

Abstrakt

Jana Zelníková

Využití deep sequencing při studiu závislosti průběhu lentivirové infekce na variabilitě receptorů přirozené imunity

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Farmacie

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.