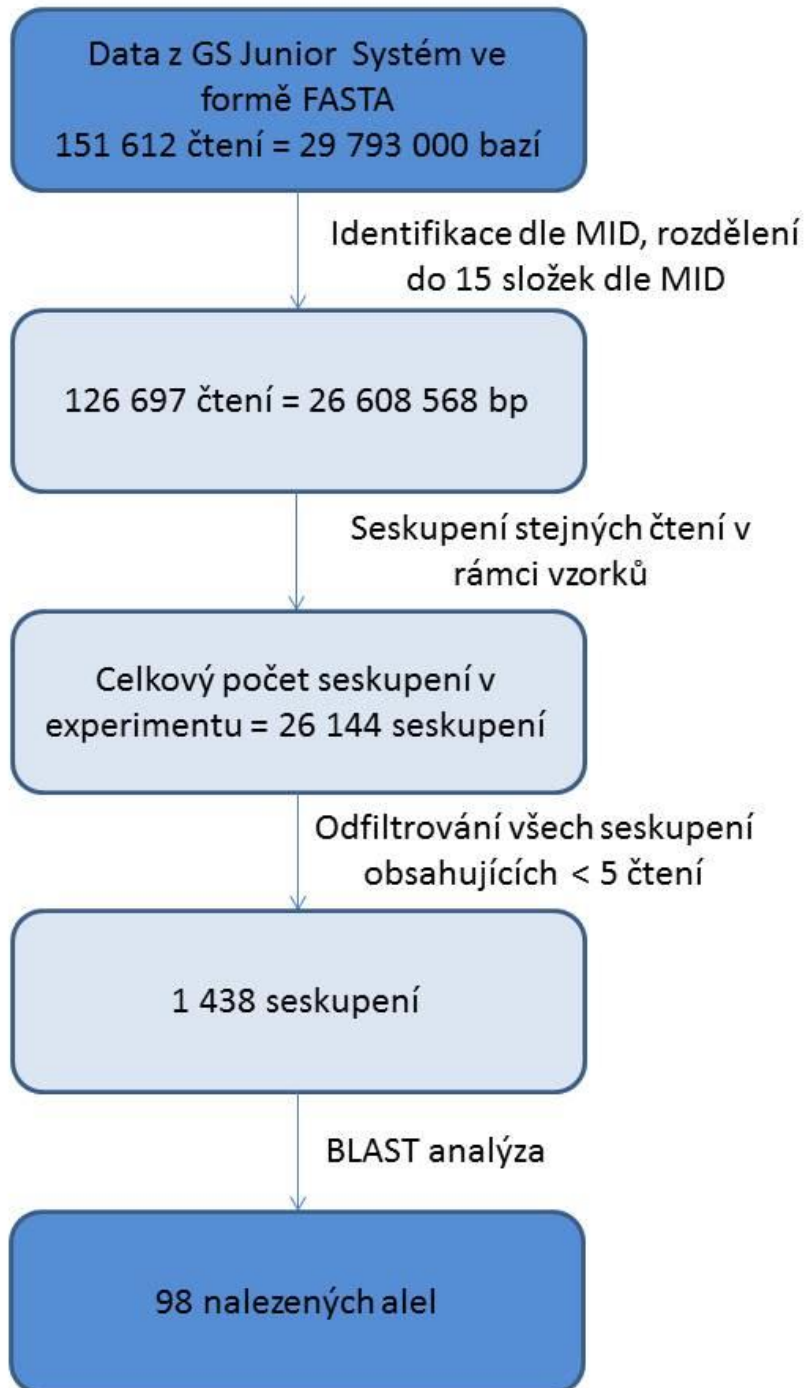
Výstupem přístroje GS Junior je soubor ve formátu SFF (Standard Flowgram Format) obsahující všechna čtení. Pro jednodušší zpracování jsme tento soubor převedli do formátu FASTA pomocí nástroje "sffinfo" dodávaného s oficiálním softwarem ke GS Junior (454 Sequencing System Software, GS Amplicon Variant Analyzer). Analýzou tohoto souboru jsme zjistili, že GS Junior přečetl celkem 151 612 souvislých čtení (celkem 29 793 000 bází).

Dalším krokem bylo rozdělení tohoto souboru podle identifikátoru MID pomocí jednoduchého skriptu v jazyce Python 2.7.3, který hledal předem zadané identifikátory MID na začátku a na konci každé sekvence. Tímto krokem jsme odfiltrovali všechna čtení, která neobsahovala daný identifikátor MID na začátku a na konci sekvence. Celkem tak vzniklo dalších 15 souborů (pro každý vzorek jeden) obsahujících 126 697 souvislých čtení (26 608 568 přečtených bází).

V každém vzorku jsme následně seskupili stejné čtení. Toto bylo provedeno opět skriptem v jazyce Python 2.7.3, který procházel jednotlivé čtení a vyhledával čtení duplicitní. Dohromady pro všechny vzorky bylo nalezeno 26 144 unikátních seskupení v rámci experimentu.

Další filtrační krok spočíval v odstranění nedůvěryhodných čtení. Tento krok jsme provedli obdobně jako Wiseman a spol. (2009). Odstranili jsme všechna seskupení, která byla čtena méně než 5x. Po tomto kroku zbylo celkem 1 438 seskupení čtených více nebo rovno 5x. Tato seskupení jsme porovnali se známými alelami MHC I třídy v databázi NCBI pomocí nástroje ncbi-blast+ 2.2.25. Basic Local Alignment Search Tool = BLAST je program, který na základě algoritmu vyhledává v databázi alel shodnou sekvenci.

Obrázek 3 - Schéma analýzy dat z GS Junior System



6.1.2 Analýza nalezených MHC molekul I. třídy

Všechny nalezené varianty čtené alespoň 5x jsme porovnali se známými variantami v databázi GenBank na webu National Center for Biotechnology Information = NCBI pomocí Basic Local Alignment Tool = BLAST. Pomocí programu BLAST jsme našli shodu v 98 známých alelách v databázi NCBI.

Ze souboru alel čtených 5x a více jsme průměrně v databázi GenBank našli 34,1% alel, které se 100% shodovaly s již nalezenými alelami. Zbytek alel obsahoval jednu či více změn oproti těmto referenčním alelám.

Naše fragmenty mají zhruba 190 bp, avšak v databázi se většinou vyskytují fragmenty delší, které pokrývají exony 2-4, proto se velká část našich alel shodovala s několika alelickými variantami. Rozhodli jsme se proto pojmenovat naše varianty dle všech aktuálních variant pro danou alelu k datu blastování. Jména alelických variant byla následně ještě upravena dle současné nomenklatury pro MHC dle Immuno Polymorphism Database = IPD. V IPD existuje v současnosti spousta alelických variant pojmenovaných dle historických nomenklatur. Historická nomenklatura musela být upravena, jelikož již neodpovídala současným požadavkům a také vědci chtěli, aby se databáze pro primáty shodovala s databází pro lidské HLA molekuly.

Pro našich 15 vzorků jsme našli celkem 98 různých alelických variant plus 11 nových alelických variant (více o těchto nových alelách v kapitole Analýza artefaktů a nových sekvencí) kódujících fragmenty MHC I. Vzorky s přiřazenými alelickými variantami spolu s počtem čtení a identifikátorem = Accession number jsou prezentovány v externí tabulce v příloze: Externí tabulka 1 – Výsledná tabulka s alelami. Accession number je číslo, které jednoznačně identifikuje danou alelu v databázích. Vypočítali jsme jednotlivé procentuální zastoupení každé alelické varianty ve vzorku, kde 100% je celkový počet čtení pro jednotlivý vzorek. Celkový počet čtení pro každý vzorek je v rozmezí od 1077 do 7226, průměrně to je 5270 s mediánem 5888 čtení.

Pro Mamu-A gen bylo nalezeno 30 alel, pro Mamu-B gen 58 alel, pro neklasický Mamu-I gen 3 alely a pro Mamu-E gen 7 alel.

Průměrně pro každý vzorek jsme našli 28 různých alelických variant. Nejvíce alelických variant měl vzorek S8 - RDu8 s nízkou virovou náloží (low viral load = LVL), a to 39. Nejméně alelických variant měl vzorek S11 - RFb9 s vysokou virovou náloží (high viral load = HVL) s 13 alelami.

Dle předešlých poznatků dle Budde a spol. (2011) jenom alely zastoupené u jednotlivce ve větší míře ovlivňují akutní fázi infekce HIV/SIV. My jsme zvolili na základě článku vydaného Karl a spol. (2013) pro kritérium majoritní alely četnost ve vzorku minimálně 4 %. Alela, která byla nalezena v nejvíce vzorcích je alela s mnoha alelickými variantami: **Mamu - E*001** (E*001:10, E*001:11, E*001:14, E*001:17, E*001:18, E*001:19, E*007:01). Byla přítomna ve 14 z 15 vzorků. Tato alela je označena za minoritní, protože se nevyskytla v žádném vzorku ve více než 4%. V našich vzorcích je zastoupení této alely maximálně v 2,94 % a průměrně je zastoupena ve vzorku v 1,15 %. Další alelické varianty, které byly přítomny ve významném množství vzorků, jsou:

- **Mamu - A1*001** (A1*001:01:01, A1*001:02, A1*001:06)
- **Mamu - B*072** (B*072:01:01, B*072:02, B*072:04, B*072:05, B*072:06, B*072:nov:07)
- **Mamu - I*001** (I*001:01, I*001:06:02, I*001:07, I*001:08:01 like-4, I*001:09, I*001:15, I*001:18, I*001:25, I*001:26, I*001:w:02:ChRh85)

Tyto alelické varianty byly přítomny ve 12 vzorcích. Mamu - A1*001 alela byla zastoupena ve 12 vzorcích ve více jak 4% a je proto označena za majoritní alelu. Byla nalezena průměrně v 10,73% zastoupení. Zbylé dvě alely, B*072 a I*001 jsou minoritní alely přítomné ve vzorcích průměrně v 1,22% a 0,56 % zastoupení.

Nejvíce vyjádřenou alelou byla alela Mamu - A1*004, která byla ve vzorku S1 - RSb8 (LVL) v zastoupení až 35,58 %. Tato alela byla nalezena celkem v 9 vzorcích. Jednou ve skupině s LVL, přítom ale v největším zastoupení = 35,58% a 8x ve skupině s HVL v rozmezí od 0,56 % – 19,55% s průměrem 14,35% a mediánem 14,37%.

Bylo také nalezeno značné množství nekódujících alel, které byly čtené přístrojem GS Junior na relativně vysoké úrovni, např.: Mamu-B*074, Mamu-B16 pseudogen, Mamu-A11 chain like.

6.1.3 Určení haplotypu

Každý vzorek je definován přítomností několika majoritních alel a tento soubor majoritních alel vytváří haplotyp pro daný vzorek. U všech vzorků byl určen jeho haplotyp. Za majoritní alelu byla určena alela, která byla přítomná ve vzorku ve více než 4%. Postup stanovení haplotypu jsme použili obdobný jako Karl a spol. (2013) a využili jsme také jejich tabulku pro stanovení haplotypu. Vyfiltrovali jsme majoritní alely a určili jsme hlavní majoritní alelu. Hlavní majoritní alela je definována jako alela, která je přítomná ve vzorku v největším zastoupení. Některé hlavní majoritní alely však byly stanoveny jiným způsobem. Někdy byla jako hlavní majoritní alela označena ta alela, u které se předpokládá určitý biologický význam. Tímto způsobem byla například stanovena hlavní majoritní alelou alela Mamu - B*017, i když nebyla přítomná ve vzorku nejvíce (Karl a spol., 2013).

Tímto určením haplotypu se snadno zjišťuje podobnost jednotlivých vzorků mezi sebou a taky mezi jednotlivými druhy makaků. V našem experimentu jsme našli celkem 11 haplotypů. Zjistili jsme, že jednotlivé haplotypy se opakují jenom v rámci skupiny LVL nebo HVL. Ve skupině LVL jsme našli dva stejné haplotypy u vzorků S8 – RDu8 a S14 – RMp10 a u vzorků S12 – REk11 a S15 – Rky5. Ve skupině HVL jsme našli také dva stejné haplotypy. Vzorek S7 – RTi12 a S9 – Rji8 obsahuje stejný haplotyp a také vzorek S4 – RAl11 a S13 – Rlz9. Haplotyp vzorku S3 – Rkr11 se liší od vzorků S7 – RTi12 a S9 – Rji8 jenom větší přítomností alely Mamu - B*019, a proto má mírně odlišný haplotyp. Všechny haplotypy jsou uvedeny v Tabulce 16 - Haplotypy. Barevně jsou odlišeny dvě skupiny: LVL a HVL, a dále stejné haplotypy jsou podbarveny stejnou barvou.

Tabulka 16 - Haplotypy

LVL = Low viral load								
S1 RSb8	S2 RCv7	S8 RDU8	S12 REk11	S14 RMp10	S15 Rky5			
A004	A028	A001	A001	A001	A001			
	A001	A007	A008	A007	A008			
B048	B029	B024a	B069a	B024a	B069a			
B012b	B028	B047a	B002	B047a	B002			
HVL – High viral load								
S3 Rkr11	S4 RAI11	S5 RZb9	S6 RKf12	S7 RTi12	S9 Rji8	S10 Rmi10	S11 RFb9	S13 Riz9
A001	A008	A012	A002a	A004	A004	A008	A003	A008
A004	A007	A028	A004	A001	A001	A003	A004	A007
B012a	B002	B029	B015a	B012a	B012a	B015a	B012b	B002
B024a	B055	B028	B001a	B024b	B024b	B001a		B055

Popis tabulky č. 16: Tabulka zobrazuje jednotlivé nalezené haplotypy u 15 jedinců makak rhesus. Celkově bylo nalezeno 11 haplotypů. Stejné haplotypy byly nalezeny jenom uvnitř skupiny LVL nebo HVL. Barevně jsou zobrazeny stejné haplotypy.

6.1.4 Analýza artefaktů a nových sekvencí

Po identifikaci známých alel pomocí programu BLAST jsme získali velký počet alel, které obsahovaly vůči referenční alele jednu či více změn. Tato změna může představovat buď chybu metody, anebo dosud neidentifikovanou alelu.

Pokusili jsme se odhalit nové alely mezi artefakty. Provedli jsme speciální filtrační analýzu založenou na mnoha filtračních krocích. Nejdříve jsme odfiltrovali všechna čtení, která se vyskytovala méně než 10x a byla kratší než 189 bp. Následně jsme odstranili všechna čtení, která obsahovala chybu v homopolymerním úseku, nebo změnu v bázích před nebo za tímto homopolymerním úsekem v rozmezí 10 bází před/po homopolymerním úseku. Tyto chyby představovaly delece nebo inserce.

Dále jsme zjistili, u kterých čtení nastala chyba v primeru. Většinou se jednalo o jedno či více nukleotidové substituce. Tyto chyby můžou být způsobeny chybou v PCR, reverzní transkripcí, anebo méně častěji pyrosekvenací. Avšak existuje zde určitá výjimka. Naše primery jsou konstruovány na úsek genetické informace, která vykazuje nejmenší změnu. Existují však alely, které mají změnu právě v těchto úsecích primeru. Tyto chyby v primerech by byly vyhodnoceny jako chyba metody, kdybychom se nesoustředili na tuto modifikaci. Změny v úsecích primeru jsou uvedeny v Tabulce 17 - Alely se změnou v primeru. Tato tabulka byla převzata z publikace od Wiseman a spol. (2009). V Tabulka 17 - Alely se změnou v primeru jsou žlutě vyznačeny alely, které jsme našli v našich vzorcích, a zeleně jsou vyznačeny nové alely, které jsme našli v našich vzorcích a přidali do této tabulky. Postup nalezení těchto „chyb“ je následující. Nejdříve jsme vyfiltrovali všechna čtení, která obsahovala změnu v primeru oproti referenční alele. Dále jsme kontrolovali, zda referenční alela je shodná v úseku primeru také s naším primerem. Jestli ano, jednalo se o chybu v PCR/reverzní transkripci/pyrosekvenaci, jestli ne, jednalo se o právě popisovanou změnu v oblasti primeru. Všechny alely, které jsme našli touto filtrací, jsme samozřejmě zahrnuli do výsledné tabulky.

Na této neshodě primeru a matrice se dá demonstrovat funkce speciálního termostabilního proteinu, který je obsažen v produktu FastStart High Fidelity PCR System, *Roche*. Tento enzym má funkci zpětně opravovat chyby, které způsobila FastStart Taq polymeráza. Jak již bylo zmíněno v publikaci od Wiseman a spol. (2009), tento enzym vykazuje lepší korekční aktivitu směrem k 3' konci. V Tabulka 17 - Alely se změnou v primeru můžete vidět tučně zobrazeny ty alely, které i přes chybný primer, byly amplifikovány částečně správně díky opravě pomocí termostabilního proteinu. Alely, které mají žluté pozadí, ale nejsou zobrazeny tučně, nebyly opraveny termostabilním proteinem v žádném čtení.

Touto opravou v primeru jsme získali 1766 čtení, která by jinak unikla naší pozornosti a mohla by vést k neúplné prezentaci výsledků.

