

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra Fyziologie živočichů a vývojové biologie

**Mapování genů, které modifikují
vnímavost k infekci *Leishmania major***

Marie VANIŠOVÁ

Praha, 2007

Vedoucí diplomové práce: doc. Marie Lipoldová, CSc., ÚMG AV ČR

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím citované literatury a pod vedením výše uvedené vedoucí diplomové práce.


Marie Vanišová

PODĚKOVÁNÍ

Na prvním místě bych chtěla velice poděkovat své školitelce, paní doc. Marii Lipoldové, CSc., za to, že mi umožnila ve své laboratoři a pod svým vedením vypracovat tuto diplomovou práci, i za veškerou pomoc, kterou mi poskytla. Moje díky náleží i paní Heleně Havelkové za její obětavou a trpělivou pomoc při řešení nejen technických problémů a dále i všem ostatním kolegům a spolupracovníkům z Laboratoře buněčné a molekulární imunologie.

Děkuji rovněž svým rodičům za jejich podporu během celé doby mých studií.

Diplomová práce byla vypracována v letech 2004 až 2007 v rámci grantového projektu: „Přesné mapování a molekulární identifikace genů, které kontrolují odpověď k *Leishmania major*“ (grant: GAČR 310/06/1745).

MAPOVÁNÍ GENŮ, KTERÉ MODIFIKUJÍ VNÍMAVOST K INFEKCI *Leishmania major*

Paraziti rodu *Leishmania* způsobují komplex onemocnění, která se společně nazývají leishmanióza. Příznaky leishmaniózy se liší od subklinických projevů nemoci po velmi výrazně se projevující systemické onemocnění, které může v některých případech končit i smrtí. Míra rozvoje onemocnění je kontrolována mnoha geny, ale způsob regulace zůstává neznámý. Mnohé z příznaků, pozorovaných u lidských onemocnění, mohou být studovány na myším modelu.

Pro studium genů, které modifikují vnímavost k infekci *L. major*, byl vyvinut speciální model, složený z 20 myších rekombinantních kongenních kmenů (RCS). Nami použité RCS byly získány křížením kmenů BALB/cHeA (vnímavý k infekci) a STS/A (odolný vůči infekci). Každý z 20 kmenů série CcS/Dem obsahuje 12,5% genomu pocházejícího z rodičovského kmene STS. Zbytek genomu pochází od rodičovského kmene BALB/c. Každý kmen ze série CcS/Dem obsahuje jinou část genomu STS.

Ve své práci jsem používala F₂ hybridy mezi kmeny BALB/c a CcS-9. Tyto myši byly infikovány *L. major*, osm týdnů po infekci byly zabity a byly hodnoceny fenotypové parametry infekce: velikost kožních lézí, hepatomegalie, splenomegalie, množství parazitů ve slezině a lymfatických uzlinách a hladina IFN γ , IL-4, IL-10, IL-12, IL-13 a IgE v krevním séru. Všechny F₂ hybridy jsem genotypizovala pomocí osmnácti mikrosatelitních markerů.

Provedla jsem vazebnou analýzu mezi genetickými markery a jednotlivými fenotypovými parametry. Pro tento účel jsem použila analýzu rozptylu (ANOVA). Nalezla jsem pět lokusů, které u kmene CcS-9 kontrolují jeden nebo více fenotypových parametrů. Potvrdila jsem polohu a našla nové funkce lokusů *Lmr15* a *Lmr18*, které kontrolují odpověď vůči infekci *L. major* u kmenů CcS-16 a CcS-20. Dále jsem zmapovala tři nové lokusy: *Lmr24*, *Lmr25* a *Lmr26*. Následující výzkum se zaměří na hledání kandidátních genů, které se nacházejí v těchto lokusech. Přesné určení genů, které kontrolují odpověď k infekci *L. major*, nám dovolí lépe porozumět mechanismům a genetické diverzitě, která podmiňuje průběh nemoci.

Leishmania major – imunitní odpověď – genetická kontrola – myší model - lokusy kontrolující kvantitativní znaky (QTL) – vazebná analýza

MAPPING OF GENES, WHICH MODIFY SUSCEPTIBILITY TO *Leishmania major* INFECTION

Leishmania parasites cause complex of diseases that are called leishmaniasis. Symptoms of leishmaniasis range from subclinical to extensive systemic disease with splenomegaly, hepatomegaly, skin lesions, anemia and hyperglobulinemia and in some cases, it can lead to death. It was established that the disease is controlled by many genes, but the basis of variation of symptoms is still unknown. Many of the symptoms observed in human can be studied in mouse model.

The dissection of genetic and functional aspects of susceptibility to infection of *L. major* was performed using two contrasting inbred strains BALB/cHeA (susceptible to infection) and STS/A (resistant to infection) and a set of 20 CcS/Dem recombinant congenic strains. Each of the 20 CcS/Dem strains contains a unique random set of 12.5% genes from the resistant donor strain STS and 87.5% genes from the susceptible background strain BALB/c. The CcS/Dem strains differ in part of STS genome between each other.

I have used F₂ hybrids between the intermediately resistant recombinant congenic strain CcS-9 and the susceptible strain BALB/c. F₂ hybrids were infected by *L. major* and were killed at week 8th after infection. I tested the disease phenotype (including skin lesion size, hepatomegaly, splenomegaly, parasite load in spleen and lymph nodes and levels of IgE, IFN γ , IL-4, IL-10, IL-12 and IL-13 in serum) and genotyped all F₂ hybrids by eighteen microsatellite markers.

I performed linkage analysis between genetic markers and each phenotypic parameter using analysis of variance (ANOVA). I found five loci which control one or more phenotypic parameters. I confirmed position and found new functions of locus *Lmr15* and *Lmr18*, which influence response to *L. major* in strains CcS-16 and CcS-20, respectively, and mapped three novel loci: *Lmr24*, *Lmr25* and *Lmr26*. Future research will be concentrated on finding candidate genes in these loci. The definition of genes controlling response to *L. major* infection will permit a better understanding of pathways and genetic diversity underlying the course of disease.

Leishmania major – immune response – genetic control - mouse model – quantitative trait loci (QTL) - linkage analysis

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1. ÚVOD	10
2. PŘEHLED LITERATURY	13
2.1. Parazit a hostitel	14
2.2. <i>Leishmania</i>	14
2.2.1. Klasifikace	15
2.2.2. Morfologie	15
2.2.3. Životní cyklus	16
2.3. Leishmanióza	18
2.3.1. Klinické projevy nemoci u lidí	18
2.3.2. Faktory ovlivňující rozvoj nemoci	21
2.4. Model: myší infekce způsobená parazitem <i>Leishmania major</i>	22
2.4.1. <i>Leishmania major</i> – modelový parazit	22
2.4.2. Imunologické pozadí infekce <i>L. major</i>	22
2.5. Genetická analýza	25
2.5.1 Genetická analýza kvantitativních znaků	25
2.5.2 Modelové systémy pro genetickou analýzu	28
2.5.3.Genetická analýza rezistence k <i>L. major</i>	31
3. MATERIÁL A METODY	37
3.1. Pokusná zvířata	38
3.1.1. Laboratorní myš	38
3.1.2. <i>Leishmania major</i>	38
3.1.3. Schéma pokusu	38
3.2. Izolace DNA z myších ocásků	39
3.3. Genotypizace	40
3.3.1. Princip genetické typizace myších alel	40
3.3.2. Polymerázová řetězová reakce pomocí neznačených primerů.....	41
3.3.3. Elektroforéza na agarózovém gelu	41
3.3.4. Polymerázová řetězová reakce s radioaktivně značenými primery	42
3.3.5. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu	43
3.3.6. Autoradiografie	44
3.4. ELISA	44
3.4.1. Princip metody	44

3.4.2. Stanovení koncentrace IgE, IL-4, IL-10, IL-12 a IFN γ v myším séru	45
3.4.3. Stanovení koncentrace IL-13 v myším séru	46
3.5. Statistika	47
4. VÝSLEDKY	49
4.1. Genotypizace F ₂ hybridů mezi kmeny BALB/c a CcS-9	50
4.2. ELISA	56
4.3. Statistika	65
5. DISKUZE	69
5.1. Hledání genů, které kontrolují určitý znak	70
5.2. Genetická analýza genů kontrolujících vnímavost k infekci <i>L.major</i>	70
5.3. Detekované vazby	71
5.3.1. <i>Lmr15</i>	71
5.3.2. <i>Lmr18</i>	74
5.3.3. <i>Lmr24</i>	75
5.3.4. <i>Lmr25</i>	75
5.3.5. <i>Lmr26</i>	75
6. SOUHRN	76
7. SEZNAM LITERATURY	78

SEZNAM ZKRATEK

AA	akrylamid
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid
AIL	linie pokročilého křížení (advanced intercross line)
ANOVA	analýza rozptylu (analysis of variance)
AV ČR	Akademie věd České republiky
BAA	bisakrylamid
<i>Bbaa4</i>	lokus „ <i>B.burgdorferi</i> -associated arthritis 4“
bp	pár bází (base pair)
BSA	bovinní serumalbumin
<i>Casp3</i>	gen pro kaspázu 3
CcS/Dem	rekombinantní kongenní kmeny myši připravené křížením a šlechtěním rodičovských kmenů BALB/c a STS
CD	povrchové molekuly leukocytů (cluster of differentiation)
cM	centimorgan
dATP	deoxyadenozintrifosfát
DCL	difúzní kožní leishmanióza
dCTP	deoxycytozintrifosfát
dGTP	deoxyguanozintrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleozintrifosfát
DTT	dithiotreitol
dTTP	deoxythymozintrifosfát
EtBr	ethidium bromid
FCS	fetální bovinní sérum (fetal calf serum)
gp63	glykoprotein 63
GTM	„genome-tagged“ myši
EDTA	ethylenediamintetraoctová kyselina
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
H ₃ BO ₃	kyselina boritá
IFN γ	interferon gamma
<i>Ifng</i>	gen pro interferon gamma
<i>Ifngr2</i>	gen prointerferon gamma receptor 2
IgE	imunoglobulin E
<i>Igk</i>	gen pro imunoglobulinový kappa řetězec
IL	interleukin
<i>Il1</i>	gen pro IL-1
<i>Il12a</i>	gen pro IL-12a
<i>Il12rb</i>	gen pro IL-12 receptor b
<i>Il6ra</i>	gen pro alfa podjednotku receptoru pro IL-6
iNOS	inducibilní NO syntáza
<i>Ity3</i>	lokus „immunity to <i>S. typhimurium</i> 3“
kb	kilobáze (1000 nukleotidových bází)
KB	kinázový pufr (Kinase Buffer)
KCl	chlorid draselný
KH ₂ PO ₄	dihydrogenfosforečnan draselný
LCL	lokální kožní leishmanióza
<i>Lmr</i>	<i>Leishmania major</i> response

<i>Lmrq</i>	<i>Leishmania major</i> resistance QTL
LPG	lipofosfoglykan
MCAF	chemotaktický faktor aktivující monocyty (monocyte chemotactic and activating factor)
MgCl ₂	chlorid hořečnatý
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
MIF	faktor inhibující migraci (migration inhibitory factor)
NaCl	chlorid sodný
Na ₂ HPO ₄	hydrogenfosforečnan sodný
NCSS	statistický program (number cruncher statistical system)
NK buňky	přirození zabíječi (natural killer)
NO	oxid dusnatý
NOS2	NO syntáza 2
PAA	polyakrylamid
PBS	fosfátový pufr (phosphate buffer solution)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PCR-ELISA	metoda kombinující metody PCR a ELISA
PNK	polynukleotid kináza
QTL	lokus, který kontroluje kvantitativní znak (quantitative trait locus)
RCS	rekombinantní kongenní kmen (recombinant congenic strain)
RNA	ribonukleová kyselina
RIS	rekombinantní inbrední kmen (recombinant inbred strain)
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
<i>Scvr</i>	gen pro scavenger receptor
<i>Scya</i>	gen pro malý inducibilní cytokin
SDP	vzor kmenové distribuce (strain-distribution pattern)
SDS	sodium dodecylsulfát
sIgA	sekretovaný imunoglobulin A
SNP	jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)
SSLP	polymorfismus v délce jednoduché sekvence (simple sequence length polymorphism)
<i>Ssta4</i>	lokus „susceptibility to <i>S. typhimurium</i> antigens 4“
<i>Stat6</i>	gen pro signální transduktor a aktivátor transkripce 6
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-1-,2-diaminomethane
TGFβ	transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)
T _h lymfocyty	pomocné T lymfocyty (CD4+)
T _h 1 odpověď	imunitní odpověď mediovaná T _h 1 lymfocyty
T _h 2 odpověď	imunitní odpověď mediovaná T _h 2 lymfocyty
TK H ₂ O	voda pro tkáňové kultury
TNFα	faktor nekrotizující nádory alfa (tumor necrosis factor α)
<i>Tnfsf4</i>	gen pro „tumor necrosis factor superfamily 4“
<i>Tnfsf6</i>	gen pro FasL
T _{reg}	regulační T lymfocyty (CD4+CD25+)
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultrafialový
VCL	viscerální leishmanióza
<i>Xdh</i>	gen pro xanthin dehydrogenázu

1. ÚVOD

Leishmanióza je označení pro skupinu nemocí se širokým spektrem klinických příznaků od spontánně se hojících kožních vředů po těžké viscerální onemocnění, které může končit i smrtí. Tato onemocnění jsou způsobena intracelulárními parazity – prvoky rodu *Leishmania*.

Vnímavost hostitele vůči infekci tímto parazitem je kontrolována polygenně. Rozpoznání genetických mechanismů v kombinaci s klinickými studiemi nám může poskytnout informace, na základě kterých by bylo možné předpovědět průběh nemoci konkrétního jedince a díky tomu optimalizovat jeho léčbu.

Navíc se jeví jako pravděpodobné, že některé imunitní mechanismy, které se zapojují v obraně proti infekci *Leishmania*, se uplatňují i při jiných příležitostech, takže bude možné výsledky využít i při objasňování obecných principů fungování a regulace imunitního systému.

Laboratoř molekulární a buněčné imunologie se zabývá genetickou a funkční analýzou genů, které ovlivňují imunitní reakce. Důležitým modelovým systémem je studium imunitní odpovědi myši na infekci vnitrobuněčným parazitem *Leishmania major*. Hlavním cílem práce je identifikace genů, které tyto odpovědi kontrolují, a objasnění jejich funkcí.

Cílem mé práce bylo mapování genů, které kontrolují odpověď k *L. major* u kmene CcS-9 pomocí speciálního genetického modelu – kříženců rekombinantních kongenních myších kmenů, konkrétně F₂ hybridů mezi rodičovským kmenem BALB/cHeA (dále jen BALB/c) a rekombinantním kmenem CcS-9. Tento cíl lze rozdělit do několika dílčích úkolů:

- 1) Připravit F₂ hybridy mezi rodičovskými kmeny CcS-9 a BALB/c.
- 2) Fenotypizace F₂ hybridů, tj. určení orgánové patologie (velikosti lézí, hepatomegalie, splenomegalie) a příznaků systémové imunitní reakce (hladina cytokinů a IgE v krevním séru) po infekci *L. major*.
- 3) Pomocí mikrosatelitních markerů genotypizovat úseky genomu F₂ hybridů mezi rodičovskými kmeny BALB/c a CcS-9 a zjistit, které pocházejí z kmene STS/A (dále jen STS).
- 4) Statisticky vyhodnotit vztahy mezi genotypy (zjištěné genotypizací) a fenotypovými znaky (hladinami cytokinů a IgE v séru, hepatomegalii, splenomegalii, množstvím parazitů v uzlinách a slezině, velikostí kožních lézí) těchto F₂ hybridů

s použitím statistického programu NCSS (analýza rozptylu, ANOVA) a detekovat vazby mezi genotypem a fenotypovými znaky.

5) V případě detekce vazeb mezi genotypem a fenotypovými znaky, srovnat získané výsledky s již publikovanými údaji a případně určit nové, dosud nepopsané lokusy, které obsahují geny kontrolující vnímavost k infekci *L. major*.

Osobně jsem se na tomto projektu podílela realizací bodů 3 - 5 a částečně i bodu 2 (tj. genotypizace F₂ hybridů, stanovení hladin cytokinů a IgE v krevním séru, statistického vyhodnocení a určení nových lokusů).

2. PŘEHLED LITERATURY

2.1. PARAZIT A HOSTITEL

Parazita můžeme definovat jako organismus, který pravidelně tráví určitou fázi svého života asociován s jedním určitým jedincem hostitelského druhu, přičemž má z této asociace užitek a hostitelský organismus škodu. Z této definice jasně vyplývá, že se hostitelský organismus bude snažit buď se vůbec neinfikovat a nebo v případě již získané infekce parazita eliminovat. Vztah hostitele a parazita je tedy neustálým víceméně vyrovnaným soubojem, kdy oba protihráči vymýšlejí různé způsoby, jak soupeře přemoci a zároveň jak odrážet jeho útoky.

Hostitel se brání proti útokům parazita na několika úrovních. První ochrannou bariérou je neporušený povrch kůže a sliznic a jejich přirozené neimunitní obranné mechanismy. Ty lze rozdělit na mechanické, chemické a mikrobiální a všechny mají své nezastupitelné místo v obraně proti infekcím.

Pokud je tato první bariéra parazitem prolomena, nastupuje do boje imunitní systém hostitele. Imunitní systém obecně se skládá ze dvou základních částí – nespecifická (vrozená) imunita, která je založena na molekulách a buňkách, které jsou v organismu připraveny předem, a specifická (adaptivní) imunita, jejíž mechanismy reagují na každou cizorodou strukturu vysoce specificky a aktivují se až po setkání s daným antigenem. Specifická imunita se dělí na buněčnou (zprostředkovanou T-lymfocyty) a humorální (základem jsou protilátky).

V boji proti konkrétnímu parazitovi většinou převládá jen jeden typ imunity (buď buněčná nebo humorální), který je závislý na životní strategii parazita. Nicméně k úspěšnému potlačení infekce je téměř vždy potřeba, aby správně fungovaly všechny složky specifické i nespecifické imunity.

Během evoluce vyvinuli paraziti řadu mechanismů, kterými se snaží obejít obranné mechanismy hostitele. Jako příklad je možno uvést změnu povrchových molekul, molekulové mimikry, únik do buněk hostitele či do imunologicky privilegovaných míst, snížení exprese hostitelových MHC glykoproteinů, inhibici produkce protilátek či cytokinů, inhibici komplementu, fagocytózy, oxidačního vzplanutí v makrofázích nebo štěpení blokujících protilátek sIgA.

2.2. LEISHMANIA

Rod *Leishmania* (česky ničivka) patří do kmene Mastigophora, třídy Kinetoplastida, čeledi Trypanosomatidae. Prvok *Leishmania* je intracelulárním jednobuněčným

obligátním parazitem obratlovců včetně člověka. Rozšířen je v tropickém a subtropickém pásmu všech kontinentů s výjimkou Antarktidy. Dříve bylo uváděno, že se nevyskytuje ani v Austrálii, ale v roce 2004 byl publikován objev infekce způsobené rodem *Leishmania* u klokana (ROSE *et al.*, 2004).

Leishmania působí u lidí i ostatních savců komplex onemocnění s různými klinickými příznaky a různého stupně závažnosti: základní dělení onemocnění je na kožní, kožněslizniční (espundia) a viscerální (kala-azar). Rezervoárovými hostiteli jsou nejčastěji drobnější obratlovci – převážně hlodavci, psi a lišky.

2.2.1. KLASIFIKACE

Morfologicky se jednotlivé druhy rodu *Leishmania* od sebe neliší. Jsou mezi nimi ale poměrně velké rozdíly genetické, a dále rozdíly v klinických projevech onemocnění, v geografickém rozšíření a ekologických faktorech. Podle výše uvedených kritérií tedy můžeme druhy rodu *Leishmania* rozdělit do tří hlavních skupin:

I. Původci kožních leishmanióz Starého světa: *L. tropica* (poddruhy *L. t. tropica* a *L. t. aethiopica*) a *L. major*.

II. Původci kožních a kožněslizničních leishmanióz Nového světa: *L. mexicana* (poddruhy *L. m. mexicana*, *L. m. pifanoi* a *L. m. amazonensis*) a *L. brasiliensis* (poddruhy *L. b. brasiliensis*, *L. b. guyanensis*, *L. b. peruviansis* a *L. b. panamensis*).

III. Původci viscerálních leishmanióz Starého i Nového světa: *L. donovani* (poddruhy *L. d. infantum*, *L. d. chagasi* a *L. d. donovani*) (LEIBY *et al.*, 1994).

Někteří autoři dělí rod *Leishmania* podle způsobu jejich vývoje v trávicím traktu vektora na dva podrody: podrod *Leishmania* a podrod *Viannia* (do tohoto druhého podrodu je řazen druh *L. (V.) braziliensis* se svými poddruhy) (LAINSON a SHAW, 1987).

(Možností, jak třídit jednotlivé druhy rodu *Leishmania*, je celá řada a jednotliví autoři se rozcházejí hlavně v tom, co označit pouze jako poddruh a co je již samostatný druh.)

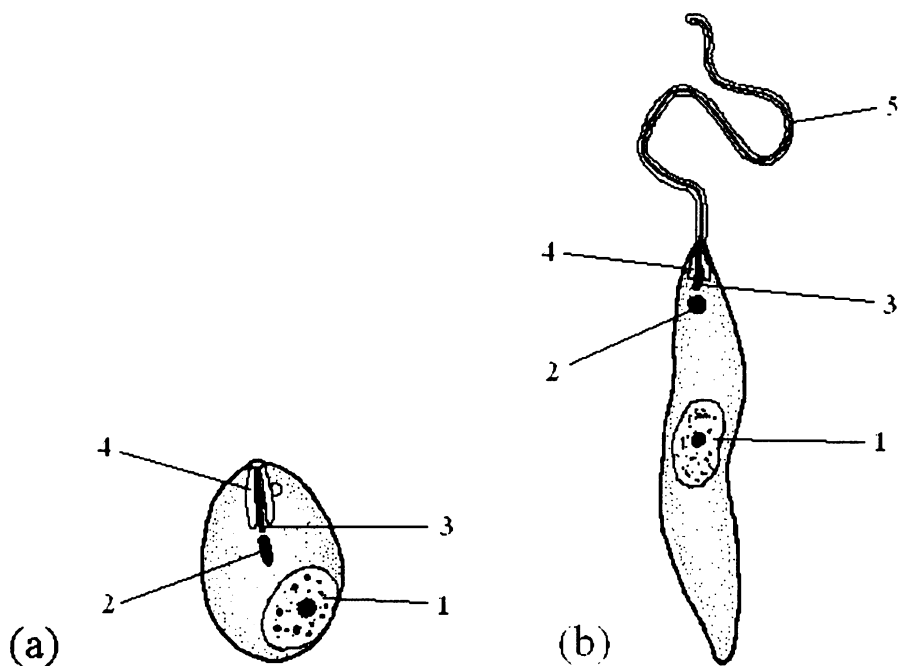
2.2.2. MORFOLOGIE

Prvok *Leishmania* je jednobuněčný živočich s eukaryotní stavbou buňky. V jeho životním cyklu dochází ke značným morfologickým a fyziologickým změnám podle

prostředí, ve kterém se vyskytuje – jedná se o dvě základní životní stadia: promastigotní a amastigotní (viz. Obr.1).