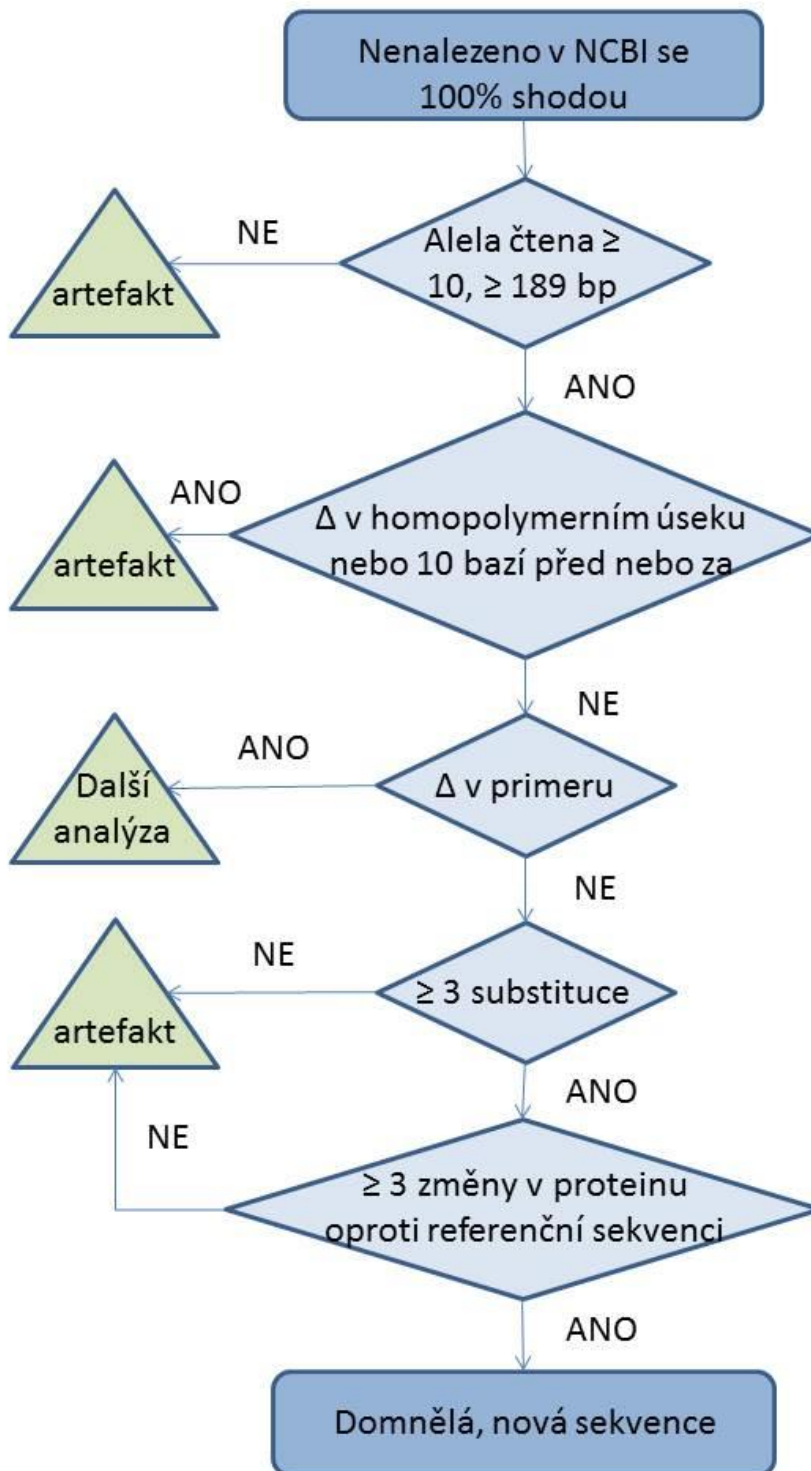
Dalším krokem v analýze nových sekvencí/artefaktů bylo odstranění všech čtení, která obsahovala méně nebo rovno 3 substituce.

Těmito filtračními kroky jsme vyfiltrovali 32 alel, které jsme dále převedli na protein, podobně jako to provedl Boštík a spol. (2009), a srovnali s referenčními alelami v databázi GenBank pomocí programu DNA Star LaserGene 11 a také pomocí webové aplikace UniProt (web UniProt, 2014). Jako novou alelu jsme brali alelu, která obsahovala více nebo rovno 3 změny oproti referenčnímu proteinu. Všechny alelické varianty, které prošly těmito filtračními kroky, jsme označili za novou alelu. Grafické vyobrazení postupu nalezení nových sekvencí můžete vidět v Obrázek 4 - Analýza nových alel.

Celkem jsme našli 11 nových alel. Alely jsme přiřadili dle jejich podobnosti ke genům a získali jsme tak 2 nové alely Mamu-A, označené Mamu-A*001nov - *002nov a 9 nových alel Mamu-B, označených obdobně Mamu-B*001nov - 09nov.

Nové alely se pohybovaly v procentuálním zastoupení od 0,14% do 1,50%. Nejvíce nových alel bylo nalezeno u vzorku S9 – RJI8 = 4 alely. Naproti tomu žádná nová alela nebyla nalezena u vzorků: S2 – RCv7, S4 – RAI11, S10 – RMI10, S11 – RFb9, S12 – REk11, S13 – RIz9 a S15 – Rky5.

Obrázek 4 - Analýza nových alel



Tabulka 17 - Alely se změnou v primeru

SBT190F class I primer	GCTACGTGGACGACACG	SBT190R class I primer	TCGCTCTGGTTGTAGTAGC
Mamu-A1*00410 (EU403493) G ..	Mamu-A1*01802 (AM295899)	. T
Mamu-A1*01909 (EU403495) A	Mamu-A1*02801like(AB444925)	. G
Mamu-A3*1309 (EF112556) G ..	Mamu-A1*05106 (EU403529) T
Mamu-B*01101 (U41838) T ...	Mamu-A2*0532 (EF112544) A .
Mamu-B*03801 (AJ556889) T	Mamu-B*00201 (U41833)	. T
Mamu-B*06601 (AJ844597) T	Mamu-B*00501 (U41827)	. T
Mamu-B*0680101 (AJ844599) A	Mamu-B*00502 (EU589240)	. T
Mamu-B*08601 (EF580166) A	Mamu-B*00701 (U41829) T .
Mamu-B*08602 (AM902582) A	Mamu-B*01401 (AM902540)	. T
Mamu-B*08603 (AM902583) A	Mamu-B*02102 (AM902536) T
Mamu-B*09801 (FJ544408)	. T	Mamu-B*03101 (EF602319) A
Mamu-E*010102 (EU934770) C	Mamu-B*03102 (EU589242) A
Mamu-E*0104 (EU305662) C	Mamu-B*03103 (EU934765) A
Mamu-E*0110 (EU109710) C	Mamu-B*0360101 (AJ556886)	CG
Mamu-E*0111 (EU109711) C	Mamu-B*0360102 (EU682518)	CG
Mamu-E*0112 (EU305658) C	Mamu-B*03602 (AJ556887)	CG
Mamu-E*0113 (EU305659) C	Mamu-B*05002 (AJ620415)	. T
Mamu-E*0114 (EU305660) C	Mamu-B*05201 (EF457755)	. G

Mamu-E*0115 (EU305661) C	Mamu-B*05601 (AM902562) A
Mamu-E*0116 (EU934771) C	Mamu-B*06101 (AJ556906)	. T
Mamu-E*0117 (FJ544410) C	Mamu-B*06102 (AM902564)	. T
Mamu-E*001:18 (GQ471890.1) C	Mamu-B*06102like(AB430442)	. T
Mamu-E*001:19 (HM106999.1) C	Mamu-B*07801 (EF611164)	. T
Mamu-E*0201 (EU109709) C	Mamu-B*09301 (AM902585) T .
Mamu-E*02 (U02979) C	Mamu-B*09801 (FJ544408) G
Mamu-E*030101 (EF611171) C	Mamu-E*0112 (EU305658)	A
Mamu-E*03 (U02980) C	Mamu-E*0113 (EU305659)	A
Mamu-E*04 (U02981) C	Mamu-E*0115 (EU305661)	A
Mamu-E*05 (U41837) C	Mamu-I*010603 (EU305656)	.. A
Mamu-E*06 (L41822) C		
Mamu-E*070102 (EF611170) C		
Mamu-E*07 (L41823) C		
Mamu-E*08 (L41824) C		
Mamu-E*0901 (EF611169) C		

Popis tabulky č.17: Tabulka je převzata od Wiseman a spol. (2009) a doplněna o dvě nové sekvence primeru, které jsou zobrazeny zeleně. Tabulka zobrazuje alely, u kterých je změna v části primeru a primer použitý v tomto experimentu se neshoduje. Konkrétní změny v primeru jsou zobrazeny ve vedlejším sloupci. Všechny žlutě podbarvené alely jsme nelezli v našich vzorcích. Alely, které jsou žluté a jsou zvýrazněny tučně, byly z části opraveny termostabilním proteinem.

6.1.5 Analýza chyb

Sekvence, které jsme neidentifikovali v databázi NCBI a neurčili jsme je jako novou alelu, jsme podrobili důkladnější analýze. Chybovost jsme určili taky ze sekvencí, čtených méně než 5x. Srovnali jsme tyto sekvence se známými referenčními alelami. Nalezli jsme změny v bázích, které představují delece, inserce a substituce oproti referenčním alelám. Delece byly nalezeny uvnitř homopolymerních úseků a společně s insercemi také v jejich okolí. Substituce byly nalezeny nerovnoměrně v různých částí sekvenovaného úseku. Často jsme našli chybu ihned za primery (v 2821 čteních za forward primerem u sekvencí čtených více nebo rovno 5x).

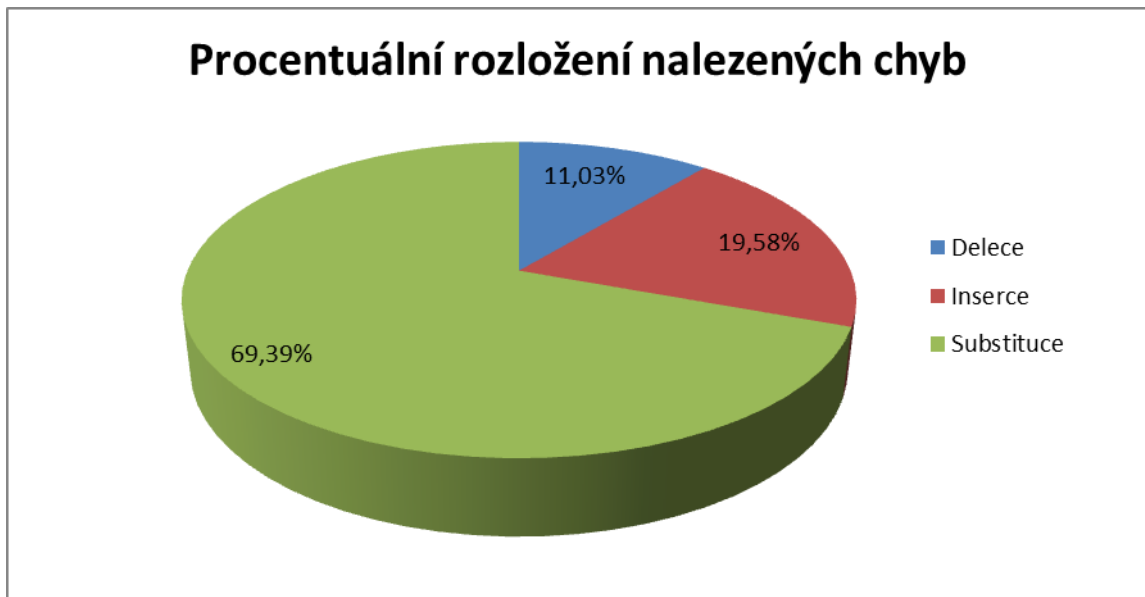
Delece představují 10,94 % z celkových chyb, inserce 18,33 % a substituce 70,73%. Celková chybovost metody činí 0,31 % z celkově čtených bází. Celková chybovost v počtu špatně přečtených čtení činí 39 489 = 31,17%.

Tabulka 18 - Analýza chyb

	Delece	Inserce	Substituce
Počet chybových bází	9 171	19 580	57 694
% chybových bází	11,03%	19,58%	69,39%
Procentuálně z celkově přečtených bází	0,03%	0,06%	0,22%
Celkový počet chybových bází	81 515 = 0,31%		

Celkově přečtených bází = počet bází přečtených GS Junior System po filtraci dle identifikátorů MID (počet bází bez MID) = 26 608 568 přečtených bází.

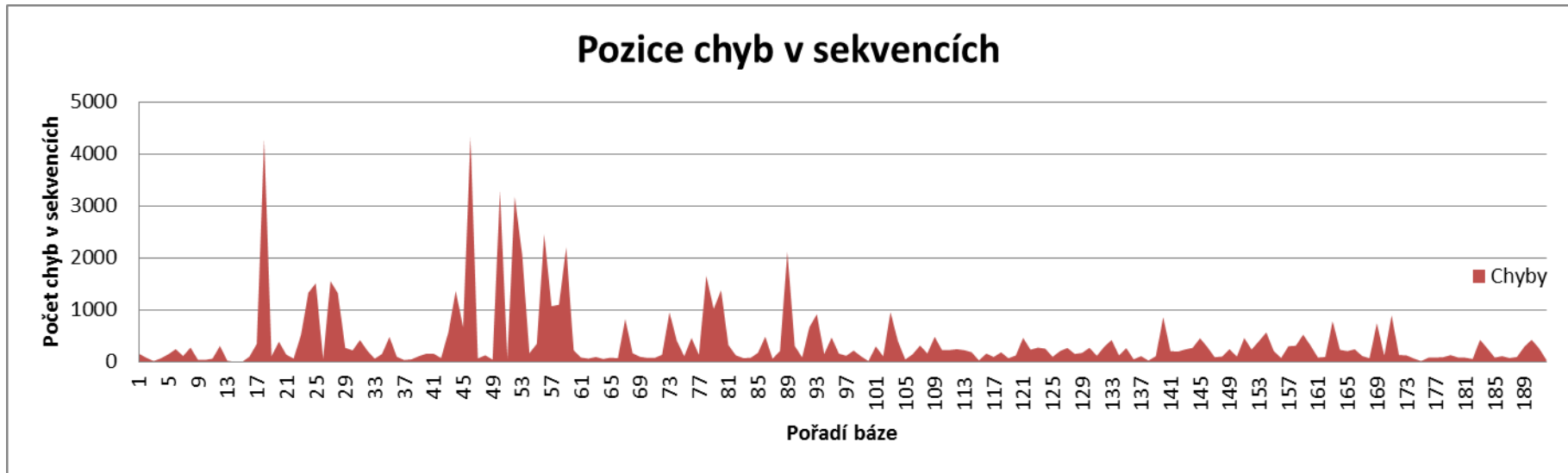
Graf 1 - Procentuální rozložení nalezených chyb



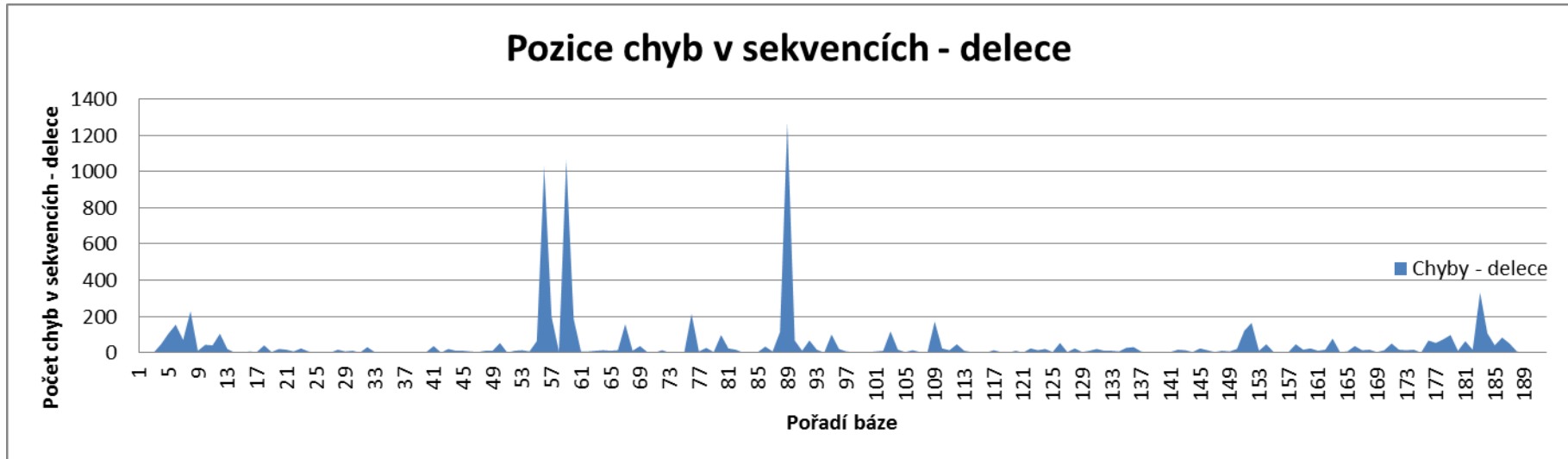
Zajímalo nás také, kde se jednotlivé chyby objevují nejvíce v závislosti na poloze v sekvenci. Vytvořili jsme grafy, kde je zobrazen počet chyb v závislosti na pozicích v sekvenci. Grafy jsou uspořádány od forward primeru a je zobrazen úsek 192 bp.

Graf 2 - Pozice chyb v sekvencích zobrazuje všechny nalezené chyby. Nejvíce chyb bylo identifikováno ihned za primer až do šedesáté pozice v sekvenci. Graf 3 - Pozice chyb v sekvencích - delece zobrazuje nalezené chyby způsobené delecemi. Delece se vyskytují v menší míře v obou úsecích primeru a nejvíce se vyskytují mezi 54. a 60. bází a okolo 89. báze. Graf 4 - Pozice chyb v sekvencích - inserce vyobrazuje nalezené inserce. Inserce se velice málo vyskytují v úsecích primeru, ale typicky se vyskytují před nebo za homopolymerními úseky, na rozdíl od delecí, které se častěji vyskytují v homopolymerních úsecích. Graf 5 - Pozice chyb v sekvencích - substitute zobrazuje nalezené substitute. Zpozorovali jsme, že ihned za úsekem forward primeru (17 bp dlouhý) se vyskytuje velmi významná chyba způsobená substitucí. V úsecích primeru (17 bp dlouhý forward primer, 19 bp dlouhý reverse primer) se substitute vyskytují velmi málo, naopak hodně substitucí bylo nalezeno v úseku mezi forward primerem a 81. bází.

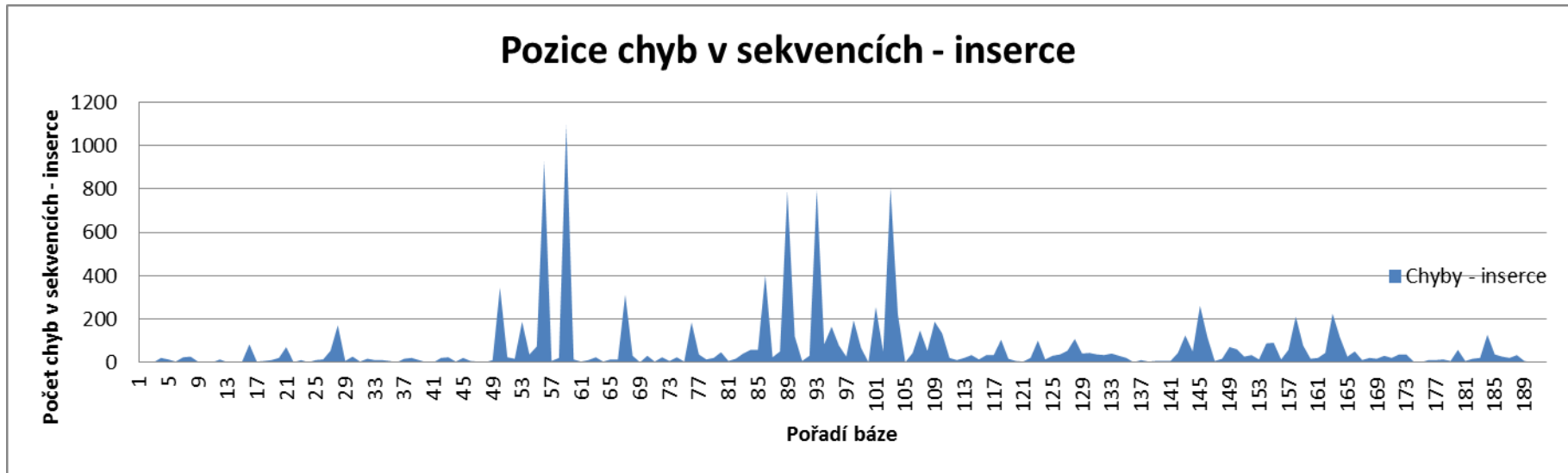
Graf 2 - Pozice chyb v sekvencích



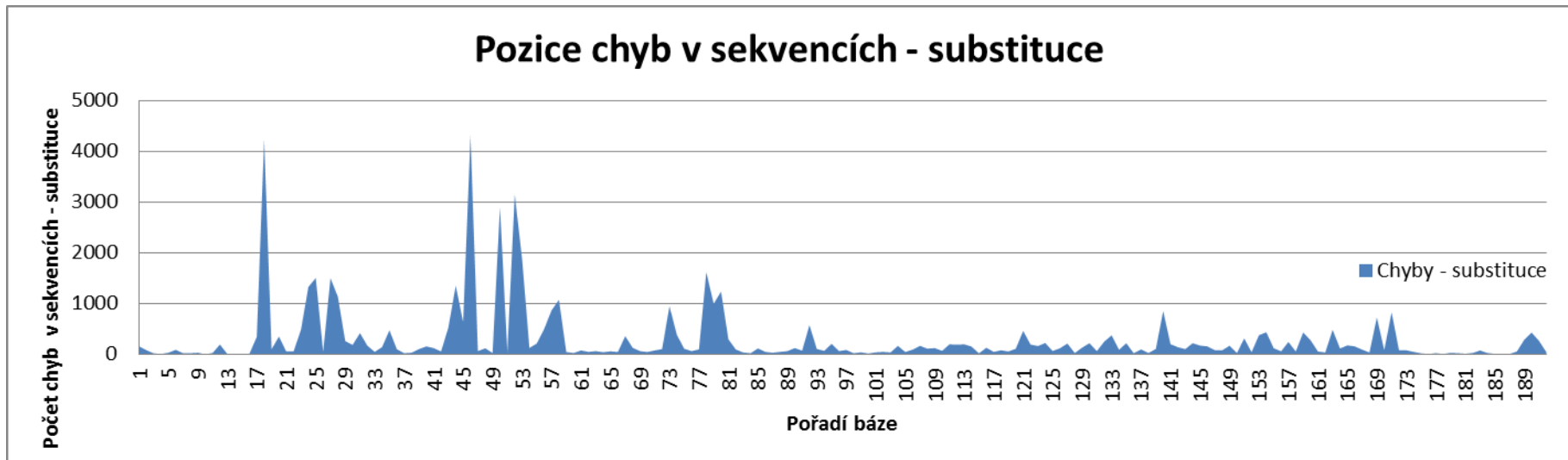
Graf 3 - Pozice chyb v sekvencích - delece



Graf 4 - Pozice chyb v sekvencích - inserce



Graf 5 - Pozice chyb v sekvencích - substituce



6.1.6 Srovnání jednotlivých alel u LVL a HVL makaků

Z vytvořené externí tabulky Externí tabulka 1 – Výsledná tabulka s alelami jsme vyfiltrovali všechny alelické varianty čtené více nebo rovno 4% alespoň u jednoho vzorku a označili je za majoritní alelické varianty. Všechny ostatní méně čtené alelické varianty byly označeny za minoritní alely.

Dále jsme vytvořili tabulku s majoritními alelickými variantami. Označili jsme, které majoritní alely jsou společné pro obě skupiny LVL a HVL, dále, které majoritní alely jsou přítomné jen v LVL skupině a jen HVL skupině (Tabulka 19 – Majoritní alely pro HVL a LVL).

Dále jsme provedli srovnání majoritních alelických variant LVL s alelickými variantami HVL. Porovnali jsme jednotlivé majoritní varianty a míru jejich exprese. Když se majoritní alelická varianta vyskytla u obou skupin LVL i HVL, porovnali jsme hodnotu její exprese, a když tento rozdíl expresí byl větší než 4%, alelická varianta byla zařazena do jedné ze dvou skupin dle toho, ze které pocházela skupiny. Pokud pocházela z LVL skupiny, byla zařazena mezi alely s předpokladem pro nižší virovou nálož. Oproti tomu když pocházela z HVL skupiny, byla zařazena do skupiny s předpokladem pro vyšší virovou nálož. Touto analýzou porovnáваме nejenom na základě podmínky ano/ne, ale také na základě míry exprese dané alely. Tato analýza nám dává přesnější údaje o typu alelické varianty. Výsledky shrnuje Tabulka 20 – Podrobná analýza majoritních alel pro HVL a LVL.

Všechny vzorky s jednotlivými alelickými variantami jsme srovnali pomocí Kullback-Leibler divergence (dále v textu už jen KL divergence). Tato analýza nám pomohla určit, jak jsou si vzorky navzájem podobné nejenom v majoritních alelách, ale také v minoritních a nově nalezených alelách. KL divergence má ve výstupu vždy kladné hodnoty. Čím menší je hodnota KL divergence, tím jsou si vzorky více podobné. Stanovili jsme hodnotu podobnosti KL divergence < 50 . Všechny vzorky, které měly hodnotu pod touto hranicí, jsme označili za podobné.

KL analýzou jsme zjistili, že následující dvojice vzorků jsou si podobny při kritériu KL divergence < 50 :

- S2 (LVL) : S5 (HVL)

- S3 (HVL) : S9 (HVL)
- S4 (HVL) : S13 (HVL)
- S7 (HVL) : S9 (HVL)
- S8 (LVL) : S14 (LVL)
- S12 (LVL) : S15 (LVL)

V tabulce Tabulka 21 – Kullback-Leibler divergence jsou zobrazeny všechny hodnoty, které vyšly z Kullback-Leibler divergence. Zeleně jsou vyznačeny hodnoty, které splnily kritérium podobnosti.

K jednotlivým dvojicím podobných vzorků jsme vytvořili grafy, které zobrazují míru exprese jednotlivých alelických variant. Každá alela je označena číslem. Seznam alel s přiřazenými čísly můžete nalézt v externí tabulce [Externí tabulka 1 – Výsledná tabulka s alelami](#).

Tabulka 19 – Majoritní alely pro HVL a LVL

Společné majoritní alely pro HVL a LVL	Majoritní alely pro LVL, které se nevyskytují v HVL	Majoritní alely pro HVL, které se nevyskytují v LVL
A1*001:01:01, A1*001:02, A1*001:06	A1*007:02, A*007:04	A1*003:01; A1*003:04 like, A1*003:05, A1*003:06:03, A1*003:07, A1*003:08, A1*003:09, A1*003:10, A1*003:14, A1*003:15, A1*003:16, A1*021:02
A*002:01	A1*019:01, A1*019:02, A1*019:05, A1*019:07, A1*019:10, A1*019:11, A1*019:13, A1*019:18, A1*019nov, B*111:01	A1*007:03, A*007:05; A*007:06
A1*003:02	B*041:01	A1*023:02, A1*023:01, A1*106:01
A1*004:01:01, A1*004:01:02, A1*004:01:03, A1*004:02:01, A1*004:02:02, A1*004:02:03, A1*004:04, A1*004:06, A1*004:08, A1*004:09, A1*004:11, B*11201	B*047:01, B*047:05	A2*024:01
A1*008:01:02; A1*008:02, A1*113:01	B*048:01	A*013:01, A3*013:02, A*013:04, A3*013:06, A3*013:07, A3*013:13, A4*014:06, AA4*014:11
A*12	B*065:01	B*001
A1*028:04, A1*028:05, A1*028:07	B*069:01	B*005:01, B*005:02
A4*014:03, A4*014:05, A4*14:w:06, A4*014:06, A4*014:09	B*072:01:01, B*072:02, B*072:04, B*072:05, B*072:06, B*072:nov:07	B*007:02, B*007:03, B*007:04, B*007:05, B*007:06, B*007:07
B*002:02	B*082:02	B*027:03, B*027:04
B*012		B*030:02, B*030:05
B*019:01:01, B*019:01:02, B*019:03, B*019:05, B*019:06, B*019nov		B*040:01:02, B*040:02, B*124:01, B*015:04
B*022:01		B*052
B*024:01		B*055:01
B*028:01		B*058:02
B*029:01:01; B*029:01:02		B*060:01, B*060:02, B*060:w:02, B*060:04
B*030:03, B*030:04, B*030:06		

Popis tabulky č. 19: V této tabulce jsou zobrazeny všechny alely přítomné ve vzorcích ve více jak 4% = majoritní alely.

Tabulka 20 – Podrobná analýza majoritních alel pro HVL a LVL

LVL - alelické varianty s předpokladem pro nižší virovou nálož	HVL - alelické varianty s předpokladem pro vyšší virovou nálož
A1*004:01:01, A1*004:01:02, A1*004:01:03, A1*004:02:01, A1*004:02:02, A1*004:02:03, A1*004:04, A1*004:06, A1*004:08, A1*004:09, A1*004:11, B*11201	A1*003:01; A1*003:04 like, A1*003:05, A1*003:06:03, A1*003:07, A1*003:08, A1*003:09, A1*003:10, A1*003:14, A1*003:15, A1*003:16, A1*021:02
A1*007:02, A*007:04	A1*003:02
A1*019:01, A1*019:02, A1*019:05, A1*019:07, A1*019:10, A1*019:11, A1*019:13, A1*019:18, A1*019nov, B*111:01	A1*007:03, A*007:05; A*007:06
B*029:01:01; B*029:01:02	A1*023:02, A1*023:01, A1*106:01
B*041:01	A2*024:01
B*047:01, B*047:05	B*005:01, B*005:02
B*048:01	B*028:01
B*065:01	B*040:01:02, B*040:02, B*124:01, B*015:04
B*069:01	B*052
	B*055:01
	B*058:02

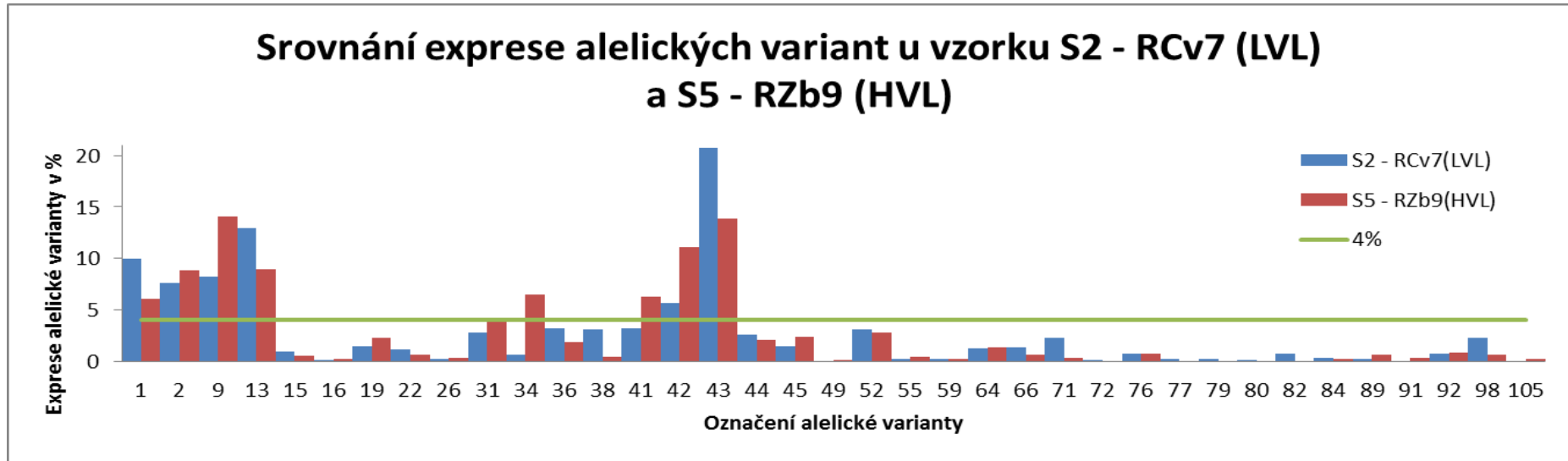
Popis tabulky č. 20: V tabulce č. 20 jsou zobrazeny alely, které jsou výsledkem porovnávání jednotlivých alel zastoupených ve vzorku ve více jak 4%. Zároveň se vyskytují jenom v LVL nebo jenom HVL skupině, a když se vyskytují v obou skupinách, tak rozdíl mezi nimi musí být více jak 4%. Ve sloupci LVL jsou zobrazeny alely, které na základě analýzy mají předpoklad příznivě ovlivnit vývoj HIV/SIV infekce u makaků. Ve sloupci HVL jsou zobrazeny alely, které na základě analýzy mají předpoklad spíše nepřiznivě ovlivnit vývoj infekce HIV/SIV.

Tabulka 21 – Kullback-Leibler divergence

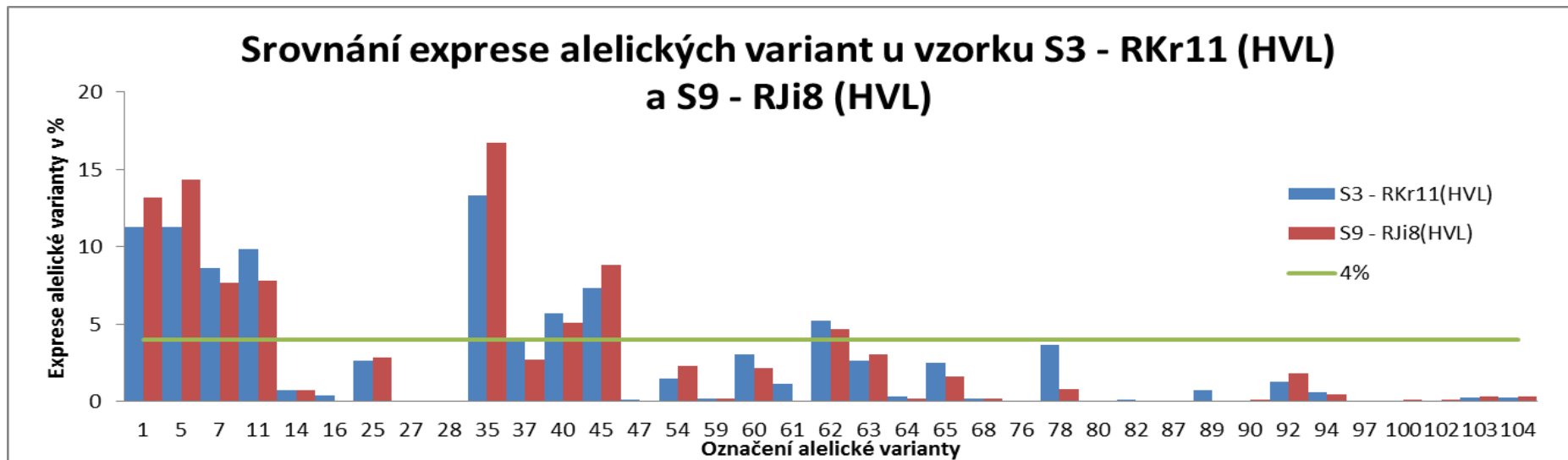
Kullback-Leibler divergence mezi jednotlivými vzorky a expresí jejich alel															
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
S1	0	243,06	122,79	142,6	246,54	149,24	106,53	223,05	123,36	249,22	81,1	239,76	158,39	214,9	238,75
S2	187,99	0	153,26	149,02	29,23	156	144,85	141,94	162,7	146,63	163,34	147,35	160,29	142,45	147,43
S3	108,17	149,91	0	62,78	155,34	162,63	62,87	111,63	21,02	158,87	76,89	147,96	78,09	92,87	140,21
S4	133,59	148,69	74,3	0	153,59	133,31	64,16	134,15	86	70,48	107,63	98,4	20,95	127,45	96,58
S5	188,32	29,43	161,04	154,04	0	138,81	142,2	144,06	172,4	148,52	160,51	156,67	164,43	157,5	157,48
S6	164,17	160,89	177,29	151,24	143,86	0	136,07	201,06	181,69	163,71	152,99	218,74	175,33	211,88	219,18
S7	95,18	162,71	58,71	57,6	159,23	147,79	0	120,28	56,94	125,54	55,98	135,43	79,57	116,28	137,01
S8	165,14	124,81	96,36	121,51	129,37	159,54	106,53	0	107,48	125,36	123,25	75,64	122,76	24,55	84,83
S9	99,11	157,09	10,8	64,09	163,66	165,63	45,31	114,2	0	172,78	66,25	148,81	85,13	101,65	151,68
S10	277,86	250,03	262,07	106,98	255,78	212,58	143,1	244,85	275,39	0	250,19	177,85	130,91	242,7	172,55
S11	118,48	253,11	131,43	172,08	251,13	221,31	109,71	179,34	133,12	246,72	0	249,25	168,84	161,08	250,17
S12	226,15	178,63	176,31	124,27	189	227,3	142,6	135,13	190,75	140,21	199,84	0	126,36	142,96	8,97
S13	136,07	143,45	72,87	12,06	149,1	143,68	74,94	123,14	90,17	76,3	109,56	84,24	0	125,15	81,4
S14	152,47	129,45	90,72	113,06	139,71	163,15	112,16	29,22	109,97	125,53	102,61	99,47	122,71	0	98,03
S15	225,29	180,66	175,47	118,81	190,86	224,45	142,36	148,14	191,49	134,25	200,39	8,44	119,86	153,51	0

Popis tabulky č.21: V tabulce č. 21 se porovnávají všechny jednotlivé alely, jak v minoritním tak v majoritním zastoupení (více jak 4%), u daných vzorků mezi sebou. Kullback-Leibler divergence poskytuje hodnotu podobnosti mezi vzorky. Hodnota podobnosti je stanovena na menší nebo rovno 50 - ti. Zeleně jsou zvýrazněny všechny vzorky, které mají hodnotu menší nebo rovno 50 - ti a jsou si podobné.

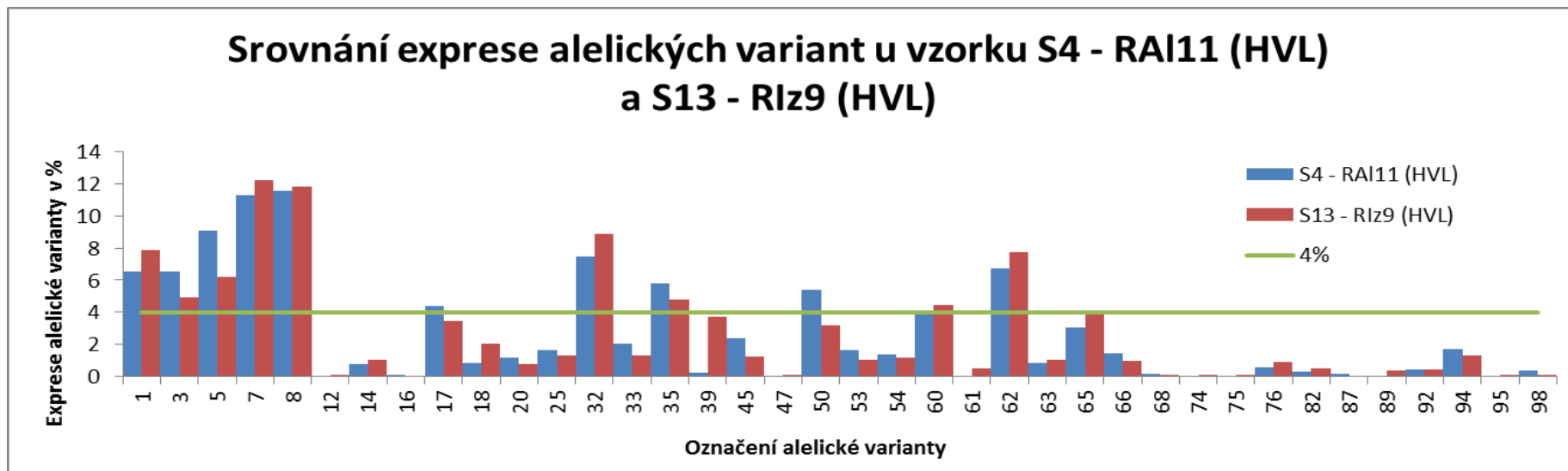
Graf 6 - Srovnání exprese alelických variant u vzorku S2 - RCv7 (LVL) a S5 - RZb9 (HVL)



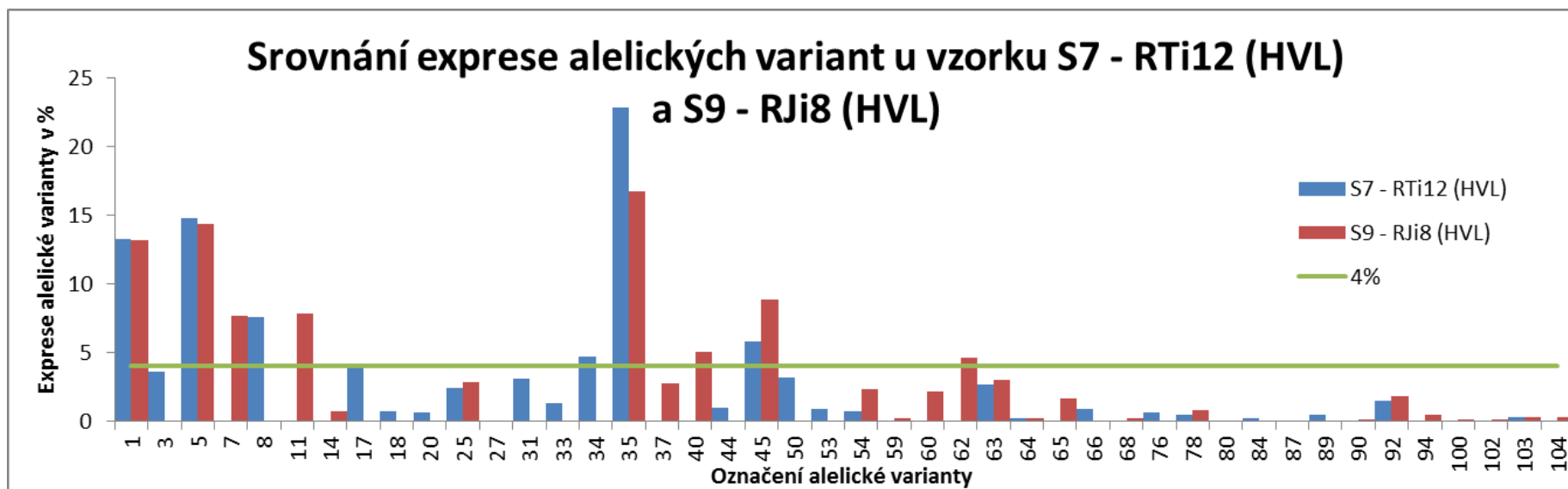
Graf 7 - Srovnání exprese alelických variant u vzorku S3 - RKr11 (HVL) a S9 - R Ji8 (HVL)



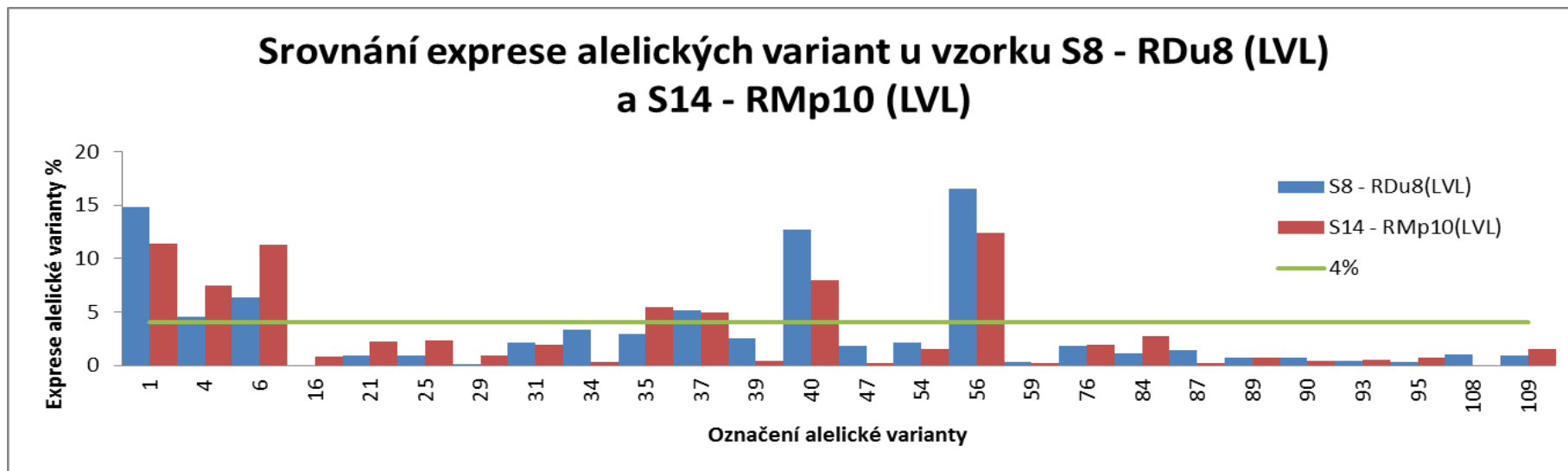
Graf 8 - Srovnání alelických variant u vzorku S4 - RAI11 (HVL) a S13 - RIz9 (HVL)



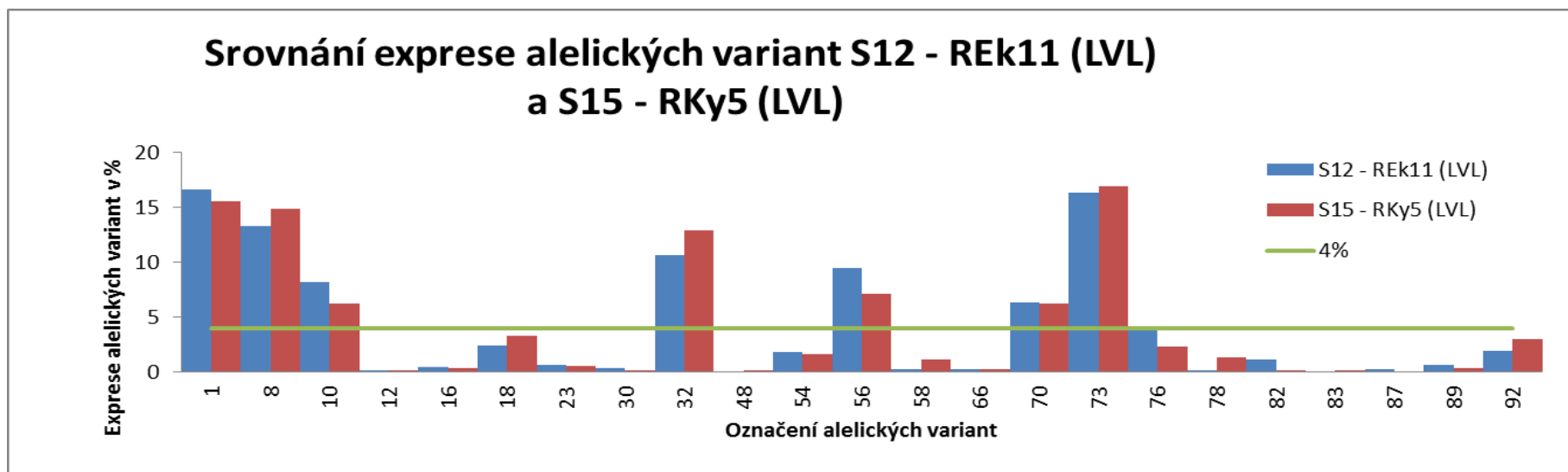
Graf 9 - Srovnání exprese alelických variant u vzorku S7 - RTi12 (HVL) a S9 - RJI8 (HVL)



Graf 10 - Srovnání exprese alelických variant u vzorku S8 - RDU8 (LVL) a S14 - RMP10 (LVL)



Graf 11 - Srovnání exprese alelických variant S12 - REK11 (LVL) a S15 - RKY5 (LVL)



7 Diskuse

7.1.1 Srovnání makaků s odlišným vývojem onemocnění

V našem experimentu jsme využili jednu z nových metod Next Generation Sequencing = NGS (=„sekvenování další generace“). Použili jsme přístroj od firmy *Roche* GS Junior System, který využívá metodu pyrosekvenování. Tento přístroj dovoluje nasekvenovat až 500 bp v jednom čtení. Výhoda tohoto přístroje oproti klasické Sangerově metodě sekvenování je, že nám dovoluje odhalit i méně frekventované alely a získat informaci o poměrném zastoupení dané alely ve vzorku. Dlouhodobým záměrem vědců na celém světě, je odhalit kompletní paletu MHC molekul I. třídy u makaků. Znalost kompletní sady MHC I. molekul by pomohla pochopit mechanismy přirozené imunity při rozvoji celé řady onemocnění.

My jsme se zaměřili na MHC molekuly I. třídy u 15 makaků rhesus, kde 14 z nich bylo infikováno virem SIV239 a jeden byl infikován kombinovaným virem SHIV clade 3. Tyto makaky jsme rozdělili do dvou skupin dle virové nálože a průběhu onemocnění a porovnávali jsme přítomnost a zastoupení jednotlivých alel a alelických variant. V každém z patnácti vzorků jsme identifikovali alely a alelické varianty MHC molekul I. třídy.

Porovnali jsme navzájem LVL a HVL skupinu. Srovnali jsme jednotlivé vzorky a jejich majoritní alely, porovnali jsme nalezené haplotypy a nakonec jsme porovnali pomocí Kullback-Leibler divergence jak majoritní tak i minoritní alely mezi vzorky.

Na základě předchozích poznatků, které napovídají, že jenom alely přítomné v majoritním zastoupení mají vliv na akutní fázi rozvoji SIV infekce (Budde a spol., 2011), jsme se rozhodli porovnat majoritní alely mezi skupinami LVL a HVL. Majoritní alely musí být ve vzorku zastoupeny ve více jak 4%. Tabulka 19 – Majoritní alely pro HVL a LVL uvádí majoritní alely společné pro LVL a HVL skupinu, majoritní alely zastoupené jen v LVL skupině a majoritní alely zastoupené jen v HVL skupině. Zobrazené majoritní alely představují schéma, ze kterého můžeme dále vycházet pro determinaci typu alely. Naše snaha je odhalit, které alely a jejich alelické varianty mají

vliv na rozvoj infekce SIV. Snažíme se najít určitou spojitost ve skupině a odlišnosti ve skupinách LVL a HVL.

Provedli jsme další podobnou analýzu majoritních alel, která se mírně odlišovala od předchozí analýzy. Analýza stavěla nejenom na základě přítomnosti či nepřítomnosti majoritních alel ve skupinách, ale počítala také s procentuálním vyjádřením majoritních alel. Tabulka 20 – Podrobná analýza majoritních alel pro HVL a LVL vykazuje pár změn v zastoupených alelách oproti předchozí analýze. Tato tabulka má znázorňovat majoritní alely, u kterých předpokládáme větší míru jistoty v tom, že by mohly působit na rozvoj (zpomalení/zrychlení) infekce SIV. V tabulce můžete vidět zobrazené alely, u kterých předpokládáme, že mají vliv na rychlejší nebo pomalejší průběh onemocnění. Náš předpoklad je, že čím více je alela zastoupená u jedince, tím více má šanci ovlivnit průběh onemocnění. Na tyto alely se chceme v budoucnu více zaměřit a prohloubit naše poznatky o působení těchto alel.

V předchozí analýze jsme srovnávali jednotlivé majoritní alely mezi sebou. Chtěli jsme dále zjistit, jak se podobají jednotlivé vzorky ve všech alelách. Provedli jsme analýzu Kullback-Leibler divergencí, která nám poskytla informaci o celkové podobnosti vzorků. Překvapivě jsme zjistili, že některé ze vzorků ze dvou skupin LVL a HVL jsou si podobné. Konkrétně se jedná o S2 - Rcv7 (LVL) a S5 - Rzb9 (HVL). Hodnota podobnosti u těchto dvou vzorků vyšla 29,43 a 29,23. My jsme stanovili hodnotu podobnosti pod 50. Tyto dva podobné a na druhou stranu odlišné vzorky naznačují, že míra exprese jednotlivých alel může mít významný vliv na průběh onemocnění. Graf 6 - Srovnání exprese alelických variant u vzorku S2 - RCv7 (LVL) a S5 - RZb9 (HVL) ukazuje, že tyto dva vzorky se sice podobají v jednotlivých alelách, ale významně se liší v alelách zastoupených ve větší míře.

Dalším krokem v porovnání jednotlivých vzorků bylo zjištění podobnosti vzorků na základě haplotypu. Každý vzorek je definován haplotypem, který definuje daný vzorek souborem majoritních alel. Porovnání na základě haplotypu nám dává určitou představu o komplexním působení majoritních alel na průběh onemocnění a nesoustředí se jenom na jednotlivé majoritní alely. Podobnost haplotypů jsme našli jenom uvnitř jednotlivých skupin LVL a HVL. Ve skupině LVL jsme našli dva haplotypy sdílené 4 vzorky a v HVL skupině jsme našli obdobnou situaci (Tabulka 16 -

Haplotypy). Tabulku pro definování haplotypů jsme přejali od Karl a spol. (2013). Pomocí haplotypů lze také srovnávat jednotlivé vzorky mezi různými druhy makaků (Karl a spol., 2013) a mít tak větší přehled o zastoupení majoritních alel.

7.1.2 Určování názvu alel dle nové a staré nomenklatury pro MHC I.

Během let se do MHC databází přidávaly nové objevené alely a pojmenovávaly se dle tehdejší nomenklatury (Klein a spol., 1990). S postupně se zvětšujícím se objemem objevených alel bylo nutné upravit tuto nomenklaturu. Pravidla pro pojmenovávání nových alel se změnila, avšak již vložené alely se nepřejmenovaly dle aktuální nomenklatury. V databázi GenBank v NCBI stále můžete nalézt jména starých a nových alel vedle sebe. Aktuálně se skupina vědců spravujících databázi Immuno Polymorphism Database = IPD snaží sjednotit tyto staré názvy alel s aktuálními názvy dle platné nomenklatury (Robinson a spol., 2011; Marsh a spol., 2010) a eliminovat stejné alely s různými názvy.

V současnosti je k dispozici více databází pro MHC molekuly I. třídy. Oficiální databáze pro nižší primáty, která se specializuje na MHC je Immuno Polymorphism Database = IPD. My jsme využili databázi Genbank spravovanou na NCBI pro pojmenování našich alelických variant. Po „blastování“ našich vzorků pomocí programu blast+ 2.2.25. jsme se pokusili ke každé nalezené alelické variantě přiřadit její oficiální název. V databázi GenBank v NCBI se nacházejí alely, které kódují minimálně 2 exony a více. Jelikož naše vzorky obsahují zhruba 190 bp (kódují exon 2) bylo přiřazení správného názvu poněkud komplikované. Rozhodli jsme se pojmenovat naše alelické varianty podle všech aktuálních názvů v databázi GenBank v NCBI, které se shodovaly s našimi variantami. Z tohoto důvodu naše alelické varianty nemají většinou jenom jeden název.

Získali jsme názvy alelických variant z databáze GenBank v NCBI, která je úzce spjata s databází IPD. Databáze GenBank v NCBI obsahuje více dat než databáze IPD. Rozdíl mezi těmito dvěma databázemi tkví v tom, že většinou v IPD jsou dané alely a alelické varianty opravdu ověřeny a obsahují i odkazy na vědecké publikace. Avšak pro pojmenování alel je výhodnější použít GenBank, jelikož tam se nacházejí aktuálně známá data. Jak již bylo zmíněno výše, našli jsme jak alely pojmenované dle aktuální

nomenklatury (2014), tak i dle starší nomenklatury. Všechny názvy použité pro pojmenování našich alelických variant jsme upravili dle současné nomenklatury do tvaru: Mamu-X*000:00:00.

Pro některé alelické varianty jsme našli nejenom více podobných pojmenování, ale také některé názvy se vůbec neshodovaly s ostatními názvy. Problém tkví právě v starých a nových jménech pro alely. Např. alela Mamu - B*040:01:02 je starý název pro alelickou variantu jejíž nový název je Mamu - B*015:04. Databáze pro sestavení platného seznamu MHC alel, která by také sjednocovala tyto staré - nové názvy, ještě není dokončena. V naší tabulce jsme proto použili všechny názvy alel, kterými byla pojmenována konkrétní alela v databázi GenBank v NCBI.

Paralelní existence více nomenklatur vytváří určitý zmatek v pojmenování alel. Největší problém vidíme v tom, že někdy se staré a nové jména pro stejnou sekvenci liší markantně a z názvu není možné zjistit, že tyto dva názvy pojmenovávají stejnou alelu. Řešení by mohlo být už v probíhajícím procesu sjednocení všech těchto názvů, které je v běhu na IPD (Robinson a spol., 2011; Marsh a spol., 2010).

7.1.3 Analýza nových sekvencí

Po BLAST analýze jsme získali dvě skupiny alel. Jedna skupina představovala nalezené alely v databázi GenBank v NCBI a druhá skupina představovala nenalezené alely v databázi GenBank v NCBI. Nenalezené alely obsahují jednu či více změn oproti referenční sekvenci. Změny mohou být chyby vzniklé při této metodě anebo nové sekvence. Vypracovali jsme algoritmus pro nalezení nových alel. Snažili jsme se vypracovat postup, který by co nejvíce eliminoval a identifikoval chyby vzniklé při celém procesu sekvenování a zároveň odhalil případné nové alely.

Na základě zkušeností ostatních vědců, jsme použili několik již ověřených filtračních kroků k odhalení artefaktů/nových alel. Wiseman a spol. (2009) použili pro označení nových alel algoritmus: A) alela není příliš podobná již předchozím objeveným alelám a B) detekována ve více jak deseti čteních anebo C) detekována u více jedinců. Zhodnotili jsme tento postup a zvážili, které kroky by byly vhodné v našem případě. Nutno podotknout, že Wiseman a spol. (2009) provedli pyrosekvenaci také s druhem makak cynomolgus. Makak cynomolgus se používá pro zjištění přesnosti

pyrosekvenace, pochází totiž z velmi izolované oblasti a obsahuje již velmi dobře definované MHC molekuly I. třídy (Wiseman a spol., 2009). Tímto krokem si Wiseman a spol., 2009 ověřili přesnost pyrosekvenování a dokázali tak s větší jistotou interpretovat nové sekvence.

Wiseman a spol. (2009) neupřesnili konkrétně, co pro ně znamená definice: „ne příliš podobné známým alelám“. My jsme definovali novou alelu, že musí obsahovat více nebo rovno 3 změny oproti referenční sekvenci. Přitom jsme vyloučili, že tato změna nesmí být v homopolymerním úseku ani v jeho blízkosti 10 míst před a 10 míst za homopolymerním úsekem (více o homopolymerním úseku v kapitole Analýza chybových čtení).

Kritéria B a C jsme převzali od Wiseman a spol. (2009) a trochu je upravili. Jako novou sekvenci jsme považovali tu alelu, která byla čtena nejméně 10x a kritérium C jsme považovali jenom za výhodné. Když domnělá alela byla přítomná ve více vzorcích, znamenalo to pro nás větší jistotu, že tato alela nevznikla jenom součtem chyb.

Analýzu nových alel doplňuje ještě několik dalších kritérií, které z našeho pohledu mají důležitý význam pro rozpoznání nové alely od artefaktu. Dalším kritériem, které jsme zvolili, bylo, že alela musí obsahovat minimálně 189 bp, a že změna není obsažena v oblasti primerů.

Po sérii filtračních kroků jsme přistoupili k podrobné analýze jednotlivých nově objevených alel. Zpozorovali jsme, že po „blastování“ byla u některých alel dosazena jako referenční sekvence sekvence jiného živočišného druhu. Většinou se jednalo o nižší a vyšší primáty. Alely, které obsahovaly jako referenční sekvenci jiný živočišný druh, jsme vyloučili. Dá se ale říci, že všechny alely, které nedosáhly minimálně 189 bp měly jako referenční sekvenci sekvenci jiného živočišného druhu.

Pro další krok filtrace, jsme převedli všechny domnělé, nové sekvence na protein, obdobně jak to provedl Boštík a spol. (2009). Odstranili jsme všechny sekvence, ve kterých byl objeven předčasný stopkodon. Nakonec jsme jako nové alely určili všechny alely, které obsahovaly 3 a více změn v aminokyselinách oproti jejich referenčnímu proteinu. Tímto jsme získali 11 alel, které se jeví jako dosud neobjevené sekvence.

Rozeznat novou alelu od artefaktu je složitý proces, který vyžaduje důsledné promyšlení celého procesu. Pro potvrzení našich nových, domnělých alel je potřeba provést ještě další experiment s GS Junior se stejnými vstupními daty a potvrdit je při další pyrosekvenaci. Vhodné by bylo provést další dvě pyrosekvenace nezávisle na dvou dalších přístrojích GS Junior. Až tehdy si budeme více jisti, jestli tyto alely jsou pravdivé či vznikly jako souhra náhod.

Sangerova metoda sekvenování nám dovoluje ověřit přesnost přístroje GS Junior. Sangerovou metodou však získáme jenom alely, které jsou vyjádřené u jedince v největším zastoupení a nové alely, které jsou zastoupené většinou v minoritním zastoupení, uniknou naší pozornosti.

Wiseman a spol. (2009) provedli analýzu MHC I. molekul u makaků druhu cynomolgus s rodokmenem. Sekvenovali MHC I. molekuly pomocí GS platformy u rodičů a jejich potomstva. Získali tak přehled o distribuci alel mezi potomky a ověřili také, které minoritní alely jsou pravdivé a které pocházejí z procesu reverzní transkripce či PCR a jsou tedy chyby metody.

Další možností jak ověřit nalezená data je zkombinovat naši metodu se sekvenováním pomocí Illumina MiSeq sequencing. Kombinaci GS platformy a Illumina sekvenování použili již Dudley a spol. (2014), kteří takhle srovnali data z 6 makaků. Illumina sekvenování dovoluje nasekvenovat krátké úseky genetické informace. Sekvence z GS Junior byly použity jako matrice, ke kterým se následně zarovnal krátké úseky z Illumina sekvenování. Touto metodou získali velmi validní data a ukázali tak i nový způsob, jak dále ověřit získaná data.

Pro vkládání nově nalezených alel do databáze IPD existují určitá pravidla (Requirements for Inclusion of Sequences into the Non-Human Primate (NHP) Database). Bohužel tato pravidla neurčují, jak má být provedena analýza nových alel. V průběhu let vědci vkládali do databáze nové alely dle svých kritérií pro nové alely. Bohužel, kritéria pro analýzu nových alel si většinou každý tým vědců stanovil jinak. Bylo to z více důvodů. Jednak každý tým měl trochu jinou metodu nebo přístroj, na kterém analyzoval vzorky. Také je to z toho důvodu, že ne každý tým zveřejnil způsob analýzy nových alel ve své publikaci a tak ostatní vědci nemohli převzít již použitou metodu. V našem experimentu jsme se pokusili analyzovat tyto nové sekvence dle dat

poskytnutých ostatními vědci. Naše nové sekvence nebyly vloženy do GenBank, protože nespĺňujú súčasné kritéria pro vkládání nových alel do databáze (k 17. 02. 2014). V databázi GenBank nyní existuje 1197 alel pro MHC I. a II. třídu (17. 02. 2014) a každým dnem přibývají další. Měla by se však sjednotit kritéria pro vyhodnocování nových alel získaných různými způsoby sekvenování. Jenom tak se získají validní data, která budou sloužit k dalšímu studiu.

Zvolená kritéria pro nalezení nových alel, jsme částečně převzali z již publikovaných experimentů a částečně jsme je doplnili o naše vlastní poznatky. Díky zvoleným kritériím jsme například úplně vyloučili všechna čtení, která obsahují 1 anebo 2 změny oproti referenčním sekvencím. Toto může vést k podhodnocení našich výsledků. Bohužel, díky velké chybovosti GS Juniora a dosud neúplné znalosti příčin vzniku těchto chyb, nemůžeme tyto výsledky ani nadhodnotit.

7.1.4 Analýza chybových čtení

Pro zjištění chybovosti přístroje GS Junior System je nutné analyzovat jednotlivé chybové čtení a identifikovat chyby. U přístroje GS Junior byly dobře identifikovány chyby v blízkosti a v homopolymerních úsecích (Pětrošová, H., 2009). Tyto chyby představují inserce a delece, které následně vyústí v posun čtecího rámce. My jsme identifikovali celkově 9 171 delecí v bazích, což představuje 11,03 % z celkového počtu chyb a 0,03 % z celkového počtu bazí. Dále 16 275 insercí což představuje celkově 19,58 % z celkového počtu nalezených chyb a 0,06 % z celkového počtu bazí. Jak již zmínil Gilles a spol. (2011) celková chybovost metody a přístroje závisí na více faktorech. Ve své publikaci Gilles a spol. (2011) uvádí tyto faktory: A) délka sekvenovaného úseku, B) přítomnost homopolymerních úseků, C) lokalizace produktu na PicoTiter Plate destičce, D) původ sekvence, E) vzdálenost kuliček od centra kamery. Chybovost přístroje a metody se tedy nedá stanovit obecně, vždy záleží na mnoha faktorech, které ovlivňují celý proces.

Gilles a spol. (2011) testovali chybovost a přesnost přístroje GS – FLX Titanium použitím referenčních sekvencí dodaných firmou *Roche*. Nemuseli však provést PCR reakci, kterou my jsme provedli pro amplifikaci cDNA. Tento přídatný krok PCR výrazně ovlivňuje výslednou chybovost. My jsme ještě vyloučili všechna čtení, která

neobsahovala identifikátory MID na začátku a konci čtení. Tím se naše chybovost může dále zkreslit. Chybovost nalezená u referenčních sekvencí v experimentu od Gilles a spol. (2011) u sekvencí do 101 bp byla u delecí 0,232 % a u insercí 0,273 % z celkového počtu přečtených bazí. Tímto se dá demonstrovat, že poměr nalezených chyb inserce/delece je přibližně stejný, avšak velmi záleží právě na analyzovaných vzorcích a také na počtu vyloučených neúplných sekvencí.

Chyby v homopolymerních úsecích také často korespondují s číslem Quality score. U chyb v homopolymerních úsecích se hodnota Quality score pohybovala většinou pod 20. Z hodnoty Quality score se ale nedají vyhodnotit všechny chybové báze. Chyby způsobené PCR, reverzní transkripcí a i některé chyby způsobené pyrosekvenací se nemusí vůbec projevit v hodnotě Quality score.

Nejvíce chyb v našich vzorcích představovaly substituce. Nalezli jsme substituce v 57 694 bazích, což je 69,39 % chyb z celkového počtu chybových bazí a z celkového počtu bazí to představuje 0,22 %. Většinou u přístroje GS Junior představují substituce nejmenší skupinu chyb (Pětrošová, H., 2009). Za substituce jsou většinou zodpovědné metody jako je PCR a reverzní transkripce. Proto se také používají enzymy, které by měly co nejvíce eliminovat vznik těchto chyb. Vhodné je také snížit počet PCR cyklů na minimum (Karl, J. A., 2013). V našem případě jsme použili pro amplifikaci cDNA FastStart High Fidelity PCR System, který navíc obsahuje termostabilní protein, který má zpětnou korekční funkci. I tak jsme získali obrovské množství substitucí v našich čteních. High fidelity Taq polymeráza má chybovost 4.4×10^{-7} . Vypočítaná procentuální chybovost u našeho produktu PCR je 0,3432 % při použitých 30 cyklech PCR pro produkt o délce 260 bp (web PCR fidelity calculator, 2014). Teoretická chybovost tedy vychází 91 320 chybových bazí. V našem experimentu jsme našli substituci v 57 694 bazích z celkového počtu nasekvenovaných bazí (26 608 357).

Wiseman a spol., 2009 použili pro amplifikaci cDNA 23 cyklů PCR a následně vždy ověřili daný produkt na gelu, jestli je dostatečný či ne. V případě, že neměli dostatečný produkt, provedli dalších 3-6 cyklů PCR. V našem případě jsme rovnou použili 30 cyklů PCR. Po 30 cyklech PCR jsme získali dostatečný produkt pro další kroky v našem experimentu. Získali jsme ale oproti ostatním experimentům největší chybovost právě v substitucích. Chtělo by to zvážit použití méně cyklů PCR pro snížení

chybovosti v substitucích. Například při snížení PCR cyklů na 25 bychom dostali vypočítanou procentuální chybovost při PCR reakci 0,286 %.

Nalezli jsme pár substitucí, které se výrazně odlišovaly od ostatních substitucí. Odlišovaly se právě ve vysokém počtu nalezených substitucí v dané pozici sekvence. Jedná se o pozici ihned za forward primerem, konkrétně na pozici osmnácté báze. Nalezli jsme celkem 4250 substitucí oproti referenci v této pozici. Další z těchto pozic jsou pozice 46. - 4343 substitucí, 50. - 2907 substitucí a 52. - 3158 substitucí. Můžeme předpokládat, že nové alely budou mít změnu právě v těchto pozicích, nebo že se jedná o velmi specifickou chybu metody.

Celkový počet chybových čtení v našem experimentu je $39\,489 = 31,17\%$. Gilles a spol. (2011) uvádí celkový počet chybových čtení 32,43% u sekvencí do 101 bp. Naše procentuální chybovost ve čteních je podobná jako uvádí Gilles a spol. (2011). My jsme však měli produkt o délce 190 bp. Již bylo dříve ověřeno, že se zvětšující se délkou sekvenovaného úseku pomocí GS přístroje, vzrůstá také chybovost (Gilles a spol., 2011). Naše chybovost byla měřena jenom ze sekvencí, které prošly první filtrací (odstranění všech sekvencí bez identifikátorů MID). První filtrace proto může zkreslit celkovou procentuální chybovost ve čteních oproti výsledkům získaných Gilles a spol. (2011). Musíme však dodat, že Gilles a spol. (2011) se ve svém experimentu zabývali jenom chybovostí a testovali ji na referenčních sekvencích dodaných firmou ROCHE.

Výsledná hodnota chybovosti samozřejmě závisí na kritériích, které jsme zvolili pro analýzu nových sekvencí a artefaktů. Hodnota chybovosti se proto nedá pokládat za neměnný parametr. Vždy záleží na operátorovi, jak nastaví daná kritéria pro analýzu artefaktů a nových sekvencí. Toto představuje především problém pro jedno-nukleotidové substituce (Quinlan a spol., 2008).

7.1.5 Vyhodnocení domnělých výhodných alel MHC I. třídy

Jak již bylo zmíněno v teoretické části této práce, u některých alel MHC I. třídy se předpokládá příznivý vliv na pomalejší rozvoj onemocnění syndromu imunodeficiencie. Levi J. Yant a spol. (2006) ve své práci identifikovali 4 alely u elitní skupiny makaků, kteří vykazovali dlouhodobou odolnost vůči rozvoji onemocnění syndromu získané imunodeficiencie. Jedná se o: Mamu-B*017, Mamu-B*029, Mamu-

A*002 a Mamu-A*011. Dále zjistili, že se u těchto elitních kontrolorů onemocnění nevyskytuje alela Mamu-B*01. Za výhodnou alelu byla označena také alela Mamu-A*001 (Mothe a spol., 2003) a Mamu-B*008 (Loffredo a spol., 2007).

7.1.5.1 **Mamu-A*001**

U alely Mamu-A*001 jsme předpokládali, že se jedná o nynější alelu Mamu-A1*001. Tato alela se vyskytla ve 12 vzorcích v různém zastoupení. Celkově se nedá usuzovat z našich výsledků, jaký vliv má tato alela na průběh onemocnění. V našem případě tato alela se nezdá být zásadní pro zpomalení či zrychlení průběhu onemocnění.

7.1.5.2 **Mamu-A*002**

Mamu-A*002 byla nalezena u třech jedinců ve více jak 4%. Byla nalezena u dvou jedinců s vysokou virovou náloží: S5 - RZb9 a S6 - RKf12 a u jednoho jedince s nízkou virovou náloží: S2 - RCv7. U jedince S6 - RKf12 s HVL byla dokonce tato alela zastoupená nejvíce ze všech jeho alel a to v 26,45%. U vzorku S5 - RZb9 a S2 - RCv7 byla tato alela zastoupená přibližně stejně a nebyla to hlavní majoritní alela. Alela Mamu-A*002 nebyla dle našich kritérií zařazená do ani jedné ze dvou skupin určených pro predikci vývoje onemocnění.

Naše poznatky naznačují, že Mamu-A*002 nemá zásadní vliv na vývoj onemocnění. Je ale třeba tyto poznatky rozšířit na větší skupinu jedinců, aby se dosáhlo také statistické jistoty.

7.1.5.3 **Mamu-A*011**

Mamu-A*011 označil Mothe a spol. (2003) za výhodnou, která umí příznivě modifikovat průběh onemocnění SIV. Tato alela se však nevyskytla v našem experimentu ani u jednoho vzorku. Nemůžeme tedy hodnotit její vliv na průběh onemocnění.

7.1.5.4 **Mamu-B*001**

Mamu-B*001 byla nalezena v našem experimentu u obou skupin jedinců v různorodém zastoupení. Jelikož jsme neměli žádné jedince, kteří by vykazovali extrémně nízkou virovou nálož a byli tedy elitními kontrolory, nemohli jsme potvrdit či vyvrátit myšlenku Loffredo a spol. (2007), že tato alela se nevyskytuje u elitních kontrolorů. Ve skupině LVL se tato alela nevyskytla ani jednou ve více jak 4% zastoupení. Kdežto ve skupině HVL se tato alela vyskytla u 4 vzorků a u dvou z nich ve více jak 4 %.

7.1.5.5 **Mamu-B*008**

Mamu-B*008 je považovaná za alelu charakteristickou pro kontrolory onemocnění SIV. Ze studie vedené Loffredo a spol. (2008) se zjistilo, že makakové, kteří mají ve svém genomu alelu Mamu-B*008 se stávají z 50 % elitními kontrolory. Za elitní kontrolory jsou považováni ti jedinci, kteří mají ve 20. týdnu po infekci hodnotu virové nálože pod 1000 kopií RNA na 1 ml plazmy. V našem experimentu jsme u žádného jedince tuto alelu nenašli, nemůžeme proto hodnotit její vliv na průběh onemocnění u našich experimentálních zvířat. Musíme zvážit jiné přítomné alely u skupiny s pomalou progresí onemocnění, popřípadě určité kombinace alel. Samozřejmě nesmíme zapomínat také na to, že průběh onemocnění můžou ovlivňovat i jiné struktury, např.: KIR. Alela Mamu-B*008 není v populaci Makaka rhesus moc častá. Ve studii vedené Karl a spol. (2013) bylo z 385 čínských makaků rhesus jen 9 Mamu-B*008 pozitivních a ve studii vedené Wiseman a spol. (2009) nebyl žádný z 36 čínských makaků rhesus pozitivních pro tuto alelu.

7.1.5.6 **Mamu-B*017**

Alela Mamu-B*017 se u našich vzorků vyskytuje pouze u dvou jedinců. U jedince S2 - RCv7 se zastoupením 3,22 % s LVL a S5 - RZb9 se zastoupením 1,80 % s HVL. Alela Mamu-B*017 byla označena jako chorobu modifikující alela, která ovlivňuje průběh onemocnění u SIV. Yant a spol. (2006) a Mothe a spol. (2003) ji ve svých publikacích považovali za alelu, která zpomaluje průběh onemocnění SIV. Ale tato skutečnost neříká přímo, že jedinec se stane elitním kontrolorem a jeho virová nálož

bude pod 1000 kopií RNA na 1 ml plasmy (Yant a spol., 2006). Wojcechowskyj přímo konfrontoval tvrzení Yantheho (2006) a tvrdí ve své studii, kde zkoumal přítomnost a vliv Mamu-B*017, že jenom přítomnost této alely není dostačující pro predikci vývoje onemocnění. Na druhou stranu Mamu-B*017 a také Mamu-B*008 tvoří proteiny, které jsou zodpovědné pro navázání fragmentu zevnitř buňky, které se podobají proteinům nalezeným u HLA-B27 a HLA-B57 pozitivních jedinců (Marsh a spol., 2000). Tyto podobné proteiny tedy mohou vázat stejné antigenní fragmenty a mít tedy podobný průběh onemocnění. Naše výše zmíněné vzorky, které obsahují Mamu-B*017 se liší ve vývoji onemocnění. Dle současných poznatků můžeme jenom souhlasit s myšlenkou, že Mamu-B*017 není jasným ukazatelem pro předpověď vývoje onemocnění. Myšlenka, že nejenom jedna alela je zodpovědná za rychlost vývoje onemocnění, je v tomto případě na místě.

7.1.5.7 *Mamu-B*029*

Alelu Mamu-B*029 jsme našli v našem experimentu u vzorku S2 - RCv7 (LVL) a S5 - RZb9 (HVL). Dle naší analýzy je alela Mamu-B*029 zařazena do skupiny s pomalejším vývojem onemocnění (Tabulka 20 – Podrobná analýza majoritních alel pro HVL a LVL). Alela byla nalezena u dvou pokusných zvířat, která měla odlišnou hladinou virémie a tedy i rozdílný průběh onemocnění, ale tato alela byla vyjádřená v rozdílné míře exprese u každého z těchto dvou jedinců. U jedince S2 - RCv7 (LVL) byla alela Mamu-B*029 vyjádřená v 20,79% a byla v daném vzorku v největším zastoupení ze všech přítomných alel. U jedince S5 - RZb9 (HVL) byla alela Mamu-B*029 nalezena v 13,97% a vyskytovala se jako druhá nejvíce zastoupená alela po Mamu-A*12 se 14,24%. U obou jedinců byla tedy daná alela majoritní a byla vyjádřená ve velmi vysokém procentu.

Graf 6 - Srovnání exprese alelických variant u vzorku S2 - RCv7 (LVL) a S5 - RZb9 (HVL) znázorňuje srovnání alel u těchto dvou jedinců. Čtyři další alely vyjádřené nad 4% u těchto dvou jedinců mají velmi odlišnou expresi. Jsou to alely: Mamu-A1*001, Mamu-A*12, Mamu-A1*028 (A1*028:04/05/07) a Mamu-B*028. Alely Mamu-A1*001 a Mamu-A1*028 byly téměř dvakrát více exprimovány u vzorku S2 - RCv7 (LVL), avšak do tabulky Tabulka 20 – Podrobná analýza majoritních alel pro HVL a LVL nemohly být

zahrnuty, protože neprošly kritérii. Alely Mamu-A*12 a Mamu-B*028 byly vyjádřené téměř dvakrát více u vzorku s vysokou virovou náloží S5 - RZb9. Mamu-B*028 se vyskytuje v tabulce Tabulka 20 – Podrobná analýza majoritních alel pro HVL a LVL ve skupině s prognózou pro rychlejší průběh onemocnění.

Mamu-B*029 byla dříve označena Yant a spol. (2009) za alelu, která působí na pomalejší průběh onemocnění. V našem experimentu jsme ji však našli u dvou jedinců s rozdílným průběhem onemocnění. Můžeme se však domnívat, že rozdílná exprese této alely významně modifikuje progresi onemocnění. U jedince, který měl nízkou virovou nálož a pomalou progresi onemocnění, byla tato alela zastoupena nejvíce ze všech přítomných alel.

7.1.5.8 Odstranění Mamu-B*074 a Mamu-B*16 pseudogenu

U 11 vzorků byla nalezena alela Mamu-B*074 s průměrným počtem čtení 262 čtení, přičemž maximum čtení bylo 643 a minimum 76. Tato alela představuje nefunkční pseudogen, jelikož na začátku v exonu 3 má delecii 74 bp (Sauer mann a spol., 2008). Přistoupili jsme tedy k jejímu odstranění z výsledné tabulky. Byly také nalezeny další nefunkční pseudogeny ze skupiny Mamu-B, které rovněž nebyly zahrnuty do výsledné tabulky. Jedná se o Mamu-B*16 pseudogen, který byl vyjádřený v jednom vzorku v 7 čteních. Pseudogeny vznikají na základě několika mutací, které následně vyústí v posun čtecího rámce nebo předčasné ukončení čtecího rámce díky vzniklému stop-kodonu. Jelikož tyto pseudogeny netvoří funkční proteiny, nejsou také zahrnuty do studií zabývajících se studiem a vlivem MHC I. molekul. Většinou v odborných studiích nenalezneme zmínku o počtu a zastoupení těchto pseudogenů, avšak jejich přítomnost je více než pravděpodobná. Můžeme předpokládat, že vlivem evoluce a změn mohou vznikat další nefunkční pseudogeny z původně fungujících genů a tím ovlivnit počet různých MHC alel a především ovlivnit imunologickou odolnost jedince.

8 Závěr

Využili jsme přístroj GS Junior System k sekvenování 190 bp dlouhé cDNA kódující exon 2 MHC molekul I. třídy u 15 jedinců makaků rhesus, kteří byli dříve infikováni virem SIV239, nebo SHIV clade C. Jedinci byly rozděleny do dvou skupin dle virové nálože. Z celkově nasekvenovaných úseků jsme průměrně identifikovali 34,01 % sekvencí v databázi GenBank. V 15 vzorcích jsme našli 98 alel a alelických variant, pro každý vzorek to činí průměrně 28 alel a alelických variant. Alely byly vyjádřené v různé míře exprese. Největší míru exprese jsme našli u alely Mamu-A1*004 – 36,42%. GS Junior System identifikoval i varianty zastoupené ve velmi malém procentu. Konkrétně jsme identifikovali i sekvence zastoupené jen v 0,07 % u daných jedinců.

U každého jedince byl stanoven jeho haplotyp MHC I. třídy. Nalezli jsme celkem 11 různých haplotypů. Stejně haplotypy jsme našli buď ve skupině s nízkou virovou náloží anebo ve skupině s vysokou virovou náloží.

U zbývajících sekvencí, které jsme nenalezli v databázi GenBank, jsme se pokusili identifikovat nové alely a alely, které obsahují chybu. Celkově jsme našli 11 nových alel. Nové alely byly vyjádřené ve vzorcích od 0,14 % do 1,50 %. Naše nově nalezené alely jsme nezadali do databáze GenBank, protože naše vzorky nesplňují současná pravidla pro vkládání nově nalezených sekvencí.

Porovnali jsme dosavadní poznatky o alelách, které významně ovlivňují průběh infekce SIV u makaků. Mamu-A*001 byla nalezena u 12 vzorků a nezjistili jsme žádnou spojitost s předchozími výsledky, které by naznačovaly pomalejší rozvoj onemocnění SIV. Mamu-A*002 byla nalezena u 2 vzorků s vysokou virémií a u jednoho vzorku s nízkou virémií. Dle naší analýzy, která porovnávala přítomnost a rozdílnou expresi alel, nebyla tato alela zařazena ani do jedné z našich dvou skupin. Také u této alely nemůžeme potvrdit dosavadní tvrzení o příznivém působení na zpomalení infekce SIV. Mamu-A*011 a Mamu-B*008 se nevyskytly v našich vzorcích. Tyto alely se vyskytují velmi raritně, je proto nutné rozšířit objem vzorků k nalezení těchto alel. Mamu-B*001 je alela, která se většinou nevyskytuje u elitních kontrolorů. Elitní kontroloři se v naší skupině nevyskytovali. U skupiny s nízkou virovou náloží jsme našli tuto alelu exprimovanou vždy méně než v 4 % a u skupiny s vysokou virovou náloží se tato alela

vyskytla u 4 vzorků a u dvou z nich ve více jak 4% expresi. Mamu-B*017 se vyskytla ve 2 vzorcích s rozdílným vývojem onemocnění. Ani u jednoho vzorku se nevyskytla ve více jak 4 % a nebyla proto považována za majoritní alelu. Dle výsledků nemůžeme posoudit vliv této alely na rozvoj onemocnění SIV. Poslední podrobněji zkoumaná alela je Mamu-B*029. Tato alela byla zařazena dle naší analýzy do skupiny, která má předpoklady zpomalit rozvoj onemocnění SIV. Mamu-B*029 byla nalezena u dvou vzorků s odlišným vývojem onemocnění. U jedince s nízkou virovou náloží byla však nalezena téměř ve 2x větším zastoupení než u vzorku s vysokou virovou náloží. Můžeme z toho usoudit, že rozdílná exprese dané alely má vliv na rozvoj onemocnění.

Dle naší analýzy předpokládáme pomalý rozvoj infekce u jedinců, kteří mají ve svém haplotypu alely: Mamu-A1*004, Mamu-A1*007, Mamu-A1*019, Mamu-B*029, Mamu-B*041, Mamu-B*047, Mamu-B*048, Mamu-B*065 a Mamu-B*069.

Sekvence získané z přístroje GS Junior System obsahovaly chyby v bázích. Delece představují 11,03 % z celkově nalezených chyb a společně s insercemi, které byly nalezeny v 19,58 %, představují především chyby v homopolymerních úsecích. Chyby v homopolymerních úsecích už byly dříve dobře dokumentovány jako chyby přístroje GS Junior System. Substituce představují 69,39 % z celkově nalezených chyb. Chyby v substitucích vznikají především při PCR. Celková chybovost dané metody byla 0,31 %. Dohromady 31,17 % čtení obsahovalo jednu či více chyb. Daná chybovost velmi závisí na parametrech, které si zvolí operátor, jak už v procesu pyrosekvenování, tak následně v analýze dat.

Pro snížení chybovosti v substitucích by bylo vhodné snížit počet cyklů PCR. Dále bychom chtěli ověřit naše prezentovaná data na větším počtu vzorků z důvodu statistické analýzy.

Ze současných poznatků a z dat získaných naším experimentem můžeme konstatovat, že vývoj onemocnění SIV nezávisí jenom na přítomnosti dané alely, ale že akutní fáze infekce je ovlivněna výrazně mírou exprese alely. Je vhodné analyzovat vzorky na základě jejich haplotypů. Docílí se tím zhodnocení nejenom jedné alely, ale celého komplexu alel zastoupených ve vysoké míře, které by mohly mít vliv na onemocnění.

9 Abstrakt

Cíl práce: Cílem práce bylo zjistit za použití modelu SIV infekce u makaků, tedy jediném současném modelu HIV infekce u lidí, jak se liší dvě skupiny makaků rhesus infikovaných virem SIV239, nebo SHIV clade C s odlišnou virovou náloží, v expresi haplotypů MHC molekul I. třídy pomocí nové metody pyrosekvenování.

Metody: Pomocí reverzní transkriptázy jsme vzorky RNA z leukocytů makaků převedli na cDNA a provedli jsme PCR pro úsek 190 bp MHC I. třídy s fúzními primery s identifikátory MID pomocí FastStart High Fidelity Taq DNA polymerázy. Dále jsme postupovali dle protokolu od GS Junior System a vzorky jsme pyrosekvenovali na přístroji GS Junior System (Roche). Získaná data jsme analyzovali sadou skriptů v jazyce Python použitím řady filtračních kroků a pomocí softwaru DNA Star LaserGene 11. Alely jsme identifikovali pomocí programu ncbi-blast+ 2.2.25.

Výsledky: Nalezli jsme 98 známých a 11 nových alel MHC I. třídy. Analýzou jsme našli alely, u kterých předpokládáme rychlý, nebo pomalý průběh onemocnění SIV. Alely s pomalým průběhem onemocnění: Mamu - A1*004, A1*007, A1*019, B*029, B*041, B*047, B*048, B*065, B*069. Naopak alely s rychlým průběhem onemocnění: Mamu - A1*003, A1*003:02, A1*007:03, A1*023, A1*024, B*005, B*028, B*040, B*052, B*055, B*058. Chybu jsme našli v 0,31 % přečtených bázích.

Závěr: Srovnáním dvou skupin makaků jsme získali alely, které korelují s průběhem SIV onemocnění. V dalších experimentech by se na tyto alely měla zaměřit pozornost a ověřit daná tvrzení. Metoda pyrosekvenování nám poskytla detailní přehled o MHC alelách I. třídy u makaků. Citlivost této metody dokáže analyzovat i velmi málo vyjádřené alelické varianty a poskytuje tak podrobný přehled o přítomných alelách u daného jedince. Chybovost metody pyrosekvenování není nezanedbatelná a může činit potíže při objevování jedno nukleotidových substitucí.

10 Abstract

Background: The aim of this work was to use the SIV infection in macaques (the only available model of human HIV infection) to show potential differences in MHC I haplotypes in macaques experimentally infected with SIVmac239 (or SHIV clade C) and their correlation with low or high viral loads, using pyrosequencing.

Methods: The RNA samples from leukocytes from experimental macaques were reversely transcribed into cDNA and subjected to PCR of the 190 bp fragment of MHC I using fusion primers containing MIDs and FastStart High Fidelity Taq DNA polymerase. Subsequently the PCR generated samples were subjected to pyrosequencing using GS Junior System (Roche) according to the manufacturer's protocol. The generated data were analyzed by a series of data filtration steps using scripts in Python and subsequently by DNASTar Lasergene 11. Final alleles were identified by ncbi-blast+ 2.25.

Results: A total of 98 known alleles and 11 new alleles of MHC class I were found. The analysis identified those alleles, which correlate with fast or slow disease course. The alleles associated with slow disease course are: Mamu - A1*004, A1*007, A1*019, B*029, B*041, B*047, B*048, B*065, B*069. Conversely, alleles associated with fast progression are Mamu - A1*003, A1*003:02, A1*007:03, A1*023, A1*024, B*005, B*028, B*040, B*052, B*055, B*058. Sequencing errors were found in 0,31 % of bases.

Conclusion: The comparison of MHC I expression in the two groups of macaques identified individual alleles, which correlate with the disease course. Further experiments should focus on these alleles to confirm our data. The pyrosequencing method allowed for a detailed analysis of the MHC class I alleles in macaques. The sensitivity of this method allows for an identification of the allelic variants expressed at low levels and gives a detailed picture of alleles in the individual organism. The error rate of this method, however, cannot be disregarded and lead to difficulties in the discovery of single-nucleotide substitutions.

11 Použité zkratky

zkratka	význam zkratky	český význam
APC	Antigen presenting cells	Antigen prezentující buňky
APS	Adenosine fosfosulphate	Adenosin fosfosulfát
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintrifosfát
BDD	Bead Deposition Device	
BLAST	Basic Local Alignment tool	
CCD	the charge-coupled device	
DEPC	Diethylpyrocarbonate	Diethylpyrokarbonát
DNA	Deoxyribonucleic acid	Deoxyribonukleová kyselina
HIV	Human immunodeficiency virus	Lidský virus imunodeficiency
HLA	Human leukocyte antigen	
HVL	High viral load	Vysoká virová nálož
IPD	Immuno Polymorphism Database	
KIRs	Killer cell immunoglobulin-like receptors	
LVL	Low viral load	Nízká virová nálož
Mamu	<i>Macaca mulatta</i>	Makak rhesus
MCM	Mauritian cynomolgus macaques	

MHC	Major histocompatibility complex	Hlavní histokompatibilní komplex
MIDs	Multiply identifiers	
MPC	Magnetic Particle Concentrator	
NCBI	National Center for Biotechnology information	
NGS	Next generation sequencing	Další generace sekvenování
NKs	Natural killers	Přirození zabíječi
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	Periferní, krevní jednojaderné buňky
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerázová řetězová reakce
PTP	Pico Titer Plate	Mikro pipetovací destička
SIV	Simian immunodeficiency virus	
UTTD	Ultra Turrax Tube Drive	
UV	Ultra violet	Ultrafialové světlo

12 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Srovnání metod sekvenace	24
Tabulka 2 - Vzorky.....	25
Tabulka 3 – Nastavení termocykléru pro gradientovou PCR.....	31
Tabulka 4 – Tabulka s jednotlivými teplotami ve sloupcích pro gradientovou PCR.....	32
Tabulka 5 – Vzorky s jednotlivými primery s MID	35
Tabulka 6 – Tabulka komponent pro PCR reakci	36
Tabulka 7 – Nastavení termocykléru pro PCR	36
Tabulka 8 – Kalibrační křivka pro výpočet koncentrace cDNA.	41
Tabulka 9 – Tabulka se vzorky, naměřenou fluorescence, vypočítaným počtem molekul a objem přidaného TE pufru 1x.	42
Tabulka 10 – Příprava Live Amp mix A.....	44
Tabulka 11 – Příprava Live Amp mix B.....	44
Tabulka 12 - Emulzní amplifikace	46
Tabulka 13 – Jednotlivé vrstvy částic v PTP zařízení.....	54
Tabulka 14 - Enzyme Pre-layer a Enzyme Post Layer	55
Tabulka 15 - Nastavení sekvenace.....	58
Tabulka 16 - Haplotypy	66
Tabulka 17 - Alely se změnou v primeru.....	70
Tabulka 18 - Analýza chyb.....	72
Tabulka 19 – Majoritní alely pro HVL a LVL	78
Tabulka 20 – Podrobná analýza majoritních alel pro HVL a LVL.....	79
Tabulka 21 – Kullback-Leibler divergence	80

13 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Kontrola gradientové PCR	33
Obrázek 2 - Kontrola gradientové PCR	33
Obrázek 3 - Schéma analýzy dat z GS Junior System	62
Obrázek 4 - Analýza nových alel	69

14 Seznam grafů

Graf 1 - Procentuální rozložení nalezených chyb	73
Graf 2 - Pozice chyb v sekvencích	74
Graf 3 - Pozice chyb v sekvencích - delece	74
Graf 4 - Pozice chyb v sekvencích - inserce.....	75
Graf 5 - Pozice chyb v sekvencích - substituce	75
Graf 6 - Srovnání exprese alelických variant u vzorku S2 - RCv7 (LVL) a S5 - RZb9 (HVL)	81
Graf 7 - Srovnání exprese alelických variant u vzorku S3 - RKr11 (HVL) a S9 - R Ji8 (HVL)	81
Graf 8 - Srovnání alelických variant u vzorku S4 - RAl11 (HVL) a S13 - Rlz9 (HVL)	82
Graf 9 - Srovnání exprese alelických variant u vzorku S7 - RTi12 (HVL) a S9 - R Ji8 (HVL)	82
Graf 10 - Srovnání exprese alelických variant u vzorku S8 - R Du8 (LVL) a S14 - R Mp10 (LVL)	83
Graf 11 - Srovnání exprese alelických variant S12 - REk11 (LVL) a S15 - R Ky5 (LVL)	83

15 Použitá literatura

- 1) **Ahmadian, A., Ehn, M.; Hober, S.** Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta*. 2006 leden. 363(1-2): 83–94.
- 2) **Alexander, L., Weiskopf, E., Greenough, T.C., Gaddis, N.C., Auerbach, M.R., Malim, M.H., O'Brien, S.J., Walker, B.D., Sullivan, J.L., Desrosiers R.C.** Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J. Virol.* 2000; 74: 4361-4376.
- 3) **Altfeld, M., Kalife, E. T., Qi, Y., Streeck, H., Lichterfeld, M., Johnston, M.N., Burgett, N., Swartz, M.E., Yang, A., Alter, G., Yu, X.G, Meier, A., Rockstroh, J.K., Allen, Jessen, T.M.H., Rosenberg, E.S., Carrington, M., Walker, B.D.** HLA alleles associated with delayed progression to AIDS contribute strongly to the initial CD8⁺ T cell response against HIV-1. *PLoS Med.* 2006; 3: 403.
- 4) **Balzer, Susanne, Malde, Ketil, Jonassen, Inge.** Systematic exploration of error sources in pyrosequencing flowgram data. *Bioinformatics.* 2011; 27: i304–i309.
- 5) **Bontrop, R.E., Watkins, D.I.** MHC polymorphism: AIDS susceptibility in nonhuman primates. *Trends Immunol.* 2005; 26: 227-233. Převzato z Greene a spol.
- 6) **Boštík, Pavel, Kobkitjaroen, Jaruda, Villinger, W.T.F., Pereira, L. E., Little, D.M., Stephenson, S.T., Boouzyk, M., Ansari, A.A.** Decreased NK Cell Frequency and Function Is Associated with Increased Risk of KIR3DL Allele Polymorphism in Simian Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques with High Viral Loads. *The Journal of Immunology.* 2009; 182(6): 3638-49.
- 7) **Budde, M.L., Lhost, J.J., Burwitz, B.J., Becker, E.A., Burns, C.M., O'Connor, S.L., Karl, J.A., Wiseman, R.W., Bimber, B.N., Zhang, G.L., Hildebrand, W., Brusic, V., O'Connor, D.H.** Transcriptionally abundant Major Histocompatibility Complex class I alleles are fundamental to non-human primate SIV-specific CD8⁺ T cell responses. *J Virol.* Duben 2011; 85(7): 3250-3261.

- 8) **Carrington, M., Nelson, G.W., Martin, M.P., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J.J., Kaslow, R., Buchbinder, S., Hoots K., O'Brien S.J.** HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science*. 1999; 283:1748-1752.
- 9) **Daniel, M.D., Letvin, N.L., King, N.W., Kannagi, M., Sehgal, P.K., Hunt, R.D., Kanki, P.J., Essex, M., Desrosiers, R.C.** Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science*. 1985; 10: 1201–1204.
- 10) **Daza-Vamenta, R. Glusman, G., Rowen, L., Guthrie, B., Geraghty, D.E.** Genetic divergence of the Rhesus Macaque Major Histocompatibility Complex. *Genome Res*. 2004; 14(8): 1501–1515.
- 11) **de Groot, N.G., Otting, N., Robinson, J., Blancher, A., Lafont, B.A.P., Marsh, S.G.E, O'Connor, D.H., Shiina, T., Walter, L., Watkins, D.I., Bontrop, R.E.** Nomenclature report on the major histocompatibility complex genes and alleles of Great Ape, Old and New World monkey species. *Immunogenetics*. 2012; 64: 615–631.
- 12) **Desrosiers, R., Wyand, M., Kodama, T., Ringler, D., Arthur, L., Sehgal, P., Letvin, N., King, N., Daniel, M.** Vaccine protection against simian immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 10: 6353-6357.
- 13) **Droege, M., Hill, B.** The Genome Sequencer FLX™ System—Longer reads, more applications, straight forward bioinformatics and more complete data sets. *454 Life Sciences* 2008.
- 14) **Dudley, Dawn M., Karl, Julie A., Creager, Hannah M., Bohn, Patrick S., Wiseman, Roger W., O'Connor, David H.** Full-length novel MHC class I allele discovery by next-generation sequencing: two platforms are better than one. *Immunogenetics*. 2014; 66: 15-24.
- 15) **Feeney, M.E., Tang, Y., Roosevelt, K.A., Leslie, A.J., McIntosh, K., Karthas, N., Walker, B.D., Goulder P.J.** Immune escape precedes breakthrough human immunodeficiency virus type 1 viremia and broadening of the cytotoxic T-lymphocyte response in an HLA-B27-positive long-term-nonprogressing child. *J. Virol*. 2004; 78: 8927-8930.
- 16) **Flores-Villanueva, P.O., Yunis, E.J., Delgadoc, J.C., Vittinghoff E., Buchbinder, S., Leung, J.Y., Ugliarolo, A.M., Clavijo, O.P., Rosenberg, E.S., Kalams S.A., Braun,**

- J.D., Boswell, S.L., Walker, B.D., Goldfeld, A.E.**. Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 5140–5145.
- 17) **Frahm, N., Kiepiela, P., Adams, S., Linde, C.H., Hewitt, H.S., Sango, K., Feeney, M.E., Addo, M.M., Lichterfeld, M., Lahaie, M.P., Pae, E., Wurcel, A.G., Roach, T., St John, M.A., Altfeld, M., Marincola, F.M., Moore, C., Mallal, S., Carrington, M., Heckerman, D., Allen, T.M., Mullins, J.I., Korber, B.T., Goulder, P.J., Walker, B.D., Brander, C.**. Control of human immunodeficiency virus replication by cytotoxic T lymphocytes targeting subdominant epitopes. *Nat. Immunol.* 2006; 7: 173–178.
- 18) **Friedrich, T.C., Valentine, L.E., Yant, L.J., Rakasz, E.G., Piaskowski, S.M., Furlott, J.R., Weisgrau, K.L., Burwitz, B., May, G.E., Leon, E.J., Soma, T., Napoe, G., Capuano III, S.V., Wilson, N.A., Watkins, D.I.**. Subdominant CD8⁺ T-cell responses are involved in durable control of AIDS virus replication. *J. Virol.* 2007; 81: 3465–3476.
- 19) **Garcia-Ruano, A.B., Mendez, R., Romero, J.M., Cabrera, T., Ruiz-Cabello, F., Garrido, F.**. Analysis of HLA-ABC locus-specific transcription in normal tissues. *Immunogenetics*. 2010; 62: 711-719. Převzato z Green a spol.
- 20) **Gilles, André, Megléc, Emese, Pech, Nicolas, Ferreira, Stéphanie, Malausa, Thibaut, Martin, Jean-François.** Accuracy and quality assessment of 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing. *BMC Genomics*. 2011; 12: 245.
- 21) **Goulder, Philip J. R., Watkins, David I.**. Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nat Rev Immunol*. Srpen 2008; 8(8): 619–630.
- 22) **Greene a spol.:** Differential MHC class I expression in distinct leukocyte subsets. *BMC Immunology*. 2011; 12: 39.
- 23) **Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W.E., Picker, L.J.**. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med*. 2006; 12: 289-295. Převzato z Green a spol.

- 24) **Grossman, Z., Picker L.J.** Pathogenic mechanisms in simian immunodeficiency virus infection. *Curr Opin HIV AIDS*. 2008; 3: 380-386. Převzato z Green a spol.
- 25) **Jin Xia, Xiaojiang Gao, Murugappan Ramanathan, Jr., Geoffrey R. Deschenes, George W. Nelson, Stephen J. O'Brien, James J. Goedert, David D. Ho, Thomas R. O'Brien, Mary Carrington.** Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD8⁺-T-cell responses for groups of HIV-1-infected individuals with different HLA-B*35 genotypes. *J Virol*. 2002; 76: 12603–12610.
- 26) **Karl, Julie A., Bohn, Patrick S., Wiseman, Roger W., Nimityongskul, Francesca A., Lank, Simon M., Starrett, Gabriel J., O'Connor, David H.** Major Histocompatibility Complex class I haplotype diversity in Chinese Rhesus Macaques. *G3. Červenec* 2013; 3(7): 1195-1201.
- 27) **Klein, Jan, Bontrop, Ronald E., Dawkins, Roger L., Erlich, Henry A., Gyllensten, Ulf B., Heise, Eugene R., Jones, Patricia P., Parham, Peter, Wakeland, Edward K., Watkins, David I.** Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal. *Immunogenetics*. 1990; 31: 217-219.
- 28) **Krejsek, Jan, Kopecký, Otakar.** *Klinická imunologie*. 1. vydání. Hradec Králové: Nucleus HK, 2004. 941 s. 751-761. ISBN: 80-86225-50-X.
- 29) **Kurtz, B.M., Singletary, L.B., Kelly, S.D., Frampton, A.R.J.** Equus caballus Major Histocompatibility Complex class I is an entry receptor for equine Herpesvirus type 1. *J Virol*. 2010; 84: 9027-9034.
- 30) **Lara E. Pereira, Priya Srinivasan and James M. Smith.** Simian-Human Immunodeficiency Viruses and their impact on non-human primate models for AIDS. *Immunodeficiency*. 2012; 15: 311-356.
- 31) **Loffredo, John T., a spol.:** Mamu-B*08-positive macaques control Simian Immunodeficiency Virus replication. *J Virol*. 2007 Srpen, 81(16): 8827–8832.
- 32) **Lum, J. J., Cohen, O. J. , Nie, Z., Weaver, J.G., Gomez, T. S., Yao, X. J., Lynch, D., Pilon, A.A, Hawley, N., Kim, J.E., Chen, Z., Montpetit, M., Sanchez-Dardon, J., Cohen, E.A., Badley, A.D.** Vpr R77Q is associated with long-term nonprogressive HIV infection and impaired induction of apoptosis. *J. Clin. Investig.* 2003; 111: 1547-1554.

- 33) **Margulies, M. a spol.** Genome sequencing in open microfabricated high density picoliter reactors. *Nature*. 2005 září 15; 437(7057): 376-380.
- 34) **Marsh, S.G.E., Albert, E.D., Bodmer, W.F., Bontrop, R.E., Dupont, B., Erlich, H.A., Fernández-Vina, M., Geraghty, D.E., Holdsworth, R. Hurley, C.K., Lau, M., Lee, K.W., Mach, B., Mayr, W.R., Maiers, M., Müller, C.R., Parham, P., Petersdorf, E.W., Sasazuki, T., Strominger, J.L., Svejgaard, A., Terasaki, P.I., Tiercy, J.M., Trowsdale, J.** Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens*. 2010; 75: 291-455.
- 35) **Marsh, S.G.E., Parham, P., Barber, L.D.** The HLA Facts Book. 1. vydání. Academic Press. London. 2000. 416 s. ISBN-10: 0125450257. Převzato z Philip J. R. Goulder a David I. Watkins.
- 36) **Martin, M.P., Gao, X., Lee, J.H., Nelson, G.W., Detels, R., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., Trowsdale, J., Wilson, M., O'Brien, S.J., Carrington, M.** Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nat Genet*. 2002; 31: 429–434.
- 37) **McDermott, A.B., Mitchen, J., Piaskowski, S., De Souza, I., Yant, L.J., Stephany, J., Furlott, J., Watkins, D.I.** Repeated low-dose mucosal simian immunodeficiency virus SIVmac239 challenge results in the same viral and immunological kinetics as high-dose challenge: a model for the evaluation of vaccine efficacy in nonhuman primates. *J Virol*. 2004; 10: 3140–3144.
- 38) **McNeil, A.J., Yap, P.L., Gore, S.M., Brettler, R.P., McColl, M., Wyld, R., Davidson, S., Weightman, R., Richardson, A.M., Robertson, R.J.** Association of HLA types A1-B8-DR3 and B27 with rapid and slow progression of HIV disease. *QJM*. 1996; 89: 177-185.
- 39) **Mellors, J. W., Munoz, A., Giorgi, J.V., Margolick, J.B., Tassoni, C.J., Gupta, P., Kingsley, L.A., Todd, J.A., Saah, A.J., Detels, R., Phair, J.P., Rinaldo C.R.J.** Plasma viral load and CD4⁺ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann. Intern. Med*. 1997; 126: 946-954.

- 40) **MHC Consortium.** Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature*. 1999; 401: 921–923.
- 41) **Migueles, S.A., Sabbaghian, M.S., Shupert, W.L., Bettinotti, M.P., Marincola, F.M., Martino, L., Hallahan, C.W., Selig, S.M., Schwartz, D., Sullivan, J., Connors, M.** HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long-term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97: 2709-2714.
- 42) **Monceaux, V., Viollet, L., Petit, F., Cumont, M., Kaufmann, G., Aubertin, A., Hurtrel, B., Silvestri, G., Estaquier, J.** CD4+ CCR5+ T-cell dynamics during simian immunodeficiency virus infection of Chinese rhesus macaques. *J Virol*. 2007; 10: 13865–13875.
- 43) **Morgulis, Aleksandr, Coulouris, George, Raytselis, Yan, Madden, Thomas L., Agarwala, Richa, Schäffer, Alejandro A.** Database indexing for production Mega-BLAST searches. *Bioinformatics*. 2008; 24: 1757-1764.
- 44) **Mothe, B.R., Weinfurter, J., Wang, C., Rehrauer, W., Wilson, N., Allen, T.M., Allison, D.B., Watkins, D.I.** Expression of the major histocompatibility complex class I molecule Mamu-A*01 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J. Virol*. 2003; 77: 2736-2740.
- 45) **Okoye, A., Meier-Schellersheim, M., Brenchley, J.M., Hagen, S.I., Walker, J.M., Rohankhedkar, M., Lum, R., Edgar J.B., Planer, S.L., Legasse, A., Sylwester, A.W., Piatak M.J., Lifson, J.D., Maino, V.C., Sodora, D.L., Douek, D.C., Axthelm, M.K., Grossman, Z., Picker, L.J.** Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection. *J Exp Med*. 2007; 204: 2171-2185.
- 46) **Parham, P.** Immunogenetics of killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol*. 2005; 42: 459-462. Převzato z Green a spol.
- 47) **Peeters, M., Courgnaud, V.; Abela, B.** Genetic diversity of Lentiviruses in Non-Human Primates. *AIDS Reviews*. 2001; 3: 3–10.

- 48) **Pětrošová, H.** Nové metody sekvenace bakteriálních genomů. Brno, 2009. 34 s. Bakalářská práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity, Ústav experimentální biologie, Oddělení genetiky a molekulární biologie. Školitel bakalářské práce doc. MUDr. David Šmajš, Ph.D.
- 49) **Plantier, J.C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Lemée, V., Damond, F., Robertson, D.L., Simon, F.** A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med* 2009; 15(8): 871-2.
- 50) **Qi, Y., Martin, M.P., Gao, X., Jacobson, L., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Kirk, G.D., O'Brien, S.J., Trowsdale, J., Carrington, M.** KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS Pathog.* 2006; 2: 79.
- 51) **Quinlan, A.R., Stewart, D.A., Strömberg, M.P., Marth, G.T.** Pyrobayes: an improved base caller for SNP discovery in pyrosequences. *Nat Methods.* 2008 únor; 5(2): 179-81.
- 52) **Reynolds, M.R., Weiler, A.M., Piaskowski, S.M., Kolar, H.L., Hessel, A.J., Weiker, M., Weisgrau, K.L., León, E.J., Rogers, W.E., Makowsky, R.** Macaques vaccinated with simian immunodeficiency virus SIVmac239 Δ nef delay acquisition and control replication after repeated low-dose heterologous SIV challenge. *J Virol.* 2010; 10: 9190–9199.
- 53) **Rhodes, D. I., Ashton, L., Solomon, A. Carr, A., Cooper, D., Kaldor, J., Deacon, N.** Characterization of three nef-defective human immunodeficiency virus type 1 strains associated with long-term nonprogression. *J. Virol.* 2000; 74: 10581-10588.
- 54) **Riza Daza-Vamenta, Gustavo Glusman, Lee Rowen, Brandon Guthrie, Daniel E.Geraghty.** Genetic divergence of the rhesus macaque Major Histocompatibility Complex. *Genome Re.* 2004; 14,(8): 1501-1515.
- 55) **Robinson, J., Mistry, K., McWilliam, H., Lopez, R., Parham, P., Marsh, S.G.E.** The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Research.* 2011; 39(1): D1171-6.

- 56) **Salvi, R., Garbuglia, A. R., Di Caro, A., Pulciani, S., Montella, F., Benedetto, A.**
Grossly defective nef gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor. *J. Virol.* 1998; 72: 3646-3657.
- 57) **Sauermann, U., Siddiqui, R., Suh, Y-S., Platzner, M., Leuchte, N., Meyer, H., Matz-Rensing, K., Stoiber, H., Nurnberg, P., Hunsmann, G., Stahl-Hennig, C., Krawczak, M.**
Mhc class I haplotypes associated with survival time in Simian immunodeficiency virus (SIV)-infected rhesus macaques. *Genes and Immunity.* 2008; 9: 69-80.
- 58) **Smith, S.M., Holland, B., Russo, C., Dailey, P.J., Marx, P.A., Connor, R.I.**
Retrospective analysis of viral load and SIV antibody responses in rhesus macaques infected with pathogenic SIV: predictive value for disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 10: 1691–1701.
- 59) **Takahata, N.** MHC diversity and selection. *Immunol. Rev.* 1995; 143: 225–247.
Převzato z Riza Daza-Vamenta a spol.
- 60) **Thomas, R., Apps, R., Qi, Y., Gao, X., Male, V., O’hUigin, C., O’Connor, G., Ge, D., Fellay, J., Martin, J.N., Margolick, J., Goedert, J.J., Buchbinder, S., Kirk, G.D., Martin, M.P., Telenti, A., Deeks, S.G., Walker, B.D., Goldstein, D., McVicar, D.W., Moffett, A., Carrington, M.**
HLA-C cell surface expression and control of HIV/AIDS correlate with a variant upstream of HLA-C. *Nat Genet.* 2009; 41: 1290-1294.
- 61) **Walker, BD., Ahmed, R., Plotkin, S.** Moving ahead an HIV vaccine: use both arms to beat HIV. *Nat Me.* 2011; 10:1194–1195. Převzato z Yuz Zhou a spol.
- 62) **Walker, J.M., Maecker, H.T., Maino, V.C., Picker, L.J.** Multicolor flow cytometric analysis in SIV-infected rhesus macaque. *Method Cell Biol.* 2004; 10: 535–557.
- 63) **Watson, A., Ranchalis, J., Travis, B., McClure, J., Sutton, W., Johnson, P.R., Hu, S-L., Haigwood, N.L.** Plasma viremia in macaques infected with simian immunodeficiency virus: plasma viral load early in infection predicts survival. *J Virol.* 1997; 10(1): 284–290.
- 64) **Wiseman, R.W., Karl, J.A., Bimber, B.N., O’Leary, C.E., Lank, S.M., Tuscher, J.J., Detmer, A.M., Bouffard, P., Levenkova, N., Turcotte, C.L., Szekeres Jr, E., Wright, Ch., Harkins, T., O’Connor, D.H.** Major histocompatibility complex genotyping

with massively parallel pyrosequencing. *Nature Medicine*. Listopad 2009; 15(11): 1322-1327.

- 65) **Wiseman, Roger W., Wojcechowskyj, Jason A., Greene, Justin M., Blasky, Alex J., Gopon, Tobias, Soma, Taeko, Friedrich, Thomas C., O'Connor, Shelby L., O'Connor, David H.** Simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection of major histocompatibility complex-identical cynomolgus macaques from Mauritius. *J. Virol.* 2007; 81: 349–361.
- 66) **Wojcechowskyj, Jason A., Yant, Levi J., Wiseman, Roger W., O'Connor, Shelby L., O'Connor, David H.** Control of Simian immunodeficiency virus SIVmac239 is not predicted by inheritance of Mamu-B*17-containing haplotypes. *Journal of virology*. Leden 2007; 81(1): 406-410.
- 67) **Yant, L. J., Friedrich, T.C., Johnson, R.C., May, G.E., Maness, N.J., Enz, A.M., Lifson, J.D., O'Connor, D.H., Carrington, M., Watkins, D.I.** The high-frequency major histocompatibility complex class I allele Mamu-B*17 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J. Virol.* 2006; 80: 5074-5077.
- 68) **Yu Zhou, Rong Bao, Nancy, L. Haigwood, Yuri Persidsky, Wen-zhe Ho.** SIV infection of rhesus macaques of Chinese origin: suitable model for HIV infection in humans. *Retrovirology*. 2013; 10: 89.
- 69) **Zheng Zhang, Schwartz, Scott, Wagner, Lukas, Miller, Webb.** A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol.* 2000; 7(1-2): 203-14.

Elektronické zdroje

- 1) **AIDS** [online]. Vystaveno: 01.07.2010 [cit. 2013-10-28]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/AIDS>
- 2) **Donald, G., McNeil, Jr.** Precursor to HIV was in monkeys for Millennia. *New York Times* 16. září 2010. Převzato z: Simian immunodeficiency virus [online]. Vystaveno: 12.09.2013 [cit. 2013-11-01]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Simian_immunodeficiency_virus

- 3) **GS FLX+ Systém** [online]. Vystaveno: 2013 [cit. 2013-11-01]. Dostupné z: <http://454.com/products/gs-flx-system/index.asp>
- 4) **HIV** [online]. Vystaveno: 01.10.2013 [cit. 2013-10-28]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/HIV>
- 5) **HIV/AIDS** [online]. Vystaveno: 30.10.2013 [cit. 2013-11-01]. Dostupné z: <http://www.who.int/features/qa/71/en/index.html>
- 6) **Lašovička, Jan.** T –lymfocyty [online]. Vystaveno: 28.11.2012 [cit. 28.10.2013]. Dostupné z: http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/T%20lymfocyty.pdf
- 7) **PCR fidelity calculator** [online]. [cit. 21.02.2014]. Dostupné z: <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/fidelity/>
- 8) **Pyrosekvence 454 Roche** [online]. [cit. 31.10.2013]. Dostupné z: http://kbe.prf.jcu.cz/files/prednasky/metody_mikrobialni_molekularni_ekologie/454_pyrosekvence.pdf
- 9) **Pyrosequencing** [online]. Vystaveno: 25.08.2013 [cit. 2013-11-01]. Dostupné z: <http://www.isirv.org/site/index.php/methodology/pyrosequencing>
- 10) **Requirements for Inclusion of Sequences into the Non-Human Primate (NHP) Database** [online]. [citováno 31.10.2013]. Dostupné z: http://www.ebi.ac.uk/ipd/mhc/nhp/nomen_rules.html
- 11) The UniProt Consortium. **Activities at the Universal Protein Resource (UniProt) Nucleic Acids Res. 42: D191-D198 (2014).** [online]. [cit. 25.03.2014]. Dostupné z <http://www.uniprot.org/>
- 12) **Worobey, M., Telfer, P., Souquière, S., Hunter, M., Coleman, C. A., Metzger, M.J., Reed, P., Makuwa, M. et al.** Island biogeography reveals the deep history of SIV. Science 2010; **329**(5998): 1487. Převzato z: Simian immunodeficiency virus [online]. Vystaveno: 12.09.2013 [cit. 2013-11-01]. Dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Simian_immunodeficiency_virus