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

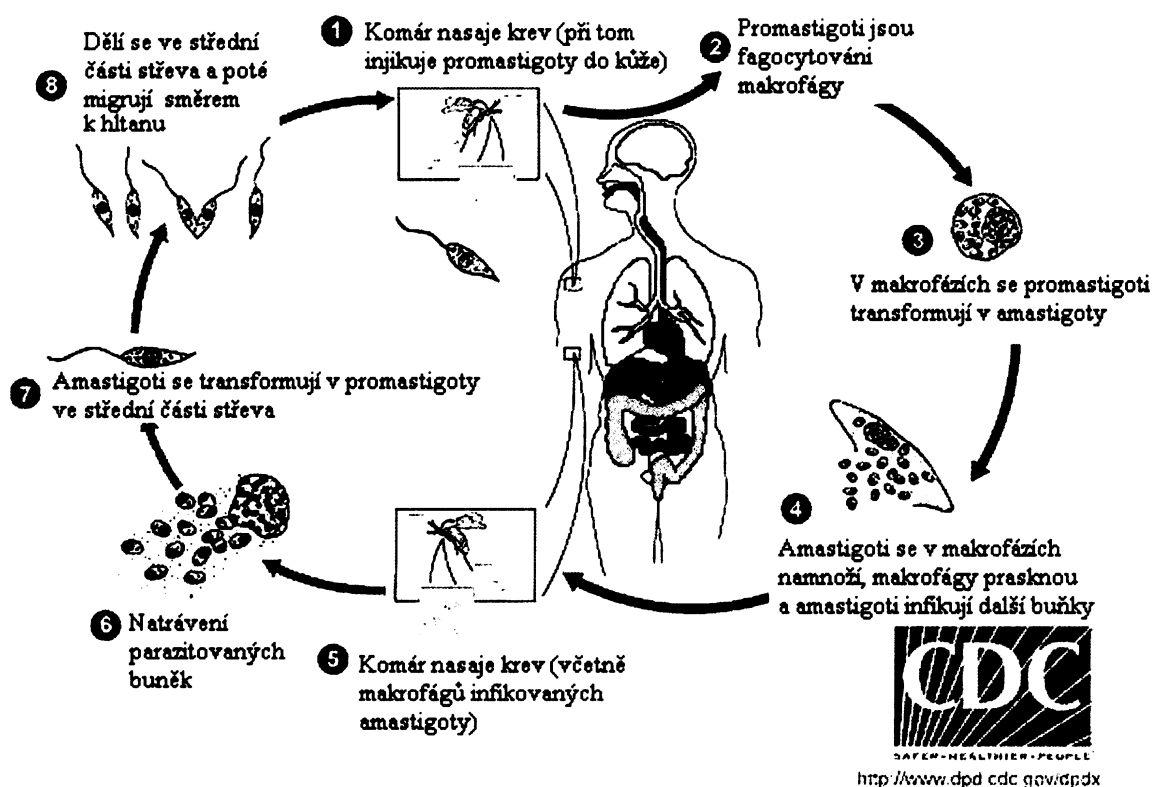
Specifickou organelou všech Kinetoplastid, mezi které rod *Leishmania* patří, je kinetoplast, který je lokalizován u báze bičíku. Obsahuje mimojadernou mitochondriální DNA, celkem až 10-20% celkové DNA buňky. Morfologicky se jedná o několik vzájemně propletených kruhových molekul – minikroužků a maxikroužků. Maxikroužky obsahují geny pro rRNA a proteiny nezbytné pro funkční aktivaci mitochondrie při přenosu na vektora. Minikroužky obsahují geny pro guide RNA, která umožňuje čtení genů na maxikroužcích. Zároveň mají minikroužky i strukturální funkci, protože hrají roli při rovnoměrném rozdělování maxikroužků při dělení kinetoplastu.



Obr. 1: *Leishmania major*. (a) amastigot; (b) promastigot. 1 – jádro, 2 – kinetoplast, 3 – kinetozóm, 4 – axonema, 5 – bičík. (podle ROBERTS a JANOVY, 2000)

2.2.3. ŽIVOTNÍ CYKLUS

Životní cyklus rodu *Leishmania* se dělí na dvě hlavní části, které se od sebe liší morfologickou a fyziologickou strukturou parazita a místem, kde se parazit právě nachází. Přehledné schéma životního cyklu je na Obr. 2.



Obr.2: Životní cyklus *Leishmania* ssp. (přejato z www.dpd.cdc.gov/dpdx a upraveno).

Promastigotní stadium se vyvíjí v trávicí soustavě hmyzího vektora. Přenašečem rodu *Leishmania* jsou samice komárků rodu *Phlebotomus* (druhy *Phlebotomus* na území Starého světa, tj. v Evropě, Asii a v Africe, a *Lutzomyia* na americkém kontinentě). Komárek nasaje krev nakaženého obratlovce, která obsahuje makrofágy plné amastigotů. Ve střevě vektora se amastigoti uvolní a jsou obaleni peritrofní membránou, která je sekretována buňkami střední části střeva. Zde se amastigoti transformují v promastigoty. Dále ve střevě je pak tato membrána narušena a promastigoti se uvolňují do střev. Dochází k jejich masivnímu dělení a dalšímu složitému vývoji a přeměně v infekční stadium. Tato část cyklu - od nasátí makrofágů s amastigoty až po přeměnu v infekční formu promastigotů - se délkou trvání liší u jednotlivých druhů leishmánie a trvá od 6 - 14 dnů. Později se promastigoti přemístí do hlitanu a přední části střeva a při bodnutí se dostávají společně se slinami komárka do krve savčího hostitele. Zdá se, že pro úspěšné přenesení leishmánie je důležitá právě některá složka slin komárka (THEODOS *et al.*, 1991; TITUS a RIBEIRO, 1988, 1990).

Uvnitř hostitelského organismu jsou promastigoti chráněni před prvními útoky nespecifických imunitních mechanismů pláštěm z lipofosfoglykanů, tzv. glykokalyxem. Takto se může parazit dostat až k buněčné membráně makrofága, připojit

se na ni prostřednictvím lipofosfoglykanu (LPG) a povrchového glykoproteinu gp63 a proniknout dovnitř mechanismem fagocytózy. V makrofázích se parazit mění v bezbičíkaté amastigotní stadium a velice intenzivně se množí ve fagozómech, příp. fagolysozómech (vznikajících fúzí fagozómů s lysozomy). Dochází k prasknutí makrofágů, uvolnění amastigotů a jejich invazi do okolních buněk. V této fázi mohou být infikované buňky nasáty spolu s krví přenašečem, v jehož střevě dojde k jejich prasknutí a uvolnění amastigotů (LEIBY *et al.*, 1994, MOLYNEUX a KILLICK-KENDRICK, 1987).

2.3. LEISHMANIÓZA

Pod souhrnným označením leishmaniózy se skrývá komplex lidských onemocnění působených prvky rodu *Leishmania*. Do tohoto komplexu onemocnění spadají choroby různého stupně závažnosti a nejrůznějších klinických projevů: od jednoduchých spontánně vyléčitelných kožních lézí, kdy zůstávají paraziti lokalizováni v místě bodnutí, až po viscerální infekce, charakterizované rychlým rozšířením parazitů z místa primární infekce a jejich usídlením ve vnitřních orgánech. Různé klinické formy leishmaniózy jsou obvykle spjaty s různými druhy parazita.

2.3.1. KLINICKÉ PROJEVY NEMOCI U LIDÍ

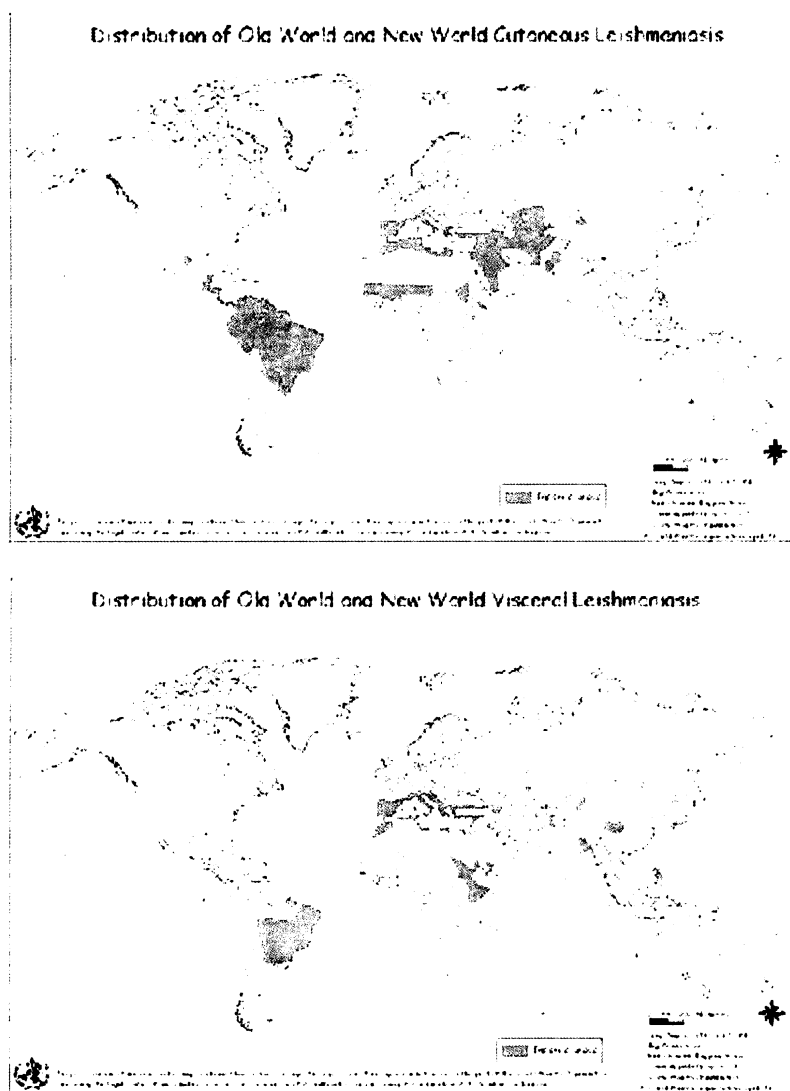
Leishmanióza postihuje 12 milionů lidí na světě, 350 milionů lidí v 88 zemích je touto chorobou ohroženo (www.who.int/leishmaniasis/en/). Každý rok přibývá půl miliónu nových případů viscerální a 1,5 miliónu případů kožní formy tohoto onemocnění.

Nemoc je rozšířená především v tropickém a subtropickém pásmu Asie, Afriky a Ameriky a její výskyt je vázán na životní prostředí vektora (viz. mapky rozšíření na Obr.3).

Existují tři hlavní typy projevu onemocnění: kožní, kožněslizniční a viscerální. Přitom 90 % viscerální formy se vyskytuje v Bangladéši, Brazílii, Indii, Nepálu a Súdánu, 90 % výskytu kožní formy bylo zaznamenáno v Afghánistánu, Brazílii, Íránu, Peru, Saudské Arábii a Sýrii (viz. Obr.4).

2.3.1.1. LOKÁLNÍ KOŽNÍ LEISHMANIÓZA (LCL)

Lokální kožní leishmanióza, působená hlavně druhy *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. tropica* a *L. major*, je nejběžnější formou leishmaniózy ve Starém i Novém světě.



Obr.3: Rozšíření kožní (nahore) a viscerální (dole) formy leishmaniózy. (Přejato z www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html)

Hlavním projevem jsou kožní vředy (nazývají se například bagdádské boule) a léze charakterizované zvýšenými okraji, které obsahují infikované zánětlivé makrofágy, a středem tvořeným nekrotickou tkání. Léze se spontánně vyléčí během několika měsíců až jednoho roku, ale zanechávají po sobě výrazné jizvy. K léčbě se používají nejčastěji chemoterapeutika. Onemocněním se získá částečná imunita k opakovaným infekcím, ale pouze k těm, které jsou způsobené tímž druhem parazita. Nefunguje zde zkřížená imunita.

2.3.1.2. DIFÚZNÍ KOŽNÍ LEISHMANIÓZA (DCL)

Difúzní kožní leishmanióza je působena druhy *L. mexicana* a *L. tropica*. Vyznačuje se kožními metastázemi rozšířenými z místa původní léze, přičemž rozšíření parazitů

do vnitřních orgánů není pozorováno. Často k ní dochází u lidí s defektní imunitou. Pacienti s touto formou onemocnění často mají špatně proliferující T lymfocyty.

2.3.1.3. KOŽNĚSLIZNIČNÍ LEISHMANIÓZA (MCL)

Kožněslizniční leishmanióza (neboli espundia) se vyskytuje pouze v Novém světě. Vyvine se jen u malé části (zhruba u 2%) pacientů, kteří byli infikováni *L. braziliensis*. Nepostihuje pouze kůži, ale také sliznice. Léze jsou chronické a často nekrotické, stále je v nich přítomno malé množství parazitů. Onemocnění vede k částečné až úplné destrukci sliznice nosu a úst a okolních tkání. Tato forma leishmaniózy pravděpodobně výrazně souvisí kromě druhu leishmánie také s genetickým pozadím hostitele.

2.3.1.4. VISCERÁLNÍ LEISHMANIÓZA (VL)

Viscerální leishmaniózu způsobují tři poddruhy druhu *L. donovani* (*L. d. donovani*, *L. d. infantum* a *L. d. chagasi*). Infekce způsobená *L.d.infantum* má lehčí průběh než infekce způsobená zbylými poddruhy. Infekce působená *L.d.donovani* je nazývána kala-azar, černá nemoc. Někdy dochází i k visceralizaci infekce způsobené druhem *L. tropica*, která obvykle působí jen kožní leishmaniózu.

Onemocnění je charakterizováno horečkou, malátností a výrazným zvětšením jater a sleziny. Krevní obraz ukazuje snížený počet neutrofilů a trombocytů, častá je anemie. Přidružené infekce se podílejí na vysoké mortalitě VL. V souvislosti s obranou proti parazitům se uvolňuje hojné množství protilátek a dochází k hypergamaglobulinemii (LEIBY *et al.*, 1994). Pokud se tato forma leishmaniózy neléčí, je smrtelná.



Obr.4: Formy leishmaniózy. A kožní (LCL), B. kožněslizniční (MCL), C. viscerální (VL).

2.3.2. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ ROZVOJ NEMOCI

Typ a závažnost onemocnění, které se rozvine u vnímavých pacientů po bodnutí infikovaným hmyzem, závisí na několika faktorech. Relativní důležitost každého z nich není ještě zcela přesně definována.

2.3.2.1. POČET PROMASTIGOTŮ V INFEKČNÍM INOKULU

V případě malého počtu promastigotů nemusí vůbec dojít k infekci, nicméně absolutní počet nutný ke vzniku a rozvoji infekce se pravděpodobně liší od jedince k jedinci. Čím více promastigotů je v inokulu, tím kratší je doba inkubace a tím dříve se projeví klinické léze. Průměrný počet inokulovaných promastigotů se pohybuje mezi desítkami až stovkami (GRIFFITHS, 1987).

2.3.2.2. POČET A MÍSTO BODNUTÍ

V případě vícečetného bodnutí, ať již jedním komárkem v jeden okamžik či opakovaným bodnutím v krátkém časovém úseku, dochází ke vzniku vícečetných lézí v oblasti těchto bodnutí (GRIFFITHS, 1987).

U myši bylo prokázáno, že je také důležité, do jaké části těla je parazit injikován (KIRKPATRICK *et al.*, 1987).

2.3.2.3. STAV IMUNITY PŘED INFEKČÍ

Zdá se, že dříve prodělaná infekce leishmáníí vyústí v dlouhodobou imunitu proti nové infekci. Tato imunita se jeví pouze jako částečná; udává se, že asi 10 % lidí může znovu onemocnět. To má dva možné důvody: může se jednat o nákazu jiným druhem leishmánie, na který se získaná imunita nevztahuje, nebo obecně o sníženou imunitu hostitelského organismu (GRIFFITHS, 1987).

2.3.2.4. KMEN LEISHMÁNIE

Bylo definováno velké množství různých kmenů patřících do rodu *Leishmania*. Jeví se jako pravděpodobné, že každý způsobuje odlišné spektrum klinických projevů onemocnění (GRIFFITHS, 1987).

2.3.2.5. GENETICKÉ VLIVY

U různých druhů hostitelů bylo pozorováno široké spektrum citlivosti vůči nákaze, a to od téměř rezistentních jedinců po jedince, u nichž se infekce rozvíjí s maximální intenzitou. Z předešlých výzkumů je jasné, že stupeň citlivosti k infekci je určen i geneticky (GRIFFITHS, 1987).

2.4. MODEL: MYŠÍ INFEKCE ZPŮSOBENÁ PARAZITEM *LEISHMANIA MAJOR*

2.4.1. *LEISHMANIA MAJOR* - MODELOVÝ PARAZIT

Jako experimentální model pro studium infekce parazity rodu *Leishmania* byl zvolen druh *L. major*. U lidí působí *L. major* pouze kožní patologie, ale u myši může působit systemické patologie podobné těm, které u lidí působí *L. donovani* (REINER *et al.*, 1993).

U většiny myších kmenů nepůsobí infekce *L. major* žádné nebo jen velmi slabé onemocnění. Infekce některých inbredních kmenů (např. CBA, C3H/HeA, TS/A, B10.D2, C57BL/6) vede k vývoji lézí, které se spontánně hojí. Pouze u několika kmenů (např. BALB/cHeA, NZW, CB.17, DBA/2) vzniknou po infekci nehojící se léze, případně se nemoc rozvine ve visceralizující formu, která většinou končí smrtí myši do 12 - 15 týdnů od počátku infekce (MARX, 1996, MITCHELL *et al.*, 1981). Bylo popsáno, že rozdíly mezi citlivými a rezistentními kmeny mohou být způsobeny odlišnými funkcemi T_h (pomocných) lymfocytů.

Předpokládalo se, že vnímavý fenotyp je spojen s T_h2 odpovědí, zatímco fenotyp rezistentní s odpovědí T_h1 (REINER a LOCKSLEY, 1995). Později bylo ukázáno, že průběh infekce mohou významně ovlivňovat také další typy buněk – dendritické buňky, NK buňky, T regulační (Treg) lymfocyty a neutrofilů (SACKS a NOBEN-TRAUTH, 2002).

2.4.2. IMUNOLOGICKÉ POZADÍ INFEKCE *L. MAJOR*

Výsledek infekce *L. major* závisí mimo jiné také na imunologické způsobilosti jedince bojovat proti množení parazita. Následující podkapitoly se budou podrobněji zabývat úlohou T buněk a makrofágů v boji proti infekci *L. major*.

2.4.2.1. ROLE T-LYMFOCYTŮ

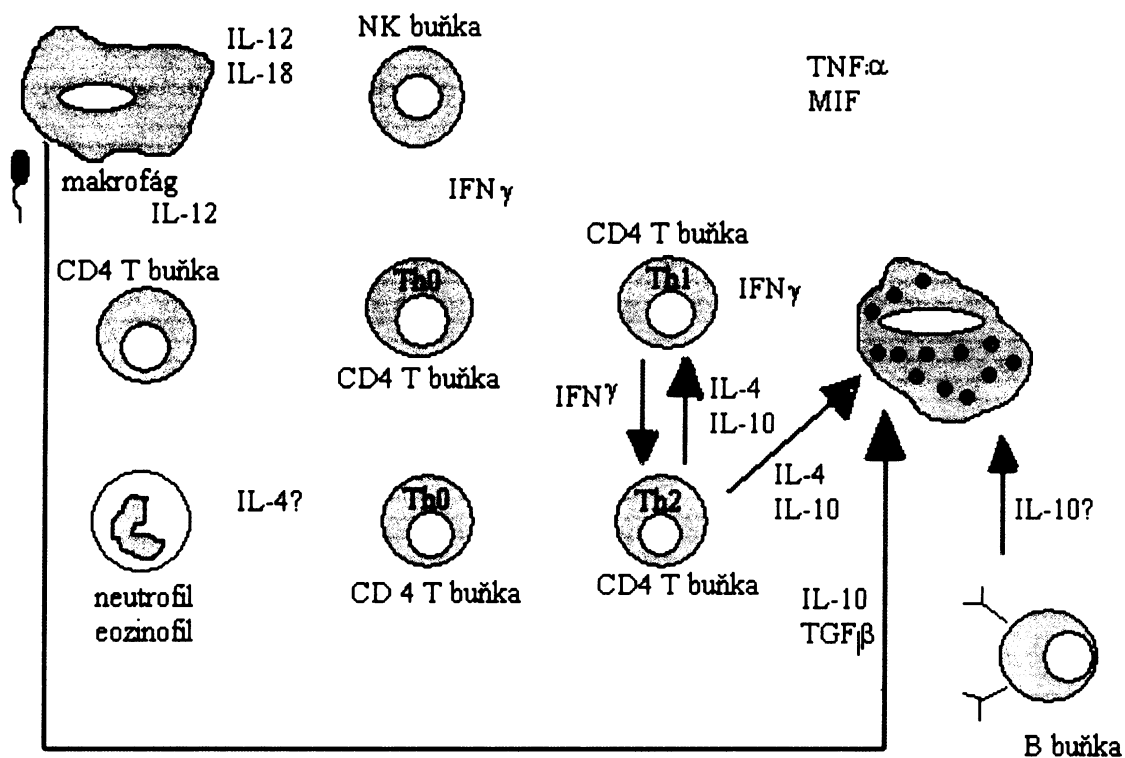
Bylo popsáno, že obranná imunitní odpověď proti myši leishmanióze je závislá na schopnosti zvířete ustanovit interleukin 12 (IL-12)-řízenou CD4+ T_h1 odpověď, která ústí v produkci interferonu gamma (IFN γ). Navození citlivosti vůči infekci není tak jednoznačně určeno, významnou roli zřejmě hraje interleukin 4 (IL-4) a T_h2 odpověď (REINER a LOCKSLEY, 1995).

Navození odolnosti k infekci vyžaduje indukci a rozvoj specifických CD4+T_h1 buněk, které se vyvíjejí v prostředí IL-12 a které produkují IFN γ . IL-12 je produkován makrofágy a dendritickými buňkami a kromě T_h1 lymfocytů aktivuje i NK buňky, které slouží jako časný zdroj IFN γ . IFN γ aktivuje v makrofázích inducibilní NO syntázu (iNOS), která syntetizuje z L-argininu oxid dusnatý (NO). Produkce NO je nezbytná pro leishmanicidní aktivitu makrofágů.

Naopak IL-4 a další cytokiny produkované T_h2 lymfocyty fungují jako deaktivátory makrofágů. IL-4 inhibuje tvorbu NO v makrofázích. Dále snižuje produkci IL-12 a IFN γ , čímž potlačuje T_h1 odpověď (viz. Obr. 5).

Toto jasné rozlišení rezistence a citlivosti k infekci v závislosti na T_h1 a T_h2 odpovědi, které bylo pozorováno u některých myších kmenů (BALB/c, C57BL/6) infikovaných *L. major*, však nebylo pozorováno u viscerální formy leishmaniózy u lidí, která je způsobena *L. donovani*. U ní je sice rezistence spojena s T_h1 odpovědí, ale T_h2 cytokiny neurčují citlivost vůči infekci. Celá situace je patrně složitější a nelze ji vysvětlovat pouze na základě klasického schématu T_h1/T_h2 (ALEXANDER a BRYSON, 2005, AWASTHI *et al.*, 2004, SACKS a NOBEN-TRAUTH, 2002).

Důležitou roli v kontrole infekce *L. major* hrají také CD4+CD25+ Treg lymfocyty. Tyto regulační T lymfocyty tvoří u naivních myší 5-10% periferních CD4+ T lymfocytů a potlačují potenciálně patogenní imunitní odpovědi (přehnané nebo špatně zacílené) *in vivo*. Produkují vysoké hladiny IL-10 a TGF β . Během infekce *L. major* se Treg lymfocyty shromažďují v kůži, kde zeslabují schopnost CD4+ T buněk odstranit parazity, čímž mohou zpomalit až úplně znemožnit vyléčení. Na druhou stranu se mezi CD4+CD25- a CD4+CD25+ T buňkami vytváří rovnováha, která umožní malému množství parazitů v tkáni dlouhodobě přežít. Díky tomu je navozena rezistence vůči reinfekci, ale zároveň je zde nebezpečí reaktivace nemoci, například při oslabení imunity (BELKAID *et al.*, 2002, PETERS a SACKS, 2006).



Obr.5: Cytokiny a buňky zapojené do regulace imunitní odpovědi během myší kožní leishmaniózy. Zelené šipky představují aktivaci, červené naopak inhibici aktivity buněk, ke kterým směřují (podle ALEXANDER *et al.*, 1999).

2.4.2.2. ROLE MAKROFÁGŮ

Makrofágy jsou součástí buněčné nespecifické imunity. Jsou to profesionální fagocyty, které jsou schopné zabít intracelulární parazity a tato schopnost se po jejich aktivaci prudce zvyšuje.

Makrofágy jsou ale zároveň hlavními hostitelskými buňkami prvků rodu *Leishmania*. Usídlují se v nich promastigoti, kteří se vzápětí transformují v amastigoty. V makrofázích dále rostou a množí se. Občas se z makrofágů uvolní a pronikají do okolních buněk. Z těchto informací vyplývá, že *Leishmania* má účinný mechanismus, jak ovládat aktivitu makrofágů.

Indukce obranné reakce proti leishmanióze je závislá na produkci interleukinu 12 (IL-12) makrofágy. Cytokin IL-12 řídí CD4⁺ T_h1 odpověď a indukuje tvorbu IFN γ NK buňkami a T buňkami. IFN γ zprostředkovává ochranu skrze indukci exprese

NO syntázy 2 (NOS2) a produkci NO. Bylo zjištěno, že promastigoti mohou být potencionálními inhibitory produkce IL-12 makrofágy *in vitro* i *in vivo*.

Ke své aktivaci potřebují makrofágy stimulaci T_H1 buňkami pomocí prezentace komplexu MHC (major histocompatibility komplex) molekul II. třídy s antigenem a pomocí kostimulačních molekul – B7-1/B7-2 a CD40 na makrofázích a CD28 a CD40L na T buňkách. Bylo prokázáno, že interakce CD40-CD40L je kritická pro aktivitu NOS2, a dále pro mikrobicidní aktivitu makrofágů a vyléčení leishmaniózy (ALEXANDER *et al.*, 1999).

Makrofágy produkují ještě další cytokiny, kterými regulují svoji funkci autokrinním způsobem. Například TNF α (tumor necrosis factor alfa), MCAF (monocyte chemotactic and activating factor) a MIF (migration inhibitory factor) zesilují leishmanicidní aktivitu makrofágů a naopak interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10) a TGF β (transforming growth factor beta) ji zeslabují. Cytokiny hrají důležitou roli i v modulaci specifické imunitní odpovědi (ALEXANDER *et al.*, 1999, LIEW *et al.*, 1990).

2.5. GENETICKÁ ANALÝZA

2.5.1. GENETICKÁ ANALÝZA KVANTITATIVNÍCH ZNAKŮ

2.5.1.1. MONOGENNĚ A MULTIGENNĚ KONTROLOVANÉ ZNAKY

Fenotypové znaky můžeme rozdělit do dvou základních skupin. Do první skupiny patří znaky, které jsou kontrolovány jedním genem, příp. více geny, které jsou ale lokalizovány do jediného lokusu. Tyto lokusy můžeme jednoduše studovat pomocí zákonů Mendelovské genetiky. Nicméně takovéto znaky nejsou v přírodě příliš časté.

Daleko častěji se vyskytují znaky se souvislou změnou kvality či kvantity. Tyto znaky jsou kontrolovány různými alelami v několika genetických lokusech, přičemž každý lokus má na znak relativně malý vliv. Tento typ znaků je označován jako kvantitativní znaky a lokusy, které tyto kvantitativní znaky kontrolují, jsou nazývány lokusy kvantitativních znaků (QTL, quantitative trait loci). U těchto znaků neexistuje diskrétní fenotypová segregace a nemůže se tedy pro jejich studium využívat klasická Mendelovská genetika. Jejich studium znesnadňují také případné interakce mezi jednotlivými QTL, které kontrolují daný znak. Kvantitativní genetika závisí na statistice, která popisuje charakter souvislé fenotypové distribuce. Genetický základ variability

kvantitativních znaků byl donedávna zkoumán pouze pomocí statistického odhadu korelace mezi příbuznými jedinci nebo změnami průměru či rozptylu daného znaku v rámci křížení. Statistika však poskytuje pouze některé informace. K plnému pochopení vztahů mezi geny a znaky je třeba popsat kvantitativní genetickou variabilitu pomocí terminologie komplexní genetiky (MACKAY, 2001, TANKSLEY, 1993).

2.5.1.2. HISTORIE MAPOVÁNÍ QTL

K mapování QTL byly nejprve používány jednogenové morfologické markery (single gene markers). Metoda využívala vazbu mezi geny, které kontrolují kvantitativní rozdíly, a jednogenovými markery. Myšlenka byla jednoduchá: pokud je možné segregaci jednogenového markeru použít k detekci a odhadnutí efektu provázaného polygenu a jsou-li tyto jednogenové markery rozmístěny v celém genomu, je možné zmapovat a charakterizovat všechny polygeny ovlivňující konkrétní kvantitativní znak. Tato metoda má však mnoho nedostatků, mimo jiné velmi malý počet takových monogenních markerů. Navíc některé mohou mít na fenotyp větší vliv než mapovaný polygen.

Později byly objeveny molekulární markery. Geny, které kódují enzymy, mohou být podrobeny testování ohledně svého polymorfismu v přirozených populacích a geneticky zmapovány použitím elektroforetických technik nezávisle na jakékoli fenotypové změně. Nejlepšími molekulárními markery jsou genetické markery založené na DNA. Jejich alelická variace většinou nemá detekovatelný fenotypový efekt, zato jsou více polymorfní.

Molekulární markery mají oproti morfologickým několik výhod. Jednou z nich je fenotypová neutralita (to znamená, že alternativní alela molekulárního markeru většinou nezpůsobuje zřejmé změny fenotypu daného organismu), dále polymorfismus (morfologické markery jsou v přírodě vzácné, ale molekulové markery nejsou pod takovým selekčním tlakem a podléhají vyšší mutační rychlosti, díky čemuž mají větší alelickou variaci). Morfologické a molekulární markery se také liší v množství; zatímco počet využitelných morfologických markerů je omezen, markerů na bázi DNA je mnohem více (TANKSLEY, 1993).

Dalším nástrojem pro genetickou analýzu jsou jednonukleotidové polymorfismy (SNPs, single nucleotide polymorphisms). Tyto SNPs představují bodové pozice (jeden pár bazí) v genomové DNA, které se v normální populaci vyskytují v různých

alternativách (alelách). Použití SNPs v mapování QTL je stejné jako u molekulárních markerů na bázi DNA, pouze s tím rozdílem, že jsou v genomu zastoupeny s ještě větší četností (BROOKES, 1999, SCHORK, 2000).

2.5.1.3. STRATEGIE MAPOVÁNÍ QTL

Základním předpokladem použití markerových lokusů k detekci polygenů je vazebná nerovnováha mezi alelami markeru a alelami přidružených polygenů. Vazebná nerovnováha může být definována jako nenáhodná asociace alel různých lokusů v populaci. Hlavní příčinou této vazebné nerovnováhy je fyzická vazba lokusů.

Mezi strategie detekování polygenů patří jednobodová analýza, což je nejjednodušší metoda, protože analyzuje data s použitím pouze jediného markeru. Má však jednu nevýhodu. Snadno může dojít k omylu při klasifikaci.

Druhou strategií je intervalová analýza. Sada markerů je analyzována najednou s ohledem na jejich efekt na kvantitativní znaky. Výhodou je možnost kompenzovat rekombinaci mezi markery a QTL a zvýšit tak pravděpodobnost statistické detekce QTL.

Další strategií je využití distribučních extrémů. Je to časově méně náročná a levnější metoda. U každého jedince v populaci je změřen kvantitativní znak a markerová analýza je pak provedena jen u těch jedinců, kteří spadají do jedné ze dvou skupin extrémů distribuce. Jestliže se frekvence alel u kteréhokoli molekulárního markeru signifikantně liší mezi dvěma extrémními subpopulacemi, znamená to, že QTL kontrolující hodnotu sledované vlastnosti je lokalizován v blízkosti markeru (TANKSLEY, 1993).

2.5.1.4. PROBLÉMY PŘI MAPOVÁNÍ QTL

Při analýze polygenních znaků je naší hlavní snahou zjistit počet genů podílejících se na kontrole znaku. Zde je největším problémem to, že některé mohou mít tak malý efekt, že se dostanou pod prahovou hodnotu citlivosti detekce. Tato prahová hodnota závisí na velikosti segregující populace, dědivosti znaku a také na vzdálenosti jednotlivých polygenů – ty, které se nacházejí do vzdálenosti 20 cM od sebe, se často projevují jako jeden QTL.

Jedním z největších problémů mapování QTL je různorodost znaků. V náhodně se křížící populaci totiž nemusí mít jedinci se stejným fenotypem nutně stejný genotyp.

Fenotyp je výsledkem působení genů, které daný znak ovlivňují, a různé kombinace alel tedy mohou vyústit ve stejný fenotyp.

Navíc fenotyp jedince není řízen pouze jeho genotypem, ale také interakcí mezi genotypem a prostředím. Z toho vyplývá, že QTL, které se uplatňují v jenom prostředí, se v jiném nemusí vůbec projevit (TANKSLEY, 1993).

2.5.2. MODELOVÉ SYSTÉMY PRO GENETICKOU ANALÝZU

Genetické analýzy lidských onemocnění lze provádět na lidských populacích nebo na modelových systémech. Lidské genetické studie však nelze v mnoha případech použít.

K největším problémům lidských genetických studií patří: genetická heterogenita lidské populace, genové interakce, vliv pohlaví, věku a kondice jedince a velká komplexita vlivů prostředí. Výše uvedená omezení lidských studií jsou tím výraznější, čím větší je předpokládaný počet zapojených genů. Velmi diskutovaná je také etická stránka výzkumů na lidech.

Mnoho z výše uvedených problémů může být snadno překonáno použitím vhodného zvířecího modelu. V tomto případě byla zvolena myš, která má jako experimentální model četné výhody. Z nich je velice důležitá dostupnost geneticky stejnorodých myších kmenů. Myši mohou být experimentálně inbredně kříženy, díky čemuž je možno získat velké skupiny F_2 nebo zpětných hybridů, nezbytných pro genetické mapování. Rovněž je možná experimentální kontrola prostředí, čímž se omezí jeho vliv na variabilitu fenotypu. Nezanedbatelná je také poměrně velká reprodukční rychlost myší.

Srovnáním myší a lidské genetické mapy je možno identifikovat homologní geny. Genomy člověka a myši je možno rozdělit na přibližně 150 konzervovaných segmentů, které mají prakticky identické pořadí genů. Proto je možno podle polohy detekovaného genu u myši určit jeho polohu v genomu člověka (DEBRY a SELDIN, 1996).

Pro nejrůznější typy genetických analýz bylo vyvinuto několik variant modelových systémů, založených na různých způsobech křížení myší.

2.5.2.1. SYSTÉMY ODVOZENÉ OD DVOU RODIČOVSKÝCH KMENŮ

2.5.2.1.1. REKOMBINANTNÍ INBREDNÍ KMENY (RIS)

Rekombinantní inbrední (RI) kmeny jsou získávány křížením oddělených párů F_2 hybridů, které pocházejí z křížení dvou různých kmenů (BAILEY, 1971). Každý RI kmen je homozygotní ve všech lokusech, ale obsahuje unikátní kombinaci 50% genů od jednoho rodičovského kmene a 50% od druhého rodičovského kmene. Tyto kombinace u skupiny RI kmenů vytvářejí tzv. „strain-distribution pattern“ (SDP, vzor kmenové distribuce). Srovnáváním SDP jednotlivých markerů a fenotypů kmenů můžeme zjistit shodu s analyzovaným znakem. Jestliže je tato shoda velmi dokonalá, můžeme hovořit o vazbě mezi markerem a QTL pro testovaný znak.

RI kmeny jsou dobrým nástrojem pro identifikaci chromozomální pozice znaků ovládaných jediným genem. Pro analýzu QTL by bylo nutno použít sadu několikati set RI kmenů (DEMANT, 2003).

2.5.2.1.2. REKOMBINANTNÍ KONGENNÍ KMENY (RCS)

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

RC série většinou obsahuje okolo 20 kmenů, které jsou homozygotní a obsahují různou náhodnou malou část genomu dárcovského kmene (12,5%) na genetickém pozadí základního kmene (DEMANT a HART, 1986).

Na rozdíl od RI kmenů nemůže být mapování za použití RC kmenů založeno na SDP, neboť jednu alelu genu neobsahuje polovina kmenů, ale jen zhruba jedna devítina, takže vazba nemůže být statisticky signifikantní. Proto je nutné křížení s kmenem, který tvoří pozadí, nebo s jiným RC kmenem, a dále genotypizace a vazebná analýza (DEMANT, 2003).

2.5.2.1.3. KMENY S CHROMOZOMÁLNÍ SUBSTITUCÍ

Ze dvou inbredních rodičovských kmenů je odvozena sada homozygotních kmenů. Každý kmen ze sady nese jeden chromozom z jednoho kmene a všechny ostatní chromozomy z kmene druhého. Kmeny vznikají výběrovým opakovaným zpětným

křížením myši tak, že potomci nesou jeden nerekombinovaný chromozom dárcovského rodiče na pozadí druhého rodičovského kmene.

Tento systém umožňuje rychlé určení umístění daného QTL na konkrétní chromozom (NADEAU *et al.*, 2000).

2.5.2.1.4. „GENOME-TAGGED“ MYŠI (GTM)

Tato metoda je zdokonalením chromozomální substituce. Na rozdíl od výše uvedených kmenů s chromozomální substitucí neobsahují GTM jeden celý chromozom, ale pouze jeho část – průměrně okolo 23 cM velkou.

Lze je vytvořit stejným postupem jako kmene s chromozomální substitucí, jen jsou místo myši s celým chromozomem vybírány myši, které mají pouze daný fragment chromozomu. To znamená, že každý chromozom je obsažen v několika kmenech, které obsahují různé, navzájem se doplňující fragmenty. Skupina 60 GTM kmenů pokrývá většinu genomu.

Použití GTM kmenů umožňuje přesnější výsledek genetické analýzy než použití kmenů s chromozomální substitucí (IAKOUBOVA *et al.*, 2001).

2.5.2.1.5. „ADVANCED INTERCROSS LINES“ (AILs)

Tento systém má za cíl umožnit současnou detekci a mapování QTL na krátkém chromozomálním segmentu. AILs představují pokročilé křížení ($F_5 - F_8$ generaci) dvou inbredních kmenů. Zvířata jsou vybírána k dalšímu křížení tak, aby byla udržena maximální heterozygotnost genomu. Díky hromadění rekombinací během opakovaných křížení dochází k většímu zkrácení chromozomálních segmentů než u standardních F_2 křížení. Z toho vyplývá, že detekce vazby k nějakému QTL v AILs často také zahrnuje zamapování tohoto QTL do velice krátkého úseku na chromozomu. Na druhou stranu fragmentace rodičovského genomu do krátkých úseků znesnadňuje detekci vazby, neboť je nutno otestovat velké množství markerů (DARVASI a SOLLER, 1995).

2.5.2.2. SYSTÉMY ODVOZENÉ Z VÍCE RODIČOVSKÝCH KMENŮ (HETEROGENNÍ KŘÍŽENÍ)

Systém heterogenních křížení používá myši, které obsahují přeskupený genom z několika inbredních kmenů. Skupina takových myši nemusí obsahovat nutně jen dvě různé alely jednoho kmene, jako je tomu v případě myši vzniklých křížením jen dvou

rodičovských kmenů, ale i alel několik. Stejně tak může být použit některý z existujících outbredních kmenů.

Použití takových myší má dvě výhody. První je, že maximalizuje počet alelických rozdílů v jednom křížení a tedy i počet potenciálně detekovatelných QTL. A druhá výhoda je, že tento systém umožňuje rychlejší zamapování detekovaného QTL do kratšího intervalu, neboť chromozomy těchto myší jsou mozaikou krátkých segmentů odvozených od rozdílných kmenů.

Existují zde však i jisté nevýhody. Předně velmi vysoký počet myší nutných ke získání přesných výsledků. Dále vysoký počet segregujících QTL, který vede ke větší genetické variabilitě než u křížení dvou kmenů a který zmenšuje sílu detekce QTL. Navíc přítomnost dvou nebo více QTL blízko u sebe ($\pm 5-15$ cM) může znesnadnit až znemožnit jejich detekci. Interpretaci výsledků také stěžuje velké množství interakcí mezi nejrůznějšími lokusy. Pokud interagují více než dva lokusy, vzniká systém příliš složitý pro dostačující signifikanci (DEMANT, 2003).

2.5.3. GENETICKÁ ANALÝZA REZISTENCE K *L. MAJOR*

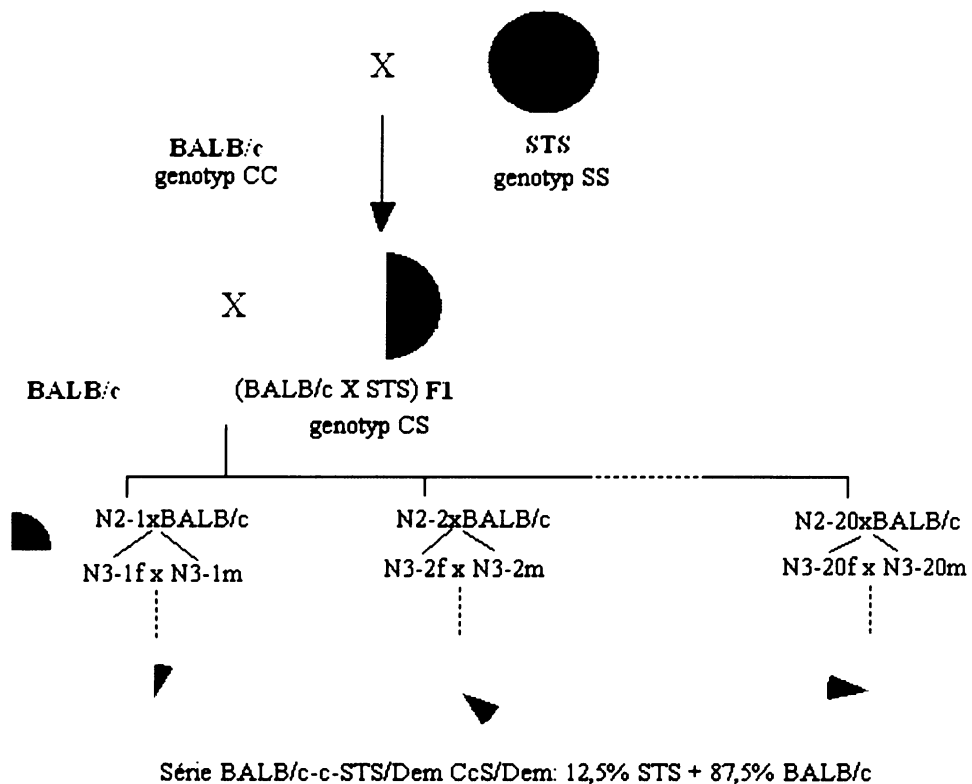
Genetické predispozice hrají významnou roli v určení výsledku infekce *L. major*. Úspěch parazita ovlivňuje mnoho genů, ať již skrze vrozenou či získanou imunitní odpověď.

2.5.3.1. REKOMBINANTNÍ KONGENNÍ KMENY

Jak již bylo popsáno výše, myší rekombinantní kongenní kmeny (RC kmeny, RCS) jsou jedním z genetických modelů, které umožňují vazebnou analýzu znaků kontrolovaných mnoha geny. Tento systém RC kmenů byl vyvinut v laboratoři P. Demanta (DEMANT a HART, 1986) za účelem usnadnění studia citlivosti k nádorovému onemocnění u myší. Lze jej ale také s výhodou využít pro studium jakýchkoli dalších znaků, které jsou polygenně kontrolovány.

Pro studium myší leishmaniózy používáme sérii BALB/c-c-STS/Dem (série CcS/Dem), která se skládá z dvaceti homozygotních inbredních kmenů (viz. Obr. 6). Ty vznikly křížením a dalším šlechtěním dvou rodičovských inbredních kmenů, z nichž jeden slouží jako základní kmen (BALB/cHeA, vnímavý k infekci *L. major*) a druhý jako dárcovský kmen (STS/A, odolný k infekci *L. major*). Každý RC kmen série CcS/Dem obsahuje přibližně 87,5% genů základního rodičovského kmene. Zbýlých 12,5% náhodně

umístěných genů pochází z dárcovského rodičovského kmene. Genom dárcovského kmene STS je tak rovnoměrně rozdělen mezi 20 kmenů série CcS/Dem. Tímto způsobem převádí systém RC kmenů rozdíl v mnoha genech mezi kmeny BALB/c a STS na rozdíly v několika málo genech mezi BALB/c a individuálními kmeny série CcS/Dem. Tyto rozdíly v jednom genu mohou být předmětem vazebné analýzy a dalšího funkčního zkoumání. Je také možné připravit rekombinanty v nalezené oblasti a mapovat gen v konkrétním místě na chromozómu (MOEN *et al.*, 1991).



Obr.6: Schéma přípravy rekombinantních kongenních kmenů série CcS/Dem. Dvacet párů myší generace N3 bylo kříženo systémem bratr x sestra po dobu 40 generací. Kmeny obsahují různé, částečně se překrývající sady genů pocházející z kmene STS na pozadí genů, pocházejících z kmene BALB/c (znázorněno červenými výsečemi ve žlutých kruzích označujících celkový genom kmene) (podle MOEN *et al.*, 1991).

2.5.3.2. STRATEGIE GENETICKÉ ANALÝZY REZISTENCE K INFEKCI *L. MAJOR*

Pro určení vlivu jednotlivých genů na rozvoj nemoci se využívá propojení genetických studií vnímavosti k infekci s charakterizací příznaků nemoci a dalších imunologicky významných parametrů.

Postup identifikace genů, které modifikují vnímavost k infekci *L. major* lze rozdělit do tří základních kroků:

- 1) zmapování lokusů, které obsahují hledané geny, pomocí F₂ hybridů nebo zpětných kříženců
- 2) zpřesnění a zkrácení těchto lokusů na co nejmenší míru pomocí rekombinantního mapování a s využitím mozaikové struktury myšního genomu
- 3) vytypování kandidátních genů a následné ověření, zda jsou tyto geny skutečně zahrnuty v kontrole vnímavosti k leishmanióze (pomocí sekvenční analýzy a funkčních studií).

Pro zmapování a detekci lokusů byli použiti F₂ hybridy mezi vnímavým kmenem BALB/c a vybranými kmeny série CcS/Dem (LIPOLDOVÁ *et al.*, 2002). Jiní autoři použili mnohočetné zpětné křížení mezi F₁ hybridy (BALB/c x B10.D2) a BALB/c (BEEBE *et al.*, 1997) nebo F₂ hybridy ze dvou inbredních kmenů (ROBERTS *et al.*, 1997). Kříženci byli genotypizováni pomocí mikrosatelitních markerů.

Myši byly infikovány *L. major* a poté byly sledovány a hodnoceny následující příznaky nemoci: velikost kožních lézí v průběhu infekce (po dobu osmi týdnů), hmotnost jater a sleziny (z té se později vztažením k hmotnosti myši určila relativní splenomegalie a hepatomegalie) a hladina imunoglobulinů a cytokinů (IgE, IL-4, IL-12, IFN γ) v krevním séru 8 týdnů po infekci (BADALOVÁ *et al.*, 2002; HAVELKOVÁ *et al.*, 2006; LIPOLDOVÁ *et al.*, 2000; VLADIMIROV *et al.*, 2003). Ostatní autoři se zaměřili pouze na studium genetické kontroly vývoje kožních lézí (BEEBE *et al.*, 1997, ROBERTS *et al.*, 1997, 1999).

Fenotypové parametry jsou společně s genetickými údaji statisticky zpracovány analýzou rozptylu (ANOVA) a mnohonásobným srovnávacím testem (pomocí statistického programu NCSS). Tato analýza je dostatečně robustní metodou pro detekci vazby (LIPOLDOVÁ *et al.*, 2002).

2.5.3.3. MIKROSATELITNÍ MARKERY A GENETICKÁ MAPA

Ke genetickým analýzám se s výhodou používají mikrosatelitní markery (AITMAN *et al.*, 1991). Mikrosatelity jsou krátké, tandemově uspořádané a opakující se (nejčastěji 10-50x) jednoduché sekvence (1-6 bp), které se vyskytují nahodile a v čtených kopiích v genomech všech eukaryot s výjimkou kvasinek. Uvnitř jednotlivých druhů existuje značný polymorfismus v délce určité mikrosatelitní DNA, který je označován jako „simple sequence length polymorphism“ (SSLP). Jednotlivé kmeny myši (tedy i kmeny série CcS/Dem) se vzájemně liší v délce těchto sekvencí, to znamená, že počet opakování jednoduchých motivů je rozdílný. Nejobvyklejší sekvence je $(CA)_n$, přičemž n je počet opakování (nejčastěji 15-25). Tato sekvence se v myším genomu vyskytuje asi stotisíckrát.

Právě díky polymorfismu i mezi příbuznými inbredními kmeny jsou mikrosatelity vhodnými genetickými markery pro sestavení genetické mapy myšního genomu. Ta byla publikována v roce 1996 (DIETRICH *et al.*, 1996) a v současné době obsahuje 7 377 genetických markerů na všech 20-ti myších chromozomech (<http://www.informatics.jax.org>). Průměrná vzdálenost mezi dvěma markery je asi 0,2 cM (což je přibližně 400 kb).

Dalším nástrojem pro genetickou analýzu jsou jednonukleotidové polymorfismy (SNPs), které lze rovněž použít pro vyhledávání vazeb mezi konkrétním SNP a fenotypem a pro vytypování kandidátních genů (BROOKES, 1999; SCHORK *et al.*, 2000).

2.5.3.4. LOKUSY KONTROLUJÍCÍ VNÍMAVOST K *L. MAJOR*

Výše popsanou genetickou analýzou rezistence myši k infekci *L. major* bylo zatím v myším genomu identifikováno více než 20 lokusů, které ovlivňují stupeň citlivosti k infekci. Tyto lokusy se označují zkratkou *Lmr*, která vznikla z anglického označení „*Leishmania major* response“ (odpověď na *Leishmania major*). V následujícím přehledu jsou uvedeny pouze ty lokusy, jejichž vazba s daným znakem byla statisticky potvrzena P-hodnotou menší než 0,05.

Lmr1 leží na 17. myším chromozomu na pozici 24,2 cM (zde i dále se jedná o pozici markeru, u kterého byla zjištěna nejsilnější vazba se sledovaným znakem). Podílí se na kontrole vzniku a rozvoje kožních lézí (ROBERTS *et al.*, 1997).

Lmr2 leží na 9. chromozomu na pozici 29 cM a stejně jako *Lmr1* kontroluje velikost kožních lézí (ROBERTS *et al.*, 1997).

Lmr3, který leží na chromozomu 5 na pozici 42 cM, má BALB/c alelu asociovanou se splenomegalií, hepatomegalií, vyšší hladinou sérového IgE a IFN γ , spontánní proliferací lymfocytů z infikovaných myší *in vitro* a částečně i s velikostí kožních lézí (BADALOVÁ *et al.*, 2002, HAVELKOVÁ *et al.*, 2006, LIPOLDOVÁ *et al.*, 2000).

Lmr4 se nachází na chromozomu 6 na pozici 48,7 cM. Jeho BALB/c alela je asociována s většími kožními lézemi a také s hladinou IFN γ v krevním séru (LIPOLDOVÁ *et al.*, 2000).

Lmr5 leží na chromozomu 10 na pozici 63 cM. Jeho BALB/c alela je kromě velikosti lézí asociována také s vyššími hladinami IgE, IL-12 a IFN γ a se splenomegalií. Kandidátním genem v oblasti lokusu *Lmr4* by mohli být *Il12rb* (beta podjednotka receptrou pro IL-12) nebo *Igk* (komplex imunoglobulinového kappa řetězce). V oblasti *Lmr5* by se mohlo jednat o *Ifng* (interferon gamma) nebo *Stat6* (signální transduktor a aktivátor transkripce 6) (BADALOVÁ *et al.*, 2002, HAVELKOVÁ *et al.*, 2006, LIPOLDOVÁ *et al.*, 2000).

Lmr6 se nachází na chromozomu 11 na pozici 1,5 cM a ovlivňuje hladinu IL-4 v krevním séru (LIPOLDOVÁ *et al.*, 2000).

Lmr7 na chromozomu 17 na pozici 3 cM kontroluje spontánní proliferaci lymfocytů z infikovaných myší *in vitro*. Vyšší proliferace je asociována s STS alelou (LIPOLDOVÁ *et al.*, 2000).

Lmr8 se nachází na chromozomu 1 na pozici 81,6 cM. Tento lokus je asociován s hladinou IgE v séru. BALB/c alela je asociována s vyšší hladinou IgE. Tento lokus se dále podílí na kontrole proliferace lymfocytů z infikovaných myší *in vitro*. V oblasti lokusu *Lmr8* se nachází kandidátní geny *Tnfsf4* (tumor nekrotizující faktor superrodina 4) a *Tnfsf6* (FasL) (BADALOVÁ *et al.*, 2002, HAVELKOVÁ *et al.*, 2006).

Kromě *Lmr8* ovlivňují hladinu IgE v krevním séru ještě další dva lokusy: *Lmr9* na chromozomu 4 na pozici 0 cM (mimo hladiny IgE kontroluje v krevním séru i hladinu IL-6) (BADALOVÁ *et al.*, 2002, HAVELKOVÁ *et al.*, 2006) a *Lmr10* na 8. chromozomu na pozici 31 cM. Ten se podílí dále i na kontrole splenomegalie a velikosti kožních lézí. Kandidátními geny v oblasti *Lmr10* jsou *Scvr* (scavenger receptor) a *Casp3* (kaspáza 3) (BADALOVÁ *et al.*, 2002, HAVELKOVÁ *et al.*, 2006).

Lokus *Lmr11* leží na chromozomu 3 na pozici 41 cM. Ovlivňuje hladinu IL-6 a IgE v krevním séru, přičemž při kontrole hladiny IgE interaguje s *Lmr8* na chromozomu 1.

Kandidátními geny lokalizovanými v tomto lokusu jsou *Il12a* (IL-12a) a *Il6ra* (alfa podjednotka receptoru pro IL-6) (BADALOVÁ *et al.*, 2002).

Lmr12 na chromozomu 16 na pozici 32 cM rovněž ovlivňuje hladinu IgE v krevním séru. Dále kontroluje hladinu TNF α a IL-4 a spontánní proliferaci lymfocytů z infikovaných myší *in vitro* (BADALOVÁ *et al.*, 2002, HAVELKOVÁ *et al.*, 2006).

Lmr13 na chromozomu 18 na pozici 24 cM kontroluje hladinu IgE a TNF α v krevním séru a rozvoj kožních lézí. Jeho STS alela je asociována s většími kožními lézemi (BADALOVÁ *et al.*, 2002, HAVELKOVÁ *et al.*, 2006, VLADIMIROV *et al.*, 2003).

Lmr14 na chromozomu 2 na pozici 73 cM kontroluje spontánní proliferaci lymfocytů z infikovaných myší *in vitro*, hladinu IgE, IFN γ , IL-12 a TNF α v krevním séru, splenomegalii a hepatomegalii. STS alela tohoto lokusu je asociována s větší splenomegalii i hepatomegalii. Kandidátním genem v této oblasti je *Ill* komplex (IL-1 komplex) (BADALOVÁ *et al.*, 2002, HAVELKOVÁ *et al.*, 2006, VLADIMIROV *et al.*, 2003).

Lmr15 leží na chromozomu 11 na pozici 31 cM a ovlivňuje hladinu IFN γ v krevním séru a hepatomegalii. Jeho BALB/c alela je spojena s více vyjádřenou hepatomegalii. Kandidátními geny v tomto lokusu jsou *nos2* (NO syntáza 2) nebo *scya* (malý indukibilní cytokin) (HAVELKOVÁ *et al.*, 2006, VLADIMIROV *et al.*, 2003).

Dalším lokusem je *Lmr16* ležící na chromozomu 2 na pozici 99 cM. Podílí se na kontrole spontánní proliferace lymfocytů z infikovaných myší *in vitro* (HAVELKOVÁ *et al.*, 2006).

Lmr17 se nachází na 9. chromozomu na pozici 17 cM. Ovlivňuje hladinu IFN γ a TNF α v krevním séru (HAVELKOVÁ *et al.*, 2006).

Lokusy *Lmr18* (na 16. chromozomu na pozici 60 cM) a *Lmr19* (na chromozomu 10 na pozici 45 cM) kontrolují spontánní proliferaci lymfocytů z infikovaných myší *in vitro* (HAVELKOVÁ *et al.*, 2006).

Lmr30 se nachází na chromozomu X, na pozici 41,5 cM. Tento lokus kontroluje velikost lézí (ROBERTS *et al.*, 1999).

Byly identifikovány ještě další tři lokusy: *Lmrq1* (*Leishmania major* resistance QTL) na chromozomu 6 v pozici 67 cM, *Lmrq4* na chromozomu 11 (pozice 2,4 cM) v blízkém sousedství *Lmr6* a *Lmrq5* na chromozomu 15 (pozice 18,9 cM). Tyto tři lokusy kontrolují velikost lézí (BEEBE *et al.*, 1997).

3. MATERIÁL A METODY

3.1. POKUSNÁ ZVÍŘATA

3.1.1. LABORATORNÍ MYŠ

Jako modelový organizmus byla použita laboratorní myš (*Mus musculus*). V této studii jsem použila myši kmeny BALB/cHeA (dále jen BALB/c), STS/A (dále jen STS) a rekombinantní kongenní kmen CcS-9/Dem (dále jen CcS-9). Dále jsem použila F₂ hybridy vzniklé křížením kmenů BALB/c a CcS-9, které byly vyprodukovány v Ústavu molekulární genetiky. Myši byly chovány v bariérovém chovu ve Státním zdravotním ústavu na Vinohradech.

3.1.2. *Leishmania major*

Pro infekci myši byla použita *Leishmania major*, kmen LV 561 (MHOM/IL/67/LRC-L137 JERICHO II). Leishmánie byly pěstovány v lézích na zádech samic kmene BALB/c. Amastigoti byli transformováni v infekční promastigoty použitím SNB-9 media (DIAMOND, 1954).

3.1.3. SCHÉMA POKUSU

Každé myši (kromě negativních kontrol) bylo do zadní části zad nad ocas injikováno 10⁷ promastigotů v 50 µl sterilního fyziologického roztoku. Negativním kontrolám bylo injikováno pouze 50 µl sterilního fyziologického roztoku. Myši byly v době inokulace staré 7 – 25 týdnů (u pozitivních i negativních kontrol základních kmenů) – průměrně 14 týdnů, respektive 11 – 21 týdnů (v případě F₂ hybridů) – průměrně 15 týdnů. Na začátku pokusu a na jeho konci (po 8 týdnech) byly myši zváženy.

Každý týden po inokulaci byly měřeny velikosti lézí všech myši. Osm týdnů po inokulaci parazitů byly myši usmrceny a byly jim odebrány tkáně pro zhodnocení rozsahu infekce. Myším byla odebrána játra, slezina, inguinální a iliakální uzliny, léze, uzliny z lézí, plíce, ledviny, ocas a krev. Z krve bylo získáno krevní sérum.

Kultivační metodou bylo stanoveno množství parazitů ve slezině a inguinálních uzlinách. Játra a slezina byla zvážena a byl stanoven rozsah hepatomegalie a splenomegalie (relativní váha jater, případně sleziny, tj. váha orgánu vztažená k váze myši na konci pokusu). Z orgánů byly rovněž připraveny histologické preparáty. Ze sleziny byly použity buňky pro stanovení spontánní proliferace lymfocytů *in vitro*.

Z ocasu byla izolována DNA pro následnou genotypizaci F₂ hybridů. V krevním séru byla stanovena koncentrace IgE, IFN γ , IL-4, IL-10, IL-12 a IL-13. Krevní sérum, ocásky a části některých orgánů byly až do zpracování uchovávány při teplotě -80°C.

Na celém pokusu se podíleli všichni členové naší laboratoře. Mým podílem na tomto projektu byla izolace DNA z myších ocásků, genotypizace F₂ hybridů, stanovení koncentrace cytokinů a IgE v krevním séru a počítání vazeb mezi jednotlivými genotypovými markery a fenotypovými projevy infekce.

3.2. IZOLACE DNA Z MYŠÍCH OCÁSKŮ

Izolace byla provedena podle LAIRD *et al.* (1991).

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

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

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

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

5 mM EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)

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

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

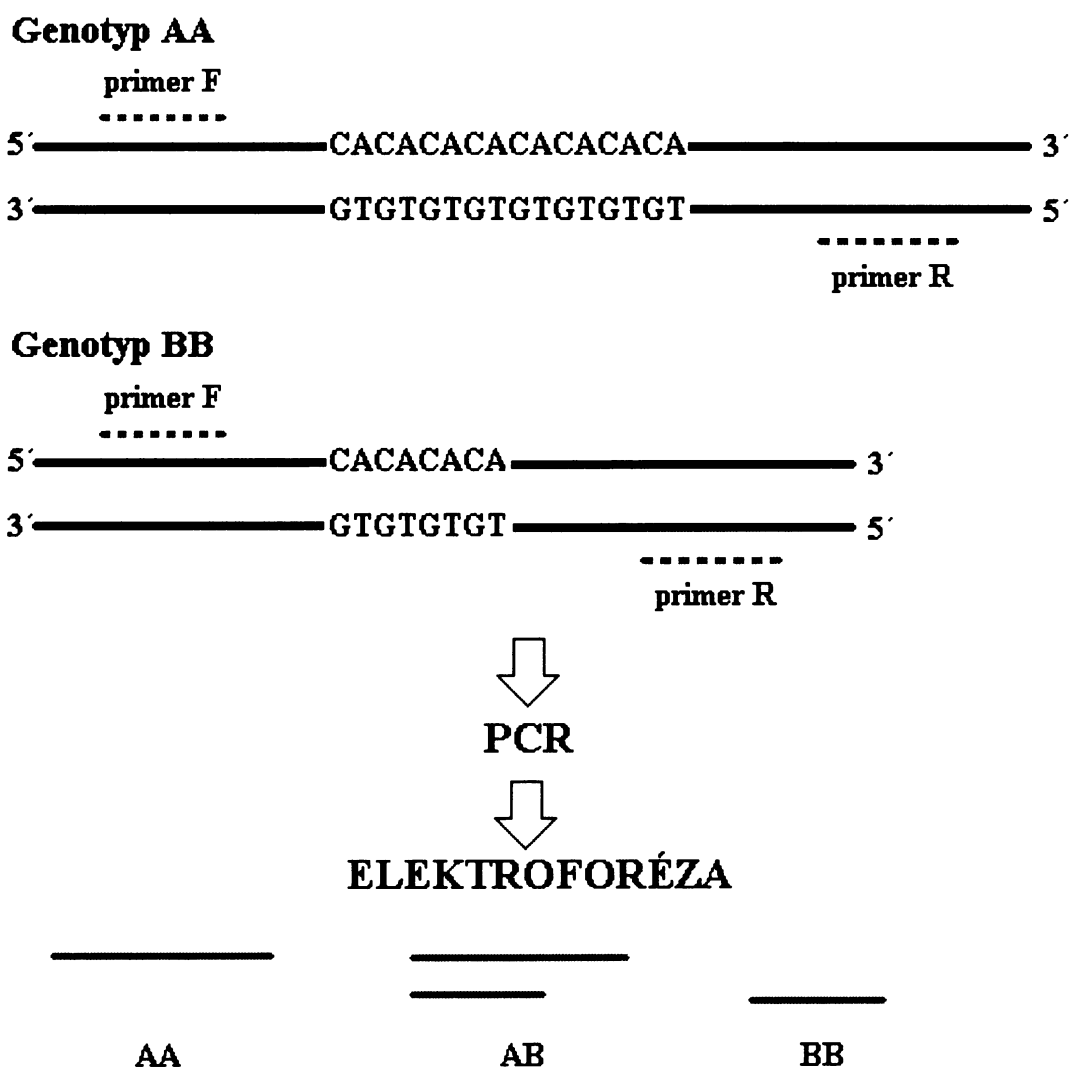
Následující den zlyzovanou směs centrifugujeme 1 hodinu při 4°C a 4000 otáčkách za minutu (centrifuga Centrifuge 5810 R, Eppendorf, SRN). Supernatant přelijeme do nové mikrozkušavky, ve které je 750 μ l izopropanolu. Vysráženou DNA přeneseme sterilní jednorázovou mikrobiologickou kličkou do nové mikrozkušavky a rozpustíme v 500 μ l TE pufru.

Pro použití při PCR roztok DNA ředíme na přibližnou koncentraci 4 ng/ml tak, že pipetujeme 12,5 μ l koncentrovaného roztoku DNA do 500 μ l sterilní TK H₂O (voda pro tkáňové kultury). Vzorky DNA uchováváme při 4°C.

3.3. GENOTYPIZACE

3.3.1. PRINCIP GENETICKÉ TYPIZACE MYŠÍCH ALEL

Mezi jednotlivými myšimi kmeny existuje velká variabilita v počtu a velikosti repetitivních sekvencí, převážně v nekódujících oblastech. Toho lze s výhodou využít při genetické typizaci myši. Variabilitu můžeme detekovat pomocí mikrosatelitních markerů podle schématu na obr. 7 (DIETRICH et al., 1992).



Obr. 7: Schéma principu genotypizace myších alel. Primer F – levý primer, primer R – pravý primer.

3.3.2. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR) POMOCÍ NEZNAČENÝCH PRIMERŮ

PCR, při které nepoužíváme radioaktivně značené primery, lze využít v případě, kdy je rozdíl mezi výslednými produkty větší než 8 nukleotidů.

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

250 mM KCl (Lachema, Brno, Česká republika)

7,5 mM MgCl₂ (Invitrogen, Brazílie)

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

PCR mix připravíme tak, že do mikrozkušavky postupně pipetujeme tyto chemikálie: 6,7 μM primer F (levý primer) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)

6,7 μM primer R (pravý primer) (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR)

5x PCR pufr

5 U/μl Taq polymeráza (Invitrogen, Brazílie)

TK H₂O.

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

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

V případě potřeby (u některých primerů) můžeme upravit teplotu hybridizace v rozmezí 50-60°C a koncentraci MgCl₂ v rozmezí 1,5 – 3 mM.

3.3.3. ELEKTROFORÉZA NA AGARÓZOVÉM GELU

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

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

90 mM H₃BO₃ (Serva, Heidelberg, SRN)

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

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

Ke vzorkům přidáme po 5 µl nanášecího pufru (1% orange G, 50% glycerol, obojí Lachema, ČR). Gel uložíme do horizontální aparatury pro elektroforézu, zalijeme 0,5x koncentrovaným TBE puftrem tak, aby byl gel v pufru zcela ponořen, a přidáme 75 µl 1% roztoku EtBr. Do jamek v gelu pipetujeme přibližně 15 µl vzorku, do krajních jamek pipetujeme 3 µl standardu 50 bp (DNA Ladder, New England BioLabs, USA, koncentrace 80 µg/ml). Aparaturu připojíme ke zdroji stejnosměrného napětí Electrophoresis Power Supply 250Ex (GibcoBrl, Gaithersburg, USA). Elektroforéza probíhá při konstantním napětí 150 V, doba trvání je úměrná velikosti děleného produktu, nejčastěji mezi 30 – 60 minutami. Výsledek elektroforézy zdokumentujeme pod UV světlem vyfocení kamerou GeneGenius (Syngene, Cambridge, Velká Británie).

3.3.4. PCR S RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝMI PRIMERY

PCR s radioaktivně značenými primery probíhá velice podobně jako PCR s nezačenými primery, pouze s tím rozdílem, že levý primer je označen izotopem fosforu ³²P. Elektroforéza pak probíhá na polyakrylamidovém gelu, který má pro rozdělení jednotlivých vzorků delší dráhu než gel agarózový, takže je tento typ PCR vhodný i tehdy, je-li rozdíl mezi výslednými produkty i jen 2 – 6 bp.

10xKB: 500 mM Tris-HCl (Serva, Heidelberg, SRN)

100 mM MgCl₂ (Invitrogen, Brazílie)

50 mM DTT (dithiotreitol; Sigma, St. Louis, Missouri, USA)

1 mM spermidine (Sigma, St. Louis, Missouri, USA)

1 mM EDTA (Serva, Heidelberg, SRN)

Nejprve si radioaktivně naznačíme primer F. Postupně do sterilní mikrozkušavky pipetujeme 6,7 µM primer F (Generi Biotech, Hradec Králové, ČR), 10xKB (kinázový

pufr), sterilní TK H₂O, PNK (T4 polynukleotidkináza; Boehringer, Mannheim, SRN) a radioaktivní izotop ([γ -³²P]ATP; Amersham Biosciences, Velká Británie). Směs v mikrozkuhavce necháme inkubovat 30 minut při 37°C. Dále pokračujeme shodně s postupem pro PCR s neznačenými markery. Do jamek destičky pipetujeme vždy 5 μ l vzorku a 5 μ l PCR mixu. Vzorky chráníme před vypařením během vlastní PCR převrstvením 50 μ l minerálního oleje (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). PCR probíhá v termocykleru PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Waltham, USA). V případě radioaktivně značených markerů stačí pouze 30 cyklů reakce.

3.3.5. ELEKTROFORÉZA NA POLYAKRYLAMIDOVÉM (PAA) GELU

6% akrylamid: 150 ml 40% roztoku AA:BAA (19:1) (SERVA, Heidelberg, SRN)

100 ml 10x TBE

480 g močoviny (SERVA, Heidelberg, SRN)

doplnit do 1 l destilovanou H₂O a přefiltrovat přes filtrační papír

Nanášecí pufr: 99.5% formamid (SIGMA, St. Louis, Missouri, USA)

10 mM EDTA (SERVA, Heidelberg, SRN)

0.025% xyleneová cyanol (SERVA, Heidelberg, SRN)

0.025% bromfenolová modř (SERVA, Heidelberg, SRN)

K 50 ml 6% akrylamidu přidáme 300 μ l 10% roztoku APS (persíran amonný; SIGMA, St. Louis, Missouri, USA) a 30 μ l TEMED (FLUKA, Švýcarsko). Promíchaný roztok nalijeme mezi elektroforetická skla a umístíme hřeben tak, aby jeho tupá strana vytvořila start. Ponecháme v klidu přibližně 60 min zpolymerovat. Opatrně odstraníme hřeben, skla upevníme do aparatury pro vertikální elektroforézu a převrstvíme 1x TBE pufrém. Ze startu odstraníme vzduchové bubliny a volné kousky gelu. Do horního okraje gelu pak vsuneme hřeben tak, aby jeho hroty byly v gelu lehce zanořeny. Tímto způsobem se od sebe oddělí prostory pro nanesení jednotlivých vzorků.

Ke vzorkům z PCR napipetujeme po 25 μ l nanášecího pufru. Denaturujeme je 3 min při 99 °C a následně ochladíme na 4°C. Pomocí mikropipety Hamilton nanese na gel vždy přibližně 8 μ l denaturovaného vzorku. Dělení vzorků probíhá při konstantním napětí 50 W v závislosti na molekulové hmotnosti v časovém rozmezí 1.5-3.5 hod (zdroj elektrického proudu: Power PAC 3000, Biorad, Vídeň, Rakousko).

3.3.6. AUTORADIOGRAFIE

Po ukončení elektroforetického dělení gel zabalíme do fólie (Saran, Dow Chemicals Co., Midland, Michigan, USA) a spolu s filmem FOMA XBU 35x43 cm (FOMA Bohemia s.r.o., Hradec Králové, ČR) vložíme do expoziční kazety. Expozice probíhá v závislosti na radioaktivitě vzorků jeden až několik dní při -80°C . Naexponovaný film vyvoláme na vyvolávacím přístroji Kodak.

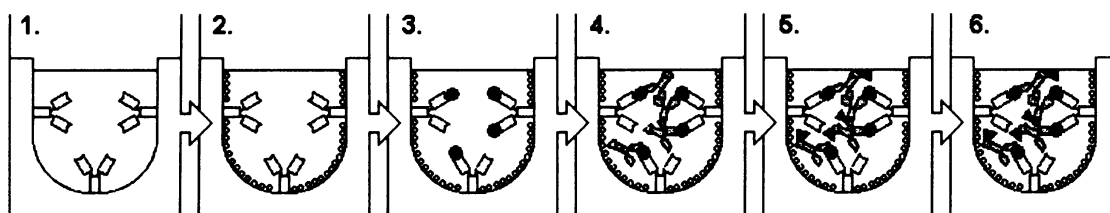
3.4. ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

3.4.1. PRINCIP METODY

Metoda ELISA se používá pro stanovení koncentrace nějaké látky ve vzorku pomocí specifických protilátek. Látka, u které koncentraci zjišťujeme, musí mít charakter antigenu. V našem případě se konkrétně jedná o cytokiny a IgE v myším krevním séru.

Sendvičová ELISA, používaná v naší laboratoři, probíhá podle následujícího schématu (viz také Obr. 8):

- 1) navázání primární protilátky na polypropylenový sorbent (stěnu jamky destičky)
- 2) zablokování zbývajících vazebných míst na sorbentu pomocí FCS (fetální bovinní sérum) nebo BSA (bovinní serumalbumin)
- 3) na primární protilátku se naváže antigen obsažený ve vzorku
- 4) na navázaný antigen se naváže biotinylovaná sekundární protilátka
- 5) na biotin se naváže avidin-peroxidáza
- 6) do jamky se přidá substrát pro peroxidázu. Proběhne enzymatická reakce, jejímž výsledkem je barevný produkt



Obr. 8: Schéma metody sendvičová ELISA.

Platí zde přímá úměra – čím více bylo ve vzorku antigenu, tím více barevného produktu vznikne. Intenzitu zbarvení produktu měříme spektrofotometricky. K převodu optické denzity na koncentraci nám slouží kalibrační křivka sestavená na základě známé koncentrace standardů.

3.4.2. STANOVENÍ KONCENTRACE IgE, IL-4, IL-10, IL-12 a IFN γ V MYŠÍM SÉRU

PBS pufr: 0,1 M NaCl

8mM Na₂HPO₄

1mM KH₂PO₄

2,6 mM KCl

ABTS roztok: 500 ml 0,1 M kyseliny citronové (SIGMA, St. Louis, Missouri, USA)

150 mg ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylthiazoline)-6-sulfonic acid;

SIGMA, St. Louis, Missouri, USA)

Připravíme si a označíme 96-ti jamkovou polypropylenovou destičku (Costar 3590, Costar, USA). Naředíme si primární protilátku (Pharmlingen, USA) na výslednou koncentraci 1 μ g/ml ve sterilním PBS (fosfátový pufr, phosphate buffer solution). Do každé jamky napipetujeme 50 μ l naředěné primární protilátky a destičky necháme inkubovat přes noc při 4°C.

Následující den odstraníme z destičky roztok primární protilátky a jamky třikrát promyjeme promývacím roztokem (0,005% Tween-20 v PBS). Do každé jamky napipetujeme 100 μ l blokovacího roztoku, což je 8% FCS (fetální hovězí sérum; Biosera, Ringmer, Velká Británie) v PBS. Destičku necháme inkubovat dvě hodiny při laboratorní teplotě. Poté z jamek blokovací pufr odstraníme a jamky čtyřikrát promyjeme promývacím roztokem.

Připravíme si standardy. Naředěním zásobních roztoků standardů cytokinů nebo IgE vytvoříme vždy řadu pěti standardů řaděných pětikovou řadou tak, že koncentrace nejkoncentrovanějšího roztoku je pro: IgE - 1,25 μ g/ml; IL-4 – 10 ng/ml; IL-10 – 10 ng/ml; IFN γ - 20 ng/ml a IL-12 – 100 ng/ml. Standardy se ředí 2% FCS v PBS. Jako negativní kontrola slouží 2% FCS v PBS.

Naředíme si i vzorky – myší sérum. Pro stanovení koncentrace IgE ředíme vzorky 100x, pro stanovení koncentrace IL-4 a IFN γ 10x a pro stanovení koncentrace IL-10 a IL-12 5x. Vzorky ředíme 2% FCS v PBS.

Negativní kontroly, standardy i vzorky pipetujeme vždy v párech, po 100 μ l do jamky. Destičku necháme inkubovat přes noc při 4°C.

Další den odstraníme z jamek vzorky i standardy a jamky čtyřikrát promyjeme promývacím roztokem. Naředíme si sekundární protilátku označenou biotinem (Pharmingen, USA) na výslednou koncentraci 1 μ g/ml ve 2% FCS v PBS. Do každé jamky napipetujeme 50 μ l naředěné sekundární protilátky a destičku necháme inkubovat 45 minut při laboratorní teplotě. Sekundární protilátku z jamek odstraníme a jamky pětikrát promyjeme promývacím roztokem. Naředíme si avidin-peroxidázu na výslednou koncentraci 1 mg/ml ve 2% FCS v PBS. Do každé jamky napipetujeme 50 μ l naředěné avidin-peroxidázy a destičku necháme inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě. Roztok avidin-peroxidázy pak z jamek odstraníme a jamky osmkrát promyjeme promývacím roztokem. Připravíme si substrát pro barevnou reakci: na jednu destičku použijeme 11 ml ABTS substrátu, do kterého přidáme 13 μ l 30% H_2O_2 , a protřepeme. Do každé jamky napipetujeme 100 μ l substrátu a destičku uložíme do tmy. Po proběhnutí reakce změříme optickou denzitu obsahů jednotlivých jamek na spektrofotometru SUNRISE (Tecan, Rakousko) při vlnové délce 405 nm a s referenčním filtrem 620 nm. Výsledky vyhodnotíme pomocí software KIM-E. Výslednou koncentraci jednotlivých cytokinů v krevním séru jsem uváděla v jednotkách: IgE v μ g/ml, $IFN\gamma$, IL-4, IL-10 a IL-12 v ng/ml.

3.4.3. STANOVENÍ KONCENTRACE IL-13 V MYŠÍM SÉRU

Postup je podobný jako u ostatních cytokinů, ale je zde pár odlišností podle doporučení výrobce protilátky.

Použijeme stejné polypropylenové destičky jako u ostatních cytokinů. Nejprve si naředíme primární protilátku (PeproTech EC, Londýn, Velká Británie) na výslednou koncentraci 1 μ g/ml ve sterilním PBS. Do každé jamky napipetujeme 100 μ l naředěné primární protilátky. Destičku necháme inkubovat přes noc při laboratorní teplotě.

Druhý den odstraníme naředěnou primární protilátku a jamky čtyřikrát promyjeme promývacím roztokem (0,05% Tween v PBS). Do každé jamky pak napipetujeme 300 μ l blokovacího pufru (1% BSA – bovinní serumalbumin, SIGMA, St. Louis, Missouri, USA; ve sterilním PBS). Destičku necháme inkubovat nejméně hodinu při pokojové teplotě. Odstraníme blokovací pufr a jamky čtyřikrát promyjeme promývacím roztokem.

Připravíme si standardy (PeproTech EC, Londýn, Velká Británie): nejkonzentrovanejší standard má koncentraci 2 ng/ml, další standardy ředíme vždy třikrát. Standardy ředíme ve 0,05% Tween-20, 0,1 % BSA ve sterilním PBS. Jako negativní kontrolu používáme 0,05% Tween-20, 0,1% BSA ve sterilním PBS. Vzorky myšního séra neředíme. Do jamek pipetujeme vzorky, standardy i negativní kontroly vždy v párech, po 100 µl na jamku. Destičku necháme inkubovat při laboratorní teplotě nejméně dvě hodiny.

Z destičky odstraníme standardy i vzorky a jamky čtyřikrát promyjeme. Naředíme si biotinylovanou sekundární protilátku (PeproTech EC, Londýn, Velká Británie) v 0,05% Tween-20, 0,1% BSA v PBS na výslednou koncentraci 0,25 µg/ml. Do každé jamky napipetujeme 100 µl naředěné sekundární protilátky. Destičku necháme inkubovat při laboratorní teplotě 2 hodiny.

Sekundární protilátku z destičky odstraníme a jamky čtyřikrát promyjeme promývacím roztokem. Naředíme si avidin-peroxidázu (PeproTech EC, Londýn, Velká Británie) tak, že dodaný roztok avidin-peroxidázy naředíme v poměru 1:2000 v 0,05% Tween-20, 0,1 % BSA v PBS. Do každé jamky napipetujeme 100 µl naředěné avidin-peroxidázy. Destičku necháme inkubovat 30 minut při laboratorní teplotě.

Dále postupujeme jako v předchozím případě. Z destičky odstraníme avidin-peroxidázu a jamky osmkrát promyjeme promývacím roztokem. Připravíme si substrát pro barevnou reakci: na jednu destičku použijeme 11 ml substrátu ABTS, do kterého přidáme 13 µl H₂O₂ a protřepeme. Do každé jamky napipetujeme 100 µl substrátu a destičku uložíme do tmy. Po proběhnutí reakce změříme optickou densitu obsahů jednotlivých jamek na spektrofotometru SUNRISE při vlnové délce 405 nm a s nastaveným filtrem na 620 nm. Výsledky vyhodnotíme pomocí software KIM-E. Výslednou koncentraci IL-13 v krevním séru jsem uváděla v pg/ml.

3.5. STATISTIKA

Role genetických faktorů v kontrole jednotlivých příznaků infekce *L. major* je testována pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) v programu NCSS (Number Cruncher Statistical System). Markery, pohlaví, věk a efekt prarodičů („grandparental effect“; pro přípravu F₂ kříženců se nejprve křížili jedinci z kmene BALB/c s jedinci z kmene CcS-9, čímž vznikli F₁ kříženci. V dalším kroku se křížili navzájem F₁ hybridi pocházející ze stejného křížení. Zjednodušeně lze tedy říci, že efekt prarodičů udává, zda

myš kmene BALB/c je babičkou nebo dědečkem konkrétního F₂ křížence) jsou fixní parametry a jednotlivé experimenty (celý pokus se skládal ze tří podpokusů) jsou definovány jako náhodný parametr.

Metoda ANOVA vyžaduje normální distribuci hodnot, proto je nutné některé soubory hodnot předem transformovat. Normalita souborů hodnot je testována Martinezovým-Igiewitzovým a Kolmogorovovým-Smirnovovým testem normality dat v programu NCSS.

Průběh rozvoje kožních lézí v čase se hodnotí na základě týdenního měření velikosti lézí u každé myši v 4. – 8. týdnu po infekci. Provede se analýza kovariance (obecný lineární model – GLM ANOVA) v programu NCSS, kde je marker definován jako fixní parametr a týden pozorování jako kovarianční parametr.

Spočítanou *P*-value (α_T) je nutno korigovat pomocí vzorce:

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

kde $G = x M$ (délka segregující části genomu v Morganech); $C = n$ (počet chromozomů segregujících v tomto křížení); $\rho = 1,5$ pro F₂ hybridy; $h(T) = F$ ratio. Touto korekcí je dosaženo hodnoty signifikantní pro celý genom (LANDER a KRUGLYAK, 1995, LANDER a SCHORK, 1994).

4. VÝSLEDKY

4.1. GENOTYPIZACE F₂ HYBRIDŮ MEZI KMENY BALB/c A CcS-9

Myší rekombinantní kongenní kmen CcS-9 obsahuje 12,5% genomu STS na pozadí genomu BALB/c. Různě velké úseky původu STS se nacházejí na chromozomech 2, 4, 5, 6, 9, 11, 16 a 17. Mým prvním úkolem bylo otestovat F₂ hybridy mezi kmeny BALB/c a CcS-9, které byly použity v pokusu. Bylo nutné zjistit, kolik a kde má každý F₂ hybrid úseků pocházejících z kmene STS.

Podle databáze rekombinantních kongenních kmenů série CcS/Dem bylo vybráno 18 markerů (viz. Tab.1.).

Tab.1: Markery, vybrané pro genotypizaci F₂ hybridů.

marker	chromozom	pozice(cM)
D2Mit283	2	83.50
D2Mit148	2	105.00
D4Mit172	4	8.60
D4Mit23	4	14.30
D4Mit53	4	19.80
D4Mit7	4	35.50
D5Mit24	5	60.00
D5Mit143	5	86.00
D6Mit122	6	29.00
D6Mit274	6	20.50
D9Mit15	9	61.00
D11Mit141	11	27.00
D11Mit242	11	31.00
D11Nds18	11	40.00
D11Nds10	11	?
D16Mit19	16	54.00
D17Mit120	17	42.00
D17Mit122	17	51.90

Markery, u kterých byl rozdíl mezi velikostí alel STS a BALB větší než 8 bp, jsem testovala pomocí PCR s radioaktivně neoznačenými primery. Elektroforetický rozdělující PCR produkty jsem vizualizovala barvením etidiumbromidem a zdokumentovala vyfocením pod UV světlem.

Markery, u kterých byl rozdíl mezi velikostí alel STS a BALB menší než 8 bp, jsem testovala pomocí PCR s primery značenými izotopem fosforu [γ -³²P] a výsledek polyakrylamidové elektroforézy jsem vizualizovala autoradiografií.

Někdy reakční podmínky uvedené v kapitole Materiál a metody nevyhovovaly a nevznikl žádný produkt. V těchto případech jsem musela pro dané primery stanovit

optimální podmínky pomocí gradientové PCR. Kritickými parametry PCR jsou hlavně teplota hybridizace daného úseku DNA a koncentrace chloridu hořečnatého. Jeho kationty formují komplexy s dNTP a fungují pak jako kofaktor pro polymerázu. Pokud tedy nevznikl při standardním postupu PCR produkt, měnila jsem nastavení teploty pro optimální hybridizaci v rozmezí 51°C-60°C a koncentraci chloridu hořečnatého od 1,5 do 3,0 mM. Úprava podmínek se týkala markeru D2Mit148 (koncentrace chloridu hořečnatého 3,0 mM) a D9Mit15 (koncentrace chloridu hořečnatého 3,0 mM a teplota při hybridizaci 51°C).

Velikost PCR produktů vzorků DNA z F₂ kříženců jsem srovnávala s kontrolami BALB/c a STS. Výsledkem genotypizace F₂ kříženců je informace, ve kterém markeru má konkrétní kříženec homozygotní genotyp BALB/c či STS, případně zda-li je v markeru heterozygotní. Výsledky genotypizace jsou zobrazeny v tabulce 2.

Tab.2: Výsledky genotypizace F₂ hybridů. 1-homozygotní pro alelu BALB, 2-heterozygotní, 3-homozygotní pro alelu STS

číslo vzorku	D2M283	D2M148	D4M172	D4M23	D4M53	D4M7	D5M24	D5M143	D6M122	D6M274	D9M15	D11M141	D11M242	D11N18	D11N10	D16M19	D17M120	D17M122
1	1	2	3	3	3	3	2	2	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2
2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1	1
3	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2	2	3	3
4	3	2	2	1	1	1	1	2	1	3	3	1	1	1	1	2	2	2
5	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	1	2
6	3	3	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2
7	3	3	1	1	1	1	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2
8	2	3	2	2	2	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	3	2	2
9	1	1	3	3	3	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
10	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	3	3	3	3	3	3	2
11	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	3	3	3
12	1	1	2	2	2	2	1	2	1	1	1	3	3	3	3	1	2	2
13	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	2	1	2
14	2	1	3	3	3	3	1	1	3	3	2	2	2	2	2	2	3	3
15	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	3	3	3	3	3	1	2	2
16	3	1	1	2	2	2	1	2	2	2	3	1	2	2	1	2	2	2
17	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	3	1	2
18	2	3	3	2	2	2	2	2	1	1	2	3	2	1	3	1	3	3
19	2	1	2	2	2	1	3	2	3	3	1	3	3	3	3	1	1	1
20	3	1	3	3	3	3	2	1	2	2	2	3	3	1	3	3	2	3
21	3	1	2	2	2	2	3	3	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
22	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	3	2	3	3	3	2	2
23	3	3	2	2	2	2	1	3	3	3	2	1	1	1	1	3	2	2
24	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	3	3	3	3	2	2	3

číslo vzorku	D2M283	D2M148	D4M172	D4M23	D4M53	D4M7	D5M24	D5M143	D6M122	D6M274	D9M15	D11M141	D11M242	D11N18	D11N10	D16M19	D17M120	D17M122
25	3	3	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
26	3	1	3	3	3	3	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
27	2	2	3	3	3	2	1	2	2	2	3	2	2	2	2	3	3	3
28	1	1	3	3	3	3	2	3	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
29	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	3	1	1	1	1	2	1	2
30	2	1	3	3	2	2	3	1	3	3	2	2	2	2	2	2	2	1
31	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	3	2	3
32	2	2	1	1	1	1	2	3	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2
33	2	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	2	2	2	2	3	2	2
34	3	3	3	2	2	2	2	3	1	2	3	2	2	2	2	2	2	2
35	3	1	3	3	3	3	2	1	2	2	2	3	3	3	3	1	1	1
36	3	1	2	1	1	2	2	2	2	2	1	3	3	3	3	2	2	2
37	3	1	2	2	2	2	3	2	1	1	3	1	2	2	1	3	2	2
38	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3	3	2	1	1
39	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	1	3	3
40	3	2	3	3	2	2	2	3	3	3	1	2	2	2	2	1	2	2
41	1	2	3	3	3	3	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1
42	2	2	3	3	3	3	1	1	3	3	3	2	2	2	2	2	1	1
43	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	3	2	2	2	2	2	2	2
44	2	2	3	2	2	2	1	2	3	3	3	2	2	2	2	3	1	1
45	2	2	2	3	3	3	1	2	2	1	3	3	3	3	3	2	3	3
46	2	1	2	3	3	3	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
47	2	1	1	1	1	1	3	3	2	2	1	2	2	3	2	2	3	3
48	1	2	2	2	2	2	3	3	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2
49	1	1	3	3	3	3	2	3	2	2	2	3	3	3	3	1	2	2
50	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	3	1	2	1	1
51	2	3	3	3	3	3	2	3	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2
52	2	3	3	3	3	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2
53	1	1	2	3	3	3	2	1	3	3	3	1	1	1	1	3	1	1
54	3	2	2	3	3	3	3	3	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2
55	3	3	2	2	1	2	3	1	3	3	2	3	3	3	3	1	2	2
56	2	3	3	3	3	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1
57	3	3	1	1	1	1	1	1	2	2	3	2	2	2	2	1	2	2
58	1	1	2	2	2	2	3	2	2	2	3	2	2	2	2	1	3	3
591	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	3	1	1	1	1	2	2	2
592	2	2	3	3	3	3	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
601	1	1	3	3	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1
602	3	3	2	2	2	1	1	1	2	2	3	2	1	1	2	3	2	2
61	2	2	3	3	3	3	2	3	3	3	2	2	2	2	2	1	1	1
62	2	2	1	1	2	2	3	2	2	1	2	1	1	2	1	2	3	3
63	1	1	2	2	2	2	3	3	2	2	3	3	3	3	3	2	1	1
64	3	2	2	2	3	3	3	3	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1
65	2	3	2	3	3	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2
66	1	2	2	2	2	2	2	1	3	3	2	2	2	2	2	2	1	1
67	1	2	1	1	2	3	2	3	2	2	1	2	2	2	2	3	1	1
68	3	3	3	2	2	1	1	3	2	3	2	1	1	1	1	2	1	2
69	1	1	3	3	3	3	2	1	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2
70	3	2	2	1	1	1	3	3	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2

číslo vzorku	D2M283	D2M148	D4M172	D4M23	D4M53	D4M7	D5M24	D5M143	D6M122	D6M274	D9M15	D11M141	D11M242	D11N18	D11N10	D16M19	D17M120	D17M122
71	2	2	2	2	2	2	1	3	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
72	1	2	1	1	1	1	3	3	2	2	3	1	2	2	1	1	3	2
73	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	3	2	2
74	3	2	3	3	3	3	3	3	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2
75	2	3	1	1	1	1	2	3	1	1	3	2	2	2	2	2	2	2
76	1	1	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3
77	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	2	3	2	2	3	2	1	1
78	1	1	1	3	3	3	2	1	2	2	2	1	1	1	1	3	1	1
79	3	3	2	2	2	1	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
80	3	3	2	2	1	1	1	1	1	3	3	3	2	2	3	2	1	1
81	2	3	2	2	2	2	3	3	1	1	2	3	3	3	3	1	2	2
82	2	1	2	1	1	1	2	3	1	1	1	3	3	3	3	2	2	2
83	3	2	2	2	2	2	2	3	1	1	3	3	2	2	3	2	2	2
84	1	1	2	2	2	2	3	1	3	3	1	2	2	2	2	2	2	2
85	2	2	2	3	3	2	1	3	3	3	2	3	3	3	3	1	2	2
86	3	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1	3	1	1
87	3	3	2	2	2	2	1	1	3	3	2	3	3	3	3	1	1	2
88	3	2	1	1	1	1	2	1	2	3	1	2	2	2	2	2	1	1
89	2	2	1	1	1	1	1	2	1	1	2	3	3	3	3	2	2	2
90	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1
91	2	2	3	3	3	2	2	3	2	2	2	1	1	1	1	3	2	2
92	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
93	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	3	1	1
94	1	2	3	3	3	2	1	1	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2
95	2	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
96	2	3	1	1	1	2	3	3	3	3	1	3	3	3	3	2	3	3
97	3	2	2	2	1	1	3	2	1	1	2	3	2	2	3	2	2	2
98	1	2	2	2	2	2	2	1	3	3	3	1	1	1	1	2	1	1
99	2	2	3	3	3	2	1	1	1	2	2	3	2	2	2	2	2	2
100	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1	2	1	3	2	2
101	1	1	1	1	1	1	2	3	1	1	1	3	3	3	3	3	2	2
102	1	2	3	3	3	3	1	2	3	3	2	2	1	1	2	3	2	2
103	3	2	1	1	1	1	1	3	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2
105	3	2	3	3	3	2	1	1	1	1	2	2	3	3	2	2	2	2
106	3	3	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
107	3	3	2	2	2	2	1	3	2	2	3	2	2	1	2	2	1	1
108	1	2	2	2	2	1	2	2	3	2	3	2	2	2	2	2	2	3
109	3	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
110	2	3	3	3	3	3	1	2	2	2	3	2	2	2	2	1	2	2
111	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	1	2	2
112	1	1	3	3	3	2	2	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2	1
113	2	2	3	3	3	3	3	2	3	3	1	3	3	3	3	2	2	1
114	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2
115	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3
116	3	3	2	2	2	2	2	1	2	1	3	2	2	2	2	1	1	1
117	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2
118	3	1	1	1	1	1	1	2	3	3	2	3	3	3	3	1	2	1
119	3	3	2	2	2	2	3	2	3	3	3	2	2	2	2	1	2	2

číslo vzorku	D2M283	D2M148	D4M172	D4M23	D4M53	D4M7	D5M24	D5M143	D6M122	D6M274	D9M15	D11M141	D11M242	D11N18	D11N10	D16M19	D17M120	D17M122
120	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2	1	3	3	3	3	2	2	2
121	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
122	2	2	2	2	2	3	3	1	1	1	2	3	3	3	3	2	1	1
123	3	3	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2
124	2	2	1	1	1	1	2	3	2	2	3	3	3	3	3	2	3	3
125	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	3	2	1	1
126	2	1	2	2	2	1	2	1	1	1	3	3	3	3	1	2	3	3
127	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	3	3	2	3	3	3	2
128	1	2	3	3	3	3	1	3	3	2	2	1	1	1	2	2	2	3
129	3	3	1	1	1	1	3	3	3	3	1	3	3	3	3	2	2	2
130	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
131	1	1	1	1	1	1	1	3	3	3	2	3	3	3	3	3	1	1
132	2	2	1	1	1	1	2	1	2	1	3	2	2	2	2	1	3	3
133	1	1	2	3	3	3	2	1	2	3	2	3	3	3	1	3	2	2
134	2	2	3	3	3	3	2	3	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2
135	2	1	2	2	2	2	2	3	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2
136	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	3	3	3	3	2	2	2
137	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2
138	3	3	1	2	2	3	3	2	1	1	3	3	3	3	3	2	2	2
139	2	2	2	2	2	3	2	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1
140	2	1	3	3	3	3	2	2	2	1	2	3	2	2	2	3	2	2
141	2	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2	1	1	1	1	3	2	2
142	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	1	1	1
143	3	2	1	1	1	1	2	3	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3
144	2	3	1	1	2	2	3	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2
145	3	3	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
146	3	3	2	2	2	2	1	3	2	2	1	3	3	3	3	3	1	1
147	3	2	3	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	3	1	1
148	2	2	3	3	3	3	1	3	2	2	2	1	1	1	1	3	3	2
149	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	3	1	1
150	3	3	3	3	3	3	2	1	3	3	2	2	2	2	2	2	1	2
151	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	3	2	2	3	2	2	2
152	3	2	2	1	1	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	1	3	2
153	3	3	3	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
154	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	2	3	3	3	3	3	2	2
155	3	2	3	3	3	3	2	2	2	2	2	3	3	3	3	2	2	2
156	2	1	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2
157	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
158	3	2	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
159	2	1	3	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	1	2
160	2	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	2	2	1
161	3	1	3	3	3	3	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2
162	3	2	1	1	1	1	2	1	3	3	1	1	1	1	1	2	1	1
163	1	2	3	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2
164	1	1	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3	3	3	3	1	3	2
165	2	1	2	2	2	2	2	3	2	2	3	3	2	2	3	2	1	1
166	3	2	2	2	2	1	1	2	1	1	3	2	2	1	2	2	3	2
167	1	1	2	2	3	3	1	3	2	2	3	2	2	2	2	2	3	2

číslo vzorku	D2M283	D2M148	D4M172	D4M23	D4M53	D4M7	D5M24	D5M143	D6M122	D6M274	D9M15	D11M141	D11M242	D11N18	D11N10	D16M19	D17M120	D17M122
168	2	2	2	2	2	3	2	3	1	1	2	1	2	2	1	2	3	1
169	3	2	3	2	2	2	3	2	1	1	3	1	2	2	1	2	2	3
170	3	2	2	2	2	2	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2
171	3	2	2	2	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2
172	1	1	1	1	1	1	2	1	3	3	1	3	2	2	3	2	2	1
173	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	2	2	2	2	1	1	1
174	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2
175	2	2	1	1	2	3	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	3	2
176	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1	3	3	3	3	1	3	2
177	2	3	2	2	1	1	3	3	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2
178	2	3	2	2	1	1	2	3	2	2	1	1	1	1	1	3	3	3
179	2	2	2	3	3	3	3	2	2	2	3	2	2	2	2	1	2	3
180	2	2	3	3	3	3	1	2	1	1	3	2	3	3	3	2	2	3
181	3	3	2	1	1	2	3	2	3	3	1	3	3	3	3	1	2	2
182	2	2	3	3	3	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	3	2	1
183	3	2	1	1	1	2	2	3	2	2	2	3	2	2	2	2	1	3
184	3	3	1	1	1	2	3	2	1	2	2	3	3	3	3	2	1	1
185	2	2	1	1	1	1	2	2	2	3	2	2	2	2	2	3	2	2
186	2	1	2	2	2	2	3	2	3	3	1	1	1	1	1	3	2	2
187	3	3	2	2	2	2	2	1	2	3	2	2	2	2	2	3	2	2
188	2	2	2	2	2	1	3	3	1	1	3	2	2	2	2	2	2	2
189	3	2	1	1	1	1	3	2	2	3	2	1	1	1	1	2	3	3
190	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3
191	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2	3	1	1	1	1	3	2	2
192	1	1	2	2	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2
193	2	1	1	1	1	1	2	2	3	3	2	1	1	1	1	1	1	1
194	3	2	3	3	3	2	1	2	2	1	3	3	3	3	3	2	2	2
195	3	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	3	3	3	3	1	1	1
196	2	2	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
197	3	2	2	2	2	2	2	1	1	1	3	3	3	3	3	2	1	1
198	3	3	3	3	3	2	2	2	1	2	2	3	3	3	3	2	1	1
199	2	3	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	3	3
200	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
201	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1	2
202	1	1	3	3	3	3	2	1	2	2	2	3	3	3	3	2	1	1
203	1	2	2	2	1	1	3	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	1
204	2	3	1	1	1	1	2	2	2	2	3	2	2	2	2	1	1	1
205	2	2	3	3	3	2	2	2	3	3	1	2	2	2	2	3	2	2
206	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3	3	2	2	2	2	3	2	2
207	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	1	2	2
208	2	2	3	3	3	3	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2	3	2
209	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	1	1	1	2	1	2	2	1
210	2	3	2	2	2	2	3	3	3	3	3	2	2	2	2	1	2	1
211	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1
212	2	1	2	2	1	2	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	1	1
213	2	1	3	3	3	2	1	1	3	3	3	2	2	2	2	3	2	2
214	2	2	3	3	3	3	1	2	1	1	2	3	3	3	3	1	3	3
215	3	2	2	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	2	2	2	1	1

číslo vzorku	D2M283	D2M148	D4M172	D4M23	D4M53	D4M7	D5M24	D5M143	D6M122	D6M274	D9M15	D11M141	D11M242	D11N18	D11N10	D16M19	D17M120	D17M122
216	2	1	2	2	2	2	3	2	1	1	2	2	2	2	2	3	2	2
217	2	2	2	2	2	2	3	3	1	1	2	2	2	2	2	3	2	3
218	1	1	3	3	3	2	1	1	2	2	2	3	3	3	3	2	2	2
219	2	2	3	3	3	3	2	3	2	2	3	1	1	1	1	2	2	3
220	1	2	2	2	2	1	2	1	1	1	3	1	1	1	1	2	1	1
221	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1	1
222	3	2	3	3	2	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2
223	2	1	2	2	2	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1
224	3	3	3	3	3	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1
225	1	2	2	1	1	1	2	1	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2
226	1	1	1	1	2	2	3	3	2	2	2	2	2	3	2	3	2	2
227	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
228	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	3	2	2	2	2	1	3	3
229	2	3	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2
230	3	2	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	3	3	2	3	1	1
231	3	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	3	2
232	2	2	3	3	3	3	1	2	2	2	2	1	1	1	1	3	3	2
233	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	1	2	1
234	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	2	1	1	1	1	1	2	1
235	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	3	1	1	1	1	1	3	2
236	2	2	3	3	3	3	2	2	2	2	2	3	3	3	3	2	1	1
237	1	1	2	2	2	2	1	1	3	3	1	2	2	2	2	2	3	3
238	1	1	3	3	3	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	3	3
239	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2
240	2	1	2	2	2	3	3	2	3	3	2	1	1	1	1	3	2	2
241	3	3	3	3	3	3	1	2	3	3	2	1	2	2	1	2	2	2
242	2	2	1	1	1	1	2	3	2	2	3	2	3	3	2	1	2	2
243	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1	2	1	2	3	3
244	2	3	3	3	3	3	3	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	3
245	2	2	1	1	1	1	2	1	3	3	2	2	2	2	2	1	2	2
246	2	2	3	3	3	3	3	2	3	3	3	2	2	2	2	1	2	2
247	1	1	2	2	2	2	1	2	3	3	3	3	2	2	3	2	2	2
248	2	2	3	2	2	2	1	1	3	3	3	2	2	2	2	3	2	2
249	1	1	1	1	1	1	3	3	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
250	2	2	2	2	2	2	2	3	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2
251	3	3	2	2	2	2	3	2	2	2	1	2	3	3	2	2	1	1
252	2	2	1	1	1	1	3	2	2	2	3	1	1	1	1	2	2	2
253	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2

4.2. ELISA

Obsah jednotlivých cytokinů (IFN γ , IL-4, IL-10, IL-12 a IL-13) a IgE v krevním séru myši jsem testovala metodou sendvičová ELISA. Při zabití myši jim byla odebrána krev, ze které bylo centrifugací získáno sérum. To bylo až do provedení měření koncentrace cytokinů uloženo při teplotě -80 °C.

Metodu ELISA jsem prováděla postupem popsáním v kapitole Materiál a metody. Testovala jsem F₂ hybridy a pozitivní i negativní kontroly (infikované a neinfikované myši ze základních kmenů BALB/c, STS a CcS-9).

Metoda ELISA pro stanovení koncentrace jednotlivých cytokinů a IgE v myším krevním séru se v naší laboratoři provádí rutinně, s výjimkou stanovení koncentrace IL-13. Tuto metodiku jsem zaváděla. Jako návod k postupu jsem využila manuál dodávaný výrobcem protilátky proti IL-13 a částečně jsem ho kombinovala s postupy, již v naší laboratoři zavedenými. Výsledkem je optimální postup uvedený v kapitole Materiál a metody.

Součástí každé metody ELISA je vytvoření kalibrační křivky, neboť závislost optické denzity na koncentraci detekované látky není lineární. Kalibrační křivka se vytváří pomocí řady standardů o známé koncentraci, která musí být součástí každé destičky testované metodou ELISA, v programu KIM-E. Ten pak na základě právě takto vytvořené kalibrační křivky vyhodnocuje přímo výslednou koncentraci cytokinů a IgE v myším séru (výsledky jsou uvedeny v Tab.3).

Standardy i vzorky jsem do jamek destičky pipetovala v párech a program KIM-E z jednotlivých výsledků konkrétního vzorku počítal aritmetický průměr, čímž byla minimalizována chyba měření.

Tab.3: Výsledky metody ELISA. Stanovení koncentrace IgE, IFN γ , IL-4, IL-10, IL-12 a IL-13 v myším krevním séru. U některých vzorků nebylo dostatek krevního séra, a proto u nich byly testovány jen některé cytokiny.

číslo vzorku	IgE ($\mu\text{g/ml}$)	IFN γ (ng/ml)	IL-4 (ng/ml)	IL-10 (ng/ml)	IL-12 (ng/ml)	IL-13 (pg/ml)
1	35.96	5.295	1.5530	-	4.976	1021.0
2	24.47	4.066	0.9679	-	3.275	828.8
3	23.52	3.082	0.5942	-	3.425	-
4	38.65	69.360	hodně	-	3.002	-
5	23.81	5.295	1.3000	-	-	-
6	20.92	8.493	1.0110	-	-	-
7	24.93	14.760	hodně	-	3.167	-
8	20.24	6.894	0.9648	-	3.186	-
9	21.47	9.845	1.5780	-	4.416	-
10	7.55	3.574	1.1150	-	-	-
11	28.19	5.541	0.9113	-	-	-
12	12.45	0.000	0.5915	-	1.559	-
13	29.13	12.300	2.8390	-	1.753	-
14	37.62	4.435	2.2370	-	7.351	-
15	17.18	3.574	3.5990	-	4.056	693.2

číslo vzorku	IgE ($\mu\text{g/ml}$)	IFN γ (ng/ml)	IL-4 (ng/ml)	IL-10 (ng/ml)	IL-12 (ng/ml)	IL-13 (pg/ml)
16	42.00	0.000	1.6330	-	-	-
17	44.00	4.804	0.6351	-	7.515	1160.8
18	16.70	4.189	0.9171	-	3.405	-
19	23.87	3.574	1.1850	-	3.797	840.6
20	17.19	3.820	0.9439	-	3.557	576.2
21	40.00	3.451	1.4300	-	-	-
22	18.45	9.477	8.7570	-	-	-
23	31.62	2.467	hodně	-	-	-
24	23.07	1.975	0.6594	-	-	-
25	19.98	2.098	2.9120	-	3.325	-
26	36.64	6.402	0.7968	-	-	-
27	30.38	1.360	1.6940	-	4.438	-
28	29.29	3.820	0.7002	-	2.879	783.2
29	22.06	2.344	0.9922	-	2.254	-
30	26.62	1.483	0.6024	-	3.206	918.0
31	22.99	0.000	0.6893	-	3.797	-
32	36.99	5.664	3.0180	-	2.073	-
33	27.60	9.722	2.7600	-	2.173	741.6
34	35.28	10.580	hodně	-	5.202	1034.0
35	38.76	2.221	0.7634	-	2.046	-
36	1.10	0.868	0.6405	-	3.883	-
37	24.70	2.344	1.7160	-	3.425	510.5
38	34.83	1.360	0.8619	-	2.785	1133.4
39	20.47	3.082	0.9469	-	1.827	1252.0
40	26.21	11.950	2.6550	1.982	4.460	-
41	27.79	5.858	1.2110	1.867	5.065	817.4
42	27.57	28.150	13.5300	1.946	3.361	504.1
43	14.41	11.020	1.2340	1.954	3.456	817.4
44	19.89	11.840	2.4880	1.954	3.889	388.9
45	32.93	12.050	1.9310	1.867	1.295	472.8
46	32.96	15.660	3.2890	2.019	4.244	622.4
47	24.75	14.010	1.2080	1.888	2.701	602.9
48	15.45	10.500	1.2790	2.026	3.025	502.5
49	18.59	13.490	2.2050	1.982	3.179	610.0
50	31.19	12.870	1.8110	1.982	2.591	884.8
51	18.86	7.406	1.0690	1.975	2.936	398.7
52	23.29	7.406	1.6370	1.903	2.975	973.4
53	28.19	14.940	2.4580	1.954	3.716	1089.6
54	23.27	6.580	1.0250	1.932	3.408	-
55	31.22	37.330	12.8900	1.954	1.350	488.3
56	26.35	28.870	10.4000	1.990	4.482	881.8
57	2.24	7.406	0.8949	1.968	1.976	454.4
58	33.70	23.300	6.9130	1.888	1.265	561.6
591	17.41	10.500	1.7770	2.000	3.686	1188.2
601	3.63	19.270	2.7790	1.867	2.813	-
592	26.42	6.683	1.1600	1.925	1.050	1056.8
602	7.20	6.270	0.9963	1.975	3.399	1430.0
61	28.94	9.676	1.2860	1.982	2.663	-
62	8.60	21.340	4.7180	1.874	4.072	995.6
63	17.58	2.453	0.8182	2.011	5.424	761.0

číslo vzorku	IgE (µg/ml)	IFN _γ (ng/ml)	IL-4 (ng/ml)	IL-10 (ng/ml)	IL-12 (ng/ml)	IL-13 (pg/ml)
64	34.02	1.420	0.8840	1.859	1.247	460.4
65	25.95	21.850	10.4700	1.910	3.124	1063.2
66	32.61	16.590	1.6730	1.975	1.338	526.0
67	18.53	43.730	6.8350	2.004	3.106	958.0
68	28.27	18.030	2.7790	1.874	4.723	876.0
69	25.24	19.890	4.1790	1.932	3.962	796.6
70	14.55	16.490	3.8350	1.982	2.774	1314.8
71	19.59	11.430	0.9926	1.975	3.011	-
72	332.28	17.420	3.6390	1.845	1.513	-
73	9.88	7.922	1.0910	1.910	3.711	1045.4
74	25.42	9.263	0.9853	1.903	3.607	1400.6
75	28.91	18.030	1.8490	1.910	3.587	-
76	16.15	12.360	1.1780	2.048	3.133	-
77	18.07	21.060	6.6490	1.865	3.817	-
78	73.27	12.080	4.3560	1.658	3.010	1064.4
79	87.35	6.737	0.7016	1.725	1.906	971.2
80	13.75	47.440	16.3000	1.874	4.432	-
81	7.04	7.306	0.9899	1.874	4.296	707.2
82	13.02	11.850	2.1540	1.733	2.510	-
83	3.66	3.099	0.6976	1.890	4.350	941.0
84	26.68	6.737	0.8825	1.725	3.148	953.0
85	25.38	5.942	0.7790	1.898	3.335	214.2
86	71.45	8.215	0.8468	1.989	1.827	917.2
87	40.52	10.940	1.0260	1.783	2.274	807.8
88	27.29	9.580	1.2850	1.964	3.265	941.0
89	22.98	20.720	6.7990	1.683	2.742	1122.2
90	10.93	6.965	0.7345	1.882	2.988	-
91	14.82	15.950	1.8310	1.775	4.856	-
92	4.60	5.942	1.0060	1.890	3.280	1181.4
93	34.43	11.630	2.5340	1.882	2.838	-
94	32.04	8.898	2.0480	1.808	3.431	-
95	85.58	16.740	3.8510	1.683	0.000	824.6
96	6.75	19.810	8.7930	1.816	4.066	836.0
97	22.79	13.100	3.3600	1.741	4.101	827.4
98	52.25	22.880	5.4170	1.675	1.522	929.0
99	23.94	13.220	1.1890	1.775	3.289	788.2
100	17.27	9.239	1.1560	1.898	4.599	-
101	0.85	5.601	0.6851	1.775	3.928	920.2
102	27.34	45.160	26.2900	1.791	3.479	-
103	34.11	10.030	0.9103	1.725	4.655	932.0
105	37.69	9.466	1.6500	1.882	4.242	1020.4
106	45.60	18.220	2.0740	1.882	3.970	844.4
107	24.26	9.921	1.6360	1.931	-	-
108	95.99	24.130	7.2910	1.658	1.328	805.0
109	12.13	43.120	10.2900	1.799	3.675	893.6
110	8.54	25.840	3.4880	1.808	4.732	-
111	23.94	9.352	1.2600	1.890	3.817	-
112	40.04	8.556	1.9360	1.658	3.328	1005.0
113	39.92	6.624	1.0180	1.783	1.827	-
114	6.47	6.396	0.7790	1.725	3.684	703.9

číslo vzorku	IgE ($\mu\text{g/ml}$)	IFN γ (ng/ml)	IL-4 (ng/ml)	IL-10 (ng/ml)	IL-12 (ng/ml)	IL-13 (pg/ml)
115	1.35	3.099	0.7467	1.907	3.140	-
116	34.97	5.487	0.7709	1.824	3.800	507.1
117	97.94	13.580	0.9684	1.780	1.753	1332.4
118	72.45	14.610	1.4270	1.611	1.413	-
119	11.98	16.230	1.7180	1.514	6.355	853.0
120	19.60	10.780	0.7720	1.817	4.815	947.0
121	22.62	51.690	2.0050	1.371	2.873	890.6
122	5.25	5.378	4.6440	3.666	4.587	157.7
123	18.86	2.561	1.7900	3.094	6.155	546.6
124	4.09	4.573	1.6110	3.601	6.098	421.0
125	79.14	3.466	1.3230	3.634	2.162	273.2
126	10.64	3.668	1.5940	3.892	-	510.4
127	7.69	1.857	1.3070	3.267	4.902	185.0
128	28.15	23.890	18.3500	-	-	249.4
129	7.91	3.969	1.6030	-	3.893	208.4
130	13.04	3.165	1.1060	3.924	4.558	224.3
131	3.15	5.378	1.2750	4.146	4.385	91.8
132	33.28	16.140	10.3600	3.828	5.323	321.7
133	46.80	3.265	1.3800	3.502	2.590	325.2
134	26.63	1.354	1.4050	3.094	-	326.8
135	14.69	7.189	8.9480	-	5.085	319.8
136	54.61	0.750	0.8327	-	2.556	-
137	25.22	8.195	6.7470	3.335	3.182	292.6
138	2.01	7.692	1.2910	3.763	-	286.2
139	39.43	3.567	2.3830	3.502	-	250.8
140	16.30	0.750	1.0490	-	-	498.0
141	14.23	4.875	4.6050	3.199	4.548	348.4
142	6.65	15.640	1.0070	1.631	5.667	-
143	38.30	35.450	2.4610	1.328	2.753	851.2
144	4.79	25.200	2.0530	1.305	5.690	313.0
145	0.74	4.015	0.7187	1.631	3.390	69.7
146	2.40	11.960	0.8596	1.494	4.627	187.5
147	35.55	16.080	1.3600	0.000	3.840	302.6
148	21.05	28.290	3.0250	1.392	2.198	1008.0
149	5.85	3.132	0.7259	1.687	3.982	-
150	14.49	5.928	0.7755	1.573	1.959	877.2
151	8.01	8.724	1.0750	1.434	2.102	298.4
152	41.69	17.990	1.0640	1.212	1.683	252.4
153	12.03	11.520	0.8141	1.328	5.879	1114.0
154	35.12	22.560	1.3170	1.413	2.119	930.8
155	63.27	8.724	0.7543	1.514	1.995	171.2
156	6.05	6.534	0.7651	1.824	5.249	569.8
157	12.63	36.710	4.1620	1.735	1.419	-
158	91.81	31.210	4.1310	1.532	1.360	1093.0
159	13.55	10.790	0.8248	1.752	5.903	415.0
160	16.05	38.840	3.6790	1.735	2.822	741.8
161	32.71	11.500	0.8136	1.717	3.147	484.1
162	5.35	7.954	0.7271	1.551	2.174	-
163	13.46	11.150	0.7800	1.354	1.925	643.2
164	4.41	10.080	0.7651	1.788	-	-

číslo vzorku	IgE (µg/ml)	IFN _γ (ng/ml)	IL-4 (ng/ml)	IL-10 (ng/ml)	IL-12 (ng/ml)	IL-13 (pg/ml)
165	2.32	12.570	0.8136	1.735	4.137	-
166	10.01	20.730	1.1210	1.735	5.424	1231.2
167	5.73	9.196	0.7987	1.663	4.742	357.6
168	43.53	29.960	3.6860	1.395	2.883	922.6
169	69.56	16.830	1.1210	1.788	1.571	1853.0
170	59.14	6.179	0.7158	1.513	1.101	817.1
171	9.62	5.291	0.7271	1.589	3.582	683.2
172	5.84	7.954	0.7987	1.681	3.147	678.2
174	30.80	17.010	2.0510	1.375	2.238	971.6
175	38.95	15.760	1.3250	1.770	4.113	914.0
176	22.54	17.360	1.1590	1.435	3.043	771.2
177	49.48	26.410	2.3090	1.589	4.258	472.8
178	77.53	23.750	2.0710	1.626	2.021	462.7
179	10.69	4.936	0.7613	1.824	3.363	540.6
180	33.04	6.356	0.7987	1.717	3.426	1203.6
181	4.81	8.309	0.7613	1.770	3.648	1838.8
182	59.05	11.860	0.7913	1.589	4.121	400.3
183	69.76	21.270	2.3190	1.532	1.320	2316.0
184	25.18	17.360	1.0330	1.663	3.081	-
185	66.64	15.230	0.8990	1.699	1.478	721.4
186	42.92	14.700	1.0300	1.770	-	-
187	5.47	9.019	0.9213	1.681	3.121	772.6
188	35.52	20.560	0.8285	1.699	5.715	540.0
189	28.24	24.280	3.2170	1.699	2.896	1054.4
190	15.25	4.936	0.7613	1.570	4.628	680.7
191	71.26	9.906	0.8767	1.699	4.850	855.4
192	0.44	10.080	0.8656	1.532	6.868	1229.2
193	58.53	32.270	3.1840	1.475	3.433	1229.2
194	25.36	22.690	0.8730	1.644	5.464	1092.8
195	4.05	0.000	0.7709	-	2.953	56.3
196	51.69	0.000	0.7888	3.129	1.299	262.0
197	5.48	4.875	0.9507	3.502	-	189.8
198	79.37	3.064	2.4390	3.301	1.857	-
199	5.62	2.460	3.0170	-	3.555	-
200	4.12	2.360	2.3540	-	-	82.4
201	6.91	0.000	0.7619	2.878	3.643	162.3
202	7.43	0.000	0.7799	3.233	3.866	278.0
203	60.89	50.350	8.2610	-	-	297.4
204	44.98	64.030	20.3500	4.051	3.012	249.0
205	38.66	0.951	0.9342	3.301	1.915	149.5
206	6.99	3.768	1.7720	3.402	4.558	72.3
207	2.63	2.360	0.9919	-	-	266.8
208	5.97	3.466	1.0330	3.796	4.983	-
209	3.42	2.259	0.8585	3.199	-	224.0
210	12.56	3.466	0.9589	3.402	4.963	124.7
211	39.30	4.372	1.3320	3.164	3.242	192.9
212	3.58	5.177	0.9259	-	-	287.8
213	3.38	7.993	1.7720	-	-	361.6
214	1.93	1.117	0.7101	2.836	-	311.0
215	105.20	1.588	3.5400	2.022	2.160	308.8

číslo vzorku	IgE ($\mu\text{g/ml}$)	IFN γ (ng/ml)	IL-4 (ng/ml)	IL-10 (ng/ml)	IL-12 (ng/ml)	IL-13 (pg/ml)	
216	114.00	0.960	0.8172	2.715	-	-	
217	56.91	3.315	3.8370	2.796	3.919	231.8	
218	11.77	1.352	0.8939	2.836	4.735	410.0	
219	69.78	0.567	1.4030	1.906	-	378.2	
220	34.97	1.588	0.9023	2.505	5.433	480.8	
221	25.38	2.294	0.9191	2.230	3.500	-	
222	19.80	0.803	0.7733	2.796	4.824	241.5	
223	50.72	3.629	3.9270	-	-	444.2	
224	90.99	1.666	0.6819	3.332	5.288	-	
225	32.58	4.100	4.5950	2.715	1.392	347.9	
226	24.06	0.332	0.5073	2.371	3.264	562.0	
227	22.44	1.823	1.3120	2.715	-	336.2	
228	72.52	1.038	1.0100	2.278	4.538	384.6	
229	30.98	0.000	0.5333	2.230	-	388.8	
230	85.09	1.352	0.7822	2.715	-	470.0	
231	86.00	25.220	12.3000	2.715	4.284	384.6	
232	105.80	0.489	0.5801	2.505	2.036	-	
233	33.69	2.059	1.6190	2.796	1.556	-	
234	39.94	0.567	0.6213	-	-	321.4	
235	70.18	1.509	0.7910	2.371	10.090	-	
236	4.94	1.431	0.6723	-	-	410.0	
237	13.53	1.195	1.0430	2.590	4.517	388.8	
238	25.38	0.960	1.1170	2.129	3.979	520.0	
239	18.30	1.509	1.0180	2.756	9.461	374.0	
240	37.43	4.335	5.3630	2.325	5.122	199.7	
241	111.00	0.881	0.7376	2.371	-	391.0	
242	26.00	2.294	1.8580	2.674	5.886	-	
243	35.43	1.117	0.6227	2.796	5.707	342.4	
244	67.66	1.195	2.1760	2.022	2.052	348.8	
245	10.29	0.803	0.6723	2.461	1.698	-	
246	70.51	3.236	3.8030	2.756	4.474	283.8	
247	88.89	1.195	0.9023	2.674	-	359.2	
248	41.60	0.881	2.4900	2.230	3.919	472.2	
249	66.49	1.980	0.9689	2.548	5.707	719.0	
250	76.87	0.000	0.7997	2.325	5.313	376.0	
251	86.75	1.588	1.1170	2.715	-	359.2	
252	86.84	1.980	0.9274	3.031	5.835	325.6	
253	30.89	3.834	1.9180	2.887	6.004	-	
Pozitivní kontroly							
č. vzorku	kmen	IgE ($\mu\text{g/ml}$)	IFN γ (ng/ml)	IL-4 (ng/ml)	IL-10 (ng/ml)	IL-12 (ng/ml)	IL-13 (pg/ml)
235	BALB	102.10	8.952	1.3710	0.973	4.090	763.2
236	BALB	50.69	54.840	10.4400	0.000	4.262	763.2
237	BALB	73.19	28.250	10.5100	0.000	3.184	-
238	BALB	58.76	19.210	11.2000	1.254	3.524	869.0
239	BALB	47.31	20.960	7.9910	0.000	4.525	773.8
240	BALB	122.70	147.200	26.1000	0.000	4.356	-
244	CcS9	36.46	0.584	0.8159	1.158	1.641	-
245	CcS9	73.76	2.339	0.9476	1.381	1.641	-
246	CcS9	16.13	2.609	0.8457	-	1.711	-

č. vzorku	kmen	IgE (μg/ml)	IFN γ (ng/ml)	IL-4 (ng/ml)	IL-10 (ng/ml)	IL-12 (ng/ml)	IL-13 (pg/ml)
247	CcS9	1.13	1.259	-	-	-	-
258	CcS9	81.28	7.198	1.5710	-	-	-
259	CcS9	56.94	0.584	0.8159	-	1.673	-
260	CcS9	95.64	1.259	0.8110	1.499	1.726	885.8
269	BALB	68.21	1.394	1.3320	0.000	3.353	611.2
270	BALB	3.08	4.633	2.9820	1.421	3.238	713.8
271	BALB	42.70	9.492	5.1600	0.000	3.909	827.6
282	BALB	51.66	92.160	17.7700	1.187	5.598	658.0
283	BALB	76.40	35.360	4.5810	1.534	7.374	-
284	BALB	58.92	28.880	2.1360	1.413	3.681	798.0
285	BALB	39.27	21.820	1.2680	1.494	7.847	-
298	CcS9	57.77	0.815	0.7544	-	-	1101.4
299	CcS9	65.79	0.881	0.6808	0.000	2.093	-
300	CcS9	65.61	2.259	0.9313	2.675	2.159	-
301	CcS9	83.36	1.734	0.7131	2.106	2.487	716.9
302	BALB	19.10	56.840	4.8530	1.706	4.942	355.6
303	BALB	42.73	16.520	0.8247	1.725	7.965	512.4
304	BALB	77.28	42.270	5.5870	1.743	4.525	522.9
305	BALB	53.11	33.890	3.5550	1.349	5.748	-
306	BALB	68.85	5.278	2.9020	-	4.512	807.2
307	BALB	44.77	9.675	6.1420	2.887	5.112	1306.0
322	CcS9	48.31	5.540	1.0990	2.749	2.396	-
323	CcS9	113.00	2.653	1.1800	-	-	952.2
324	CcS9	26.78	1.078	0.7098	0.000	2.239	-
452	BALB	42.50	4.950	1.4400	0.000	5.147	1502.0
453	BALB	67.22	2.653	0.9154	0.000	-	1685.2
454	BALB	98.06	5.343	1.6620	2.336	4.993	1395.4
455	BALB	43.79	2.128	0.8616	1.942	-	1493.4
456	BALB	86.08	1.734	0.8711	0.000	4.676	-
457	BALB	42.98	3.506	1.6110	0.000	4.351	1527.6
458	CcS9	5.69	1.012	0.7035	0.000	-	-
459	CcS9	71.41	2.784	1.6380	-	-	1335.8
460	CcS9	37.23	2.390	-	-	-	-
461	CcS9	37.05	1.931	0.8647	-	-	1310.2
462	CcS9	7.18	0.881	0.7035	0.000	2.638	-
463	CcS9	31.69	1.734	0.9217	0.000	-	1318.6
464	CcS9	53.80	1.996	0.7797	0.000	6.344	-
465	CcS9	16.01	0.750	0.6645	-	-	1293.2
466	STS	0.59	1.406	0.6938	-	-	1357.0
467	STS	0.62	1.734	0.7322	2.749	-	-
468	STS	0.50	0.000	0.6381	0.000	2.380	1425.2
469	STS	0.52	0.000	0.6580	0.000	-	-
470	STS	0.60	1.340	0.7035	-	2.964	-
471	STS	0.57	1.012	0.7098	-	-	960.6
472	STS	0.50	0.487	0.6645	0.000	2.638	-
473	STS	0.60	0.750	0.6743	-	-	-
474	BALB	8.90	5.646	0.7651	1.681	2.599	1007.6
475	BALB	14.13	1.078	0.7035	0.000	-	-
476	CcS9	58.97	1.603	0.7920	0.000	2.380	808.5
477	CcS9	8.83	1.931	0.7386	1.942	2.787	868.2

č. vzorku	kmen	IgE (μg/ml)	IFN _γ (ng/ml)	IL-4 (ng/ml)	IL-10 (ng/ml)	IL-12 (ng/ml)	IL-13 (pg/ml)
478	CcS9	18.77	3.235	0.9978	3.374	1.767	891.3
479	CcS9	26.28	0.953	0.7726	2.453	-	918.2
481	CcS9	47.35	1.583	0.8245	2.773	1.581	1174.0
482	CcS9	1.45	1.504	0.8038	-	-	957.8
483	CcS9	16.65	0.000	0.7197	2.050	0.000	-
484	BALB	9.47	2.291	1.3370	2.773	-	1412.0
485	BALB	8.26	2.291	1.7880	-	-	1535.6
486	BALB	1.41	1.504	0.7934	2.890	4.746	2404.0
487	BALB	50.75	2.448	1.0690	3.475	3.992	1121.0
488	BALB	9.08	1.898	0.8858	3.575	3.550	814.1
489	BALB	5.20	2.448	0.8655	3.003	6.938	984.2
490	BALB	74.54	1.111	0.7934	2.521	3.981	587.0
491	BALB	25.27	4.494	1.5360	3.058	3.357	829.5
492	STS	0.55	0.639	0.7516	2.651	2.150	-
493	STS	0.58	0.481	0.7358	-	-	1231.2
494	STS	0.61	1.662	0.7934	-	2.031	2004.0
495	STS	0.65	2.134	0.8038	3.003	-	1196.0
496	STS	0.57	1.583	0.7987	2.143	1.521	852.0
497	STS	0.65	3.392	0.8193	3.219	1.998	-
Negativní kontroly							
č. vzorku	kmen	IgE (μg/ml)	IFN _γ (ng/ml)	IL-4 (ng/ml)	IL-10 (ng/ml)	IL-12 (ng/ml)	IL-13 (pg/ml)
K94	BALB	0.71	0.875	0.7516	2.587	2.731	1809.0
K96	CcS9	0.72	0.953	0.7622	2.713	-	1271.0
K99	CcS9	0.65	1.189	0.7831	3.058	1.839	1121.0
K101	BALB	1.02	1.819	0.8348	3.374	4.256	900.1
K107	BALB	1.45	0.875	0.7516	2.307	2.875	-
K108	BALB	1.02	2.763	1.0180	3.219	3.378	571.5
K114	CcS9	0.62	1.111	0.7411	3.166	-	1456.2
K115	CcS9	0.63	0.560	0.7463	-	1.624	1187.2
K116	BALB	0.68	1.347	0.7934	3.166	2.031	384.4
K123	CcS9	0.70	1.583	0.8141	3.058	1.552	688.8
K124	Ccs9	0.55	0.639	0.7197	1.600	-	530.0
K189	BALB	2.87	1.268	0.7570	2.453	-	785.8
K190	BALB	3.44	2.212	0.7934	2.832	3.453	472.6
K191	CcS9	0.92	1.347	0.8245	2.947	1.827	988.6
K192	CcS9	0.81	0.000	0.7570	1.943	1.664	913.8
K193	STS	0.59	1.504	0.7831	3.003	2.129	-
K194	STS	0.54	0.000	0.7305	2.143	0.000	-
K195	CcS9	0.64	0.841	0.7570	2.651	1.454	807.8
K196	CcS9	0.69	1.111	0.7883	3.058	1.537	1200.4
K197	CcS9	0.55	0.000	0.6381	0.000	-	1161.0
K198	BALB	1.11	0.815	0.6970	0.000	3.335	363.1
K199	BALB	0.66	0.000	0.6514	0.000	-	444.8
K200	BALB	0.96	1.012	0.7131	0.000	3.410	738.2
K201	STS	0.57	0.000	0.7142	0.000	-	577.6
K202	STS	-	-	-	-	-	742.2

4.3. STATISTIKA

Posledním mým úkolem na tomto projektu bylo statistické zpracování všech výsledků. K tomuto účelu jsem použila analýzu rozptylu (ANOVA) v počítačovém programu NCSS. Hledala jsem vazby mezi jednotlivými fenotypovými parametry nemoci a genotypem jednotlivých F₂ hybridů (jednotlivými testovanými markery).

Průběh rozvoje kožních lézí v čase byl hodnocen na základě týdenního měření velikosti lézí u každé myši v 4. – 8. týdnu po infekci. Provedla jsem analýzu kovariance (obecný lineární model – GLM ANOVA) v programu NCSS, kde je marker určen jako fixní parametr a týden pozorování jako kovarianční parametr.

Spočítanou *P*-value (α_T) jsem korigovala podle LANDER a KRUGLYAK (1995) pomocí vzorce

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

tak, že jsem dosadila za $G = 2 M$ (délka segregující části genomu: 12,5% z 16 M); $C = 8$ (počet chromozómů segregujících v tomto křížení); $\rho = 1,5$ pro F₂ hybridy; $h(T) = F$ ratio.

Vazba, případně interakce, mezi jednotlivými oblastmi genomu při ovlivňování fenotypu, byla statisticky potvrzena, pokud její korigované *P*-value bylo menší než 0,05. Jako sugestivní vazba byl označen případ, pokud bylo *P* jen o málo větší (cca o 0,003) než 0,05.

Soubory hodnot některých znaků jsem musela transformovat tak, abych dosáhla jejich normálního rozdělení. K tomu jsem použila následující transformace: $x^{0,3}$ pro počet parazitů ve slezině a uzlinách, $x^{0,32}$ pro koncentraci IgE v séru, $x^{0,4}$ pro koncentraci IFN γ v séru, $x^{0,5}$ pro splenomegalii a dynamiku lézí a $\ln(x)$ pro hepatomegalii a koncentraci IL-4 v séru.

Pro každý fenotypový znak jsem testovala jednak celý soubor myši a jednak každé pohlaví zvlášť. U několika znaků byla vazba prokázána pouze u jednoho pohlaví. Výsledky jsou uvedeny v následujících tabulkách (Tab. 4 a Tab. 5). Výsledky pro kontroly jsou uvedeny v tabulce číslo 6.

Tab.4: Vazby mezi genotypem u F₂ hybridů mezi kmeny BALB/c a CcS-9. Genotyp CC = homozygotní BALB, CS = heterozygot, SS = homozygotní STS. Tučně jsou zvýrazněny průměrné netransformované hodnoty znaku pro danou skupinu. V závorce je uveden počet myši v každé skupině. Uvedená *P*-hodnota je korigovaná na celý genom.

Fenotyp	Marker	Genotyp						<i>P</i> - hodnota
		CC		CS		SS		
Počet parazitů v lymfatických uzlinách	D2Mit283	12.05	2.11 ±0.11 (n=22)	22.07	2.53 ±0.07 (n=57)	20.92	2.49 ±0.08 (n=33)	0.0177
	D11Mit141	22.65	2.55 ±0.09 (n=30)	21.49	2.51 ±0.07 (n=57)	14.06	2.21 ±0.10 (n=25)	0.0235
	D11Nds10	22.36	2.54 ±0.09 (n=30)	21.49	2.51 ±0.07 (n=57)	13.85	2.20 ±0.10 (n=25)	0.0113
Počet parazitů ve slezině	D16Mit19	8.33	1.89 ±0.11 (n=25)	9.03	1.94 ±0.07 (n=58)	15.06	2.26 ±0.10 (n=29)	0.0531
Hepatomegalie	D11Nds18	64.72	4.17 ±0.01 (n=51)	63.43	4.15 ±0.08 (n=136)	60.95	4.11 ±0.12 (n=66)	0.0422
Splenomegalie	D4Mit23	15.52	3.94 ±0.08 (n=58)	15.60	3.95 ±0.05 (n=121)	17.89	4.23 ±0.07 (n=75)	0.0298
	D11Mit141	17.22	4.15 ±0.08 (n=56)	16.48	4.06 ±0.05 (n=128)	14.59	3.82 ±0.07 (n=70)	0.0390
	D11Mit242	17.22	4.15 ±0.08 (n=51)	16.48	4.06 ±0.05 (n=139)	14.59	3.82 ±0.07 (n=64)	0.0470
	D11Nds10	17.31	4.16 ±0.08 (n=58)	16.56	4.07 ±0.05 (n=130)	14.59	3.82 ±0.07 (n=66)	0.0327
Velikost lézí 7 týdnů po infekci	D11Mit141	74.34 ±4.12	(n=56)	66.99 ±2.73	(n=128)	56.92 ±3.69	(n=70)	0.0151
	D11Mit242	75.47 ±4.32	(n=51)	66.82 ±2.61	(n=139)	56.82 ±3.85	(n=64)	0.0030
	D11Nds18	76.44 ±4.30	(n=51)	66.73 ±2.63	(n=137)	56.81 ±3.78	(n=66)	0.0367
	D11Nds10	76.17 ±4.03	(n=58)	67.10 ±2.69	(n=130)	56.07 ±3.77	(n=66)	0.0020
Velikost lézí 8 týdnů po infekci	D11Nds10	93.64 ±4.47	(n=58)	86.88 ±2.99	(n=130)	72.48 ±4.19	(n=66)	0.0352
Dynamika lézí	D4Mit172	36.87	6.07 ±0.15 (n=53)	35.28	5.94 ±0.10 (n=124)	43.35	6.58 ±0.12 (n=77)	0.0086
	D4Mit23	36.37	6.03 ±0.14 (n=57)	35.79	5.98 ±0.10 (n=122)	42.98	6.56 ±0.12 (n=75)	0.0375
	D11Mit141	41.44	6.44 ±0.14 (n=56)	39.38	6.28 ±0.09 (n=128)	32.90	5.74 ±0.13 (n=70)	0.0167
	D11Nds18	44.49	6.67 ±0.15 (n=51)	37.85	6.15 ±0.09 (n=137)	33.54	5.79 ±0.13 (n=66)	0.0039
	D11Nds10	42.12	6.49 ±0.14 (n=58)	39.08	6.25 ±0.09 (n=130)	32.49	5.70 ±0.13 (n=66)	0.0056
	D17Mit120	41.01	6.40 ±0.12 (n=73)	38.41	6.20 ±0.09 (n=139)	31.66	5.63 ±0.16 (n=42)	0.0384

Fenotyp	Marker	Genotyp						P-hodnota
		CC		CS		SS		
IgE v séru	D11Mit141	32.97	3.06 ±0.10 (n=56)	24.20	2.77 ±0.07 (n=127)	15.06	2.38 ±0.09 (n=70)	0.0006
	D11Mit242	30.45	2.98 ±0.11 (n=51)	24.03	2.77 ±0.06 (n=138)	16.70	2.46 ±0.10 (n=64)	0.0335
	D11Nds10	32.93	3.06 ±0.10 (n=58)	24.76	2.79 ±0.07 (n=129)	14.81	2.37 ±0.09 (n=66)	0.0001
IFNg v séru	D4Mit23	9.39	2.45 ±0.12 (n=57)	5.16	1.93 ±0.08 (n=121)	5.61	1.99 ±0.11 (n=75)	0.0112
	D4Mit53	9.99	2.51 ±0.12 (n=59)	4.81	1.87 ±0.08 (n=120)	5.35	1.96 ±0.11 (n=74)	0.0061
IL-4 v séru	D4Mit53	1.82	0.60 ±0.09 (n=59)	1.21	0.19 ±0.06 (n=120)	1.25	0.22 ±0.08 (n=74)	0.0328

Tab.5: Intrakce mezi lokusy na chromozómech 11 a 16, které kontrolují velikost lézí v 7. týdnu po infekci. V závorce jsou uvedeny počty myši v dané skupině. Tučně je zvýrazněná průměrná velikost léze v dané skupině (v mm²).

Velikost lézí 7týdnů po infekci				
P-hodnota = 0.0011				
Korigovaná P-hodnota = 0.0404				
		D16Mit19		
		CC	CS	SS
D11Nds10	CC	108.89±9.95 (n=9)	72.63±5.54 (n=30)	65.83±6.85 (n=19)
	CS	57.61±5.28 (n=32)	67.38±3.67 (n=66)	75.05±5.28 (n=32)
	SS	59.76±6.67 (n=20)	54.24±4.97 (n=36)	53.10±9.44 (n=10)

Tab.6: Kontroly (srovnání imunopatologických parametrů myši z kmenů BALB/c a CcS-9 po infekci *L.major*). Průměry, směrodatné odchylky průměrů a *P*-hodnoty byly spočítány metodou ANOVA. Hodnoty velikost lézí v 8. týdnu infekce, hepatomegalie, hladiny IgE v séru a množství parazitů v uzlinách a slezině vykazovaly normální distribuci. Hodnoty splenomegalie a hladiny IFN γ v séru jsem transformovala zlogaritmováním přirozeným logaritmem a hodnoty hladiny IL-4 umocněním na 0,2. V závorkách jsou uvedeny počty testovaných myši. Tučně jsou zvýrazněné netransformované hodnoty.

Fenotyp	Kmen		<i>P</i> -hodnota (rozdíl mezi kmeny)
	BALB/c	CcS-9	
Velikost lézí 7 týdnů po infekci	87.66 7684.35 \pm 613.71 (n=35)	82.94 6879.09 \pm 662.88 (n=30)	0.6435
Velikost lézí 8 týdnů po infekci	110.42 \pm5.71 (n=35)	102.94 \pm6.28 (n=29)	0.6441
Dynamika lézí	57.04 \pm2.05 (n=35)	59.10 \pm2.22 (n=30)	0.4957
Splenomegalie	19.87 2.99 \pm 0.05 (n=35)	13.83 2.63 \pm 0.05 (n=30)	0.0074908
Hepatomegalie	65.8 \pm0.81 (n=35)	55.77 \pm0.88 (n=30)	0.00005945
IgE v séru	51.40 \pm4.71 (n=35)	47.53 \pm5.09 (n=30)	0.5802
IFN γ v séru	12.99 2.56 \pm 0.12 (n=35)	1.72 0.54 \pm 0.13 (n=30)	0.00000044
IL-4 v séru	1.88 1.13 \pm 0.01 (n=35)	0.92 0.98 \pm 0.01 (n=28)	0.00001352
Množství parazitů ve slezině	11.06 \pm2.58 (n=16)	19.69 \pm2.58 (n=16)	0.0248
Množství parazitů v lymfatických uzlinách, obě pohlaví	28.38 \pm 3.25 (n=16)	29.10 \pm 3.25 (n=16)	0.8754
Množství parazitů v lymfatických uzlinách, samice	19.73 \pm 3.44 (n=8)	12.5 \pm 3.44 (n=8)	0.1588
Množství parazitů v lymfatických uzlinách, samci	37.02 \pm 5.24 (n=8)	45.70 \pm 5.24 (n=8)	0.2604

5. DISKUZE

5.1. HLEDÁNÍ GENŮ, KTERÉ KONTROLUJÍ URČITÝ ZNAK

Při hledání genů, které kontrolují nějaký znak, lze využít dvou základních přístupů. Jednou z možností je vytypovat si vhodné kandidátní geny na základě znalosti jejich obecné funkce. Následuje funkční analýza těchto kandidátních genů (například pomocí knock-outů pro daný gen) a potvrzení či vyvrácení původní teorie, že se gen účastní kontroly daného znaku.

Druhou možností je postupovat z opačného konce, tedy od genetické informace. Pomocí vazebné analýzy nalezneme oblasti genomu, které mají vazbu k námi zkoumanému znaku, a teprve v jejich rámci hledáme potenciální kandidátní geny. Ty pak následně podrobíme funkční analýze.

Oba přístupy mají řadu výhod a nevýhod, zastánců i odpůrců. Nevýhodou druhé varianty je velká časová a finanční náročnost, i když je tato nevýhoda relativní. Pokud se při první variantě výzkumný pracovník netrefí hned do správného kandidátního genu, rovněž vyplývá mnoho času a prostředků. Další relativní nevýhodou použití druhé metody je vysoké riziko falešné positivity. Falešnou pozitivitu však můžeme eliminovat použitím vhodné statistické analýzy a korekce (LANDER a KRUGLYAK, 1995, LANDER a SCHORK, 1994). Největší výhodou druhého postupu je to, že není třeba vědět nic o mechanismech působení hledaných genů. Laboratoř buněčné a molekulární imunologie, kde jsem vypracovávala svoji diplomovou práci, se přiklonila k druhé variantě.

5.2. GENETICKÁ ANALÝZA GENŮ KONTROLUJÍCÍCH VNÍMAVOST K INFEKCI *L. major*

Většina autorů (BEEBE *et al.*, 1997, ROBERTS *et al.*, 1997) se zaměřila pouze na mapování genů, které během infekce *L. major* u myši ovlivňují velikost kožních lézí.

V Laboratoři buněčné a molekulární imunologie byl vyvinut model infekce *L. major* u myši (LIPOLDOVÁ *et al.*, 2002), v rámci kterého je možno hodnotit řadu klinických znaků – příznaků infekce *L. major* (velikost kožních lézí, množství parazitů ve slezině a lymfatických uzlinách, splenomegalie, hepatomegalie) i celkové změny v imunitním systému po infekci *L. major* (hladiny různých cytokinů a IgE v krevním séru). Tento postup byl použit také v projektu, jehož součástí byla má diplomová práce.

5.3. DETEKOVANÉ VAZBY

V tabulce 4 (kapitola Výsledky) jsou uvedeny konečné výsledky mé práce. Nalezla jsem celkem pět lokusů, které mají vazbu minimálně na jeden fenotypový znak – projev infekce *L. major* u myši. Přehled těchto pěti lokusů je uveden v tabulce 7 a na Obr. 10.

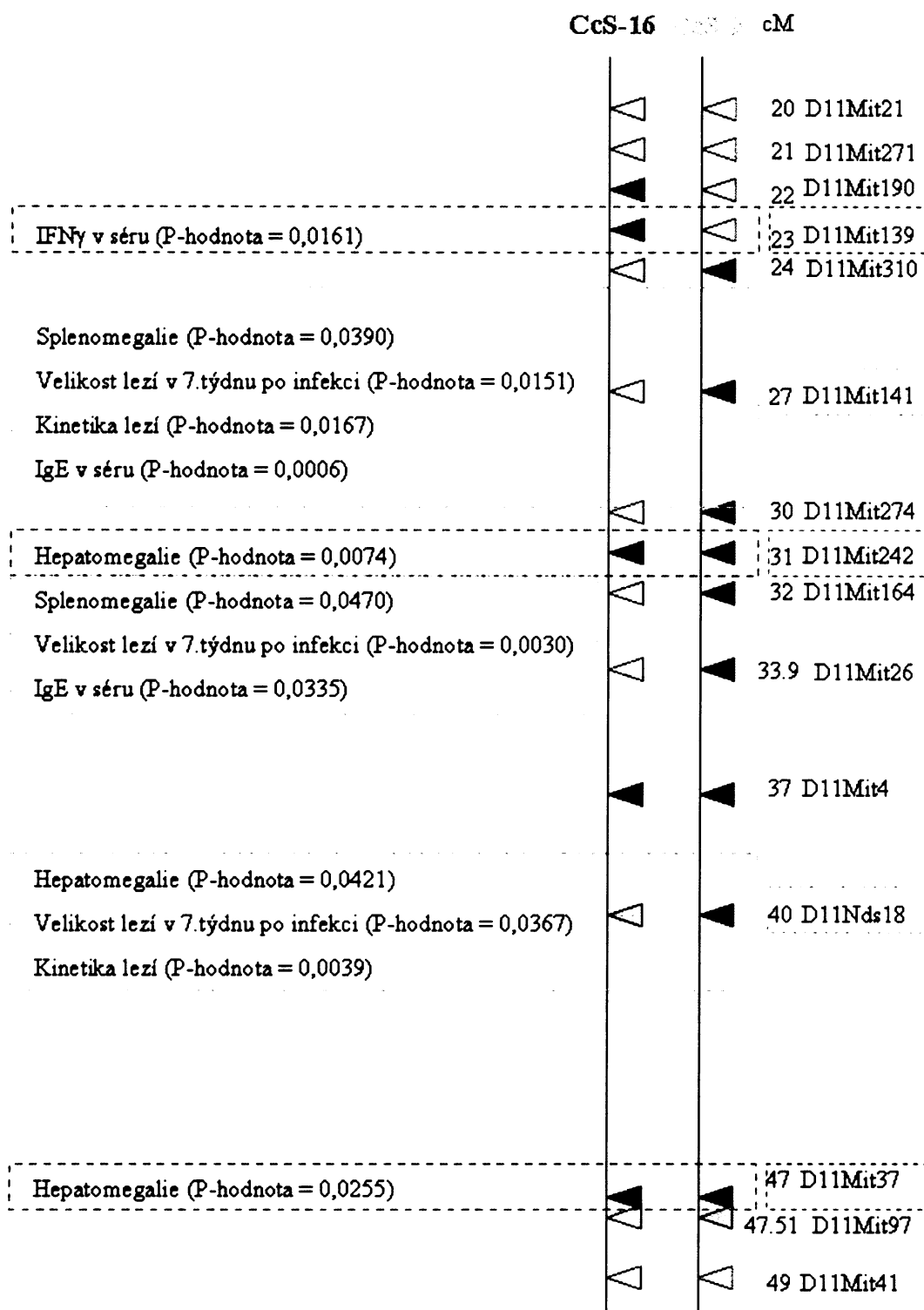
Srovnáním svých výsledků s literaturou jsem došla k závěru, že lokusy na 11. a 16. chromozomu už byly objeveny v pokusech s F₂ hybridy jiných kmenů ze série CcS/Dem.

Tab. 7: Přehled *Lmr* lokusů, které kontrolují odpověď k *L. major* u kmene CcS-9. Jsou zde uvedeny pouze QTL, u kterých byla *P*-hodnota menší než 0,05 (s výjimkou počtu parazitů ve slezině u *Lmr18*, u které se korigovaná *P*-hodnota rovná 0,0531).

Lokus	Chr.	Marker	Pozice v cM	Kontrolovaný znak
<i>Lmr24</i>	2	D2Mit283	83.5	Množství parazitů v uzlinách
<i>Lmr25</i>	4	D4Mit172	8.6	Splenomegalie
		D4Mit23	14.3	Hladina IL-4 v séru u samic
		D4Mit53	19.8	Hladina IFN γ v séru Velikost lézí
<i>Lmr15</i>	10	D11Mit141	27	Množství parazitů v lymfatických uzlinách
		D11Mit242	31	Hepatomegalie
		D11Nds18	40	Splenomegalie u samic
		D11Nds10	?	Velikost lézí Hladina IgE v séru Spontánní proliferace lymfocytů u samic
<i>Lmr18?</i>	16	D16Mit19	54	Množství parazitů ve slezině (suggestive) Velikost lézí (opačný efekt u samců a samic)
<i>Lmr26</i>	17	D17Mit120	42	Velikost lézí

5.3.1. *Lmr15*

Lmr15 byl poprvé detekován u F₂ hybridů mezi kmeny BALB/c a CcS-16 a publikován v roce 2003 (VLADIMIROV *et al.*). Tehdy byla zjištěna vazba mezi markery D11Mit242 a D11Mit37 a hepatomegalií (STS alela byla asociována s menší hepatomegalií než alela BALB/c). Tento lokus byl popsán i v další publikaci (HAVELKOVÁ *et al.*, 2006). Zde byla publikována vazba mezi tímto lokusem (konkrétně markerem D11Mit139) a hladinou IFN γ v krevním séru (viz. Obr. 9).



Obr. 9: Srovnání lokusu *Lmr15* u kmenů CcS-9 a CcS-16. V červených rámečcích jsou uvedeny znaky a markery, mezi kterými byla vazba detekována u F₂ hybridů kmenů BALB/c a CcS-16, v modrých rámečcích jsou uvedeny znaky a markery, mezi kterými byla vazba detekována u F₂ hybridů kmenů BALB/c a CcS-9 (není zde uvedena vazba na počet parazitů v uzlinách, protože tento znak nebyl u F₂ kříženců mezi BALB/c a CcS-16 testován) (HAVELKOVÁ, 2006, VLADIMIROV, 2003, moje výsledky).

Moje práce k těmto dvěma kontrolovaným znakům přidala ještě několik dalších - množství parazitů v lymfatických uzlinách, splenomegalii, velikost kožních lézí, hladinu IgE v krevním séru (rovněž viz. Obr.9) a spontánní *in vitro* proliferaci lymfocytů z infikovaných myší (u té byla vazba pouze u samic).

Hepatomegalie, splenomegalie, velikost kožních lézí v jednotlivých týdnech infekce i kinetika rozvoje kožních lézí, hladina IgE, IFN γ , IL-4 a IL-12 v séru, spontánní proliferace a množství parazitů ve slezině byly testovány jak u F₂ hybridů mezi kmeny CcS-9 a BALB/c, tak u F₂ hybridů mezi kmeny CcS-16 a BALB/c. Srovnáním polohy segmentů původu STS na 11. chromozomu kmenů CcS-9 a CcS-16 a kontrolovaných znaků můžeme upřesnit mapování lokusu *Lmr15*. Předně lze celý lokus *Lmr15* rozdělit na několik podlokusů, z nichž každý kontroluje jinou skupinu znaků.

Úsek na pozici minimálně 22-23 cM (maximálně 21-24 cM) kontroluje hladinu IFN γ v krevním séru (HAVELKOVÁ, 2006).

Oblast markeru D11Mit242 (pozice 31 cM) nekontroluje nic – neboť se zde kompletně liší vazby detekované u jednotlivých kmenů. Jako jediná by připadala v úvahu hepatomegalie, ovšem pouze za předpokladu, že u kmene CcS-9 interaguje s nějakým jiným genem v oblasti, který onu vazbu ruší.

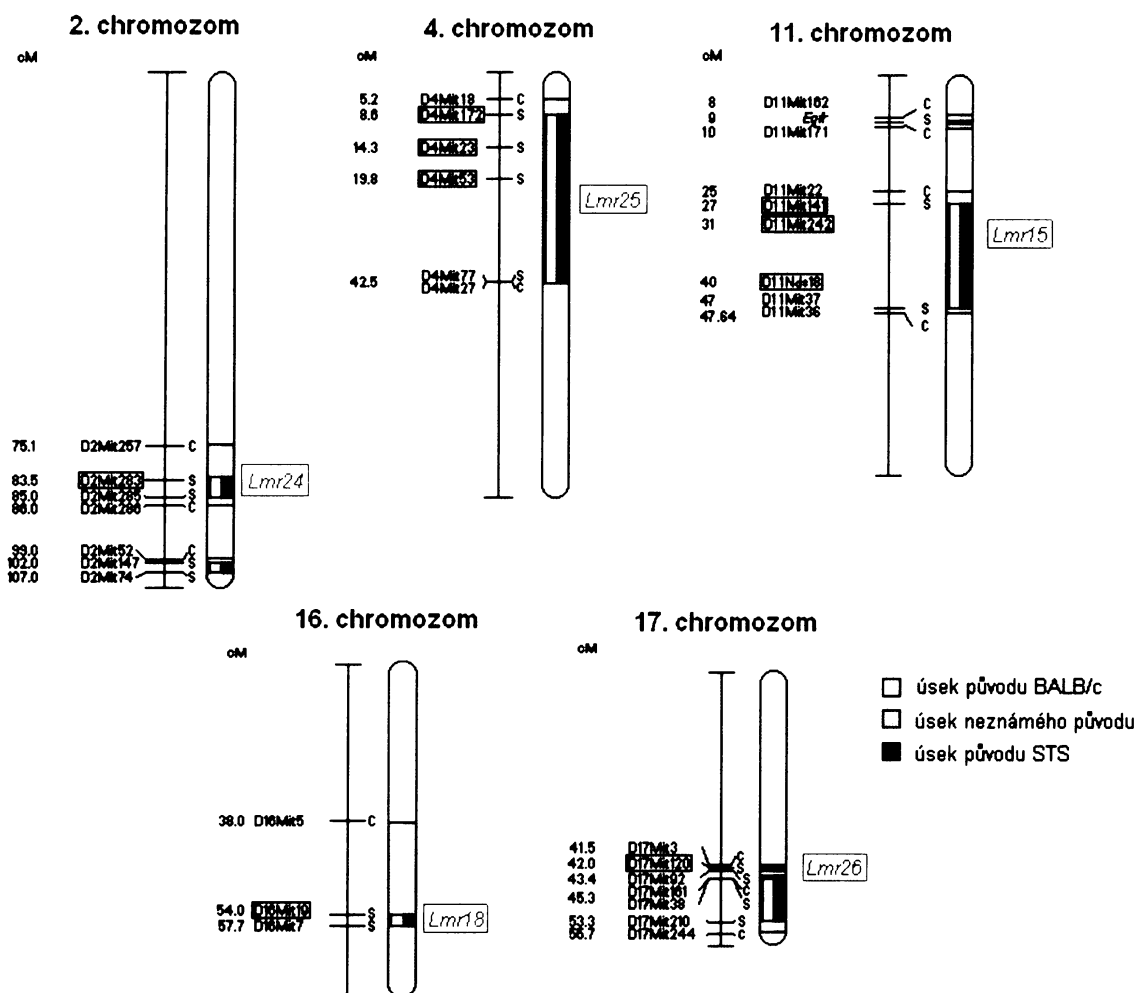
Vazba na množství parazitů v lymfatických uzlinách je omezena na proximální část lokusu, byla detekována pouze u markeru D11Mit141 u F₂ hybridů mezi kmeny BALB/c a CcS-9.

Vazba na hepatomegalii je naopak v distální části lokusu – byla detekována jak u CcS-9 (marker D11Nds18 na pozici 40 cM), tak u CcS-16 (marker D11Mit37 na pozici 47 cM, VLADIMIROV, 2003).

V rámci lokusu *Lmr15* se nacházejí geny pro iNOS (*Nos2*, „nitric oxide synthase 2“, inducibilní, WEI *et al.*, 1995) a pro řadu cytokinů a chemokinů, ale úsek je ještě příliš rozsáhlý na to, aby bylo možné vytypovávat nějaké konkrétní kandidátní geny. Nejprve ho bude nutno pomocí rekombinací zkrátit jen na několik málo cM, případně rozdělit na několik menších lokusů.

V oblasti *Lmr15* byly identifikovány i lokusy, které kontrolují odpověď proti dalším infekčním onemocněním (LIPOLDOVÁ a DEMANT, 2006). Konkrétně se jedná o infekce způsobené bakteriemi *Borrelia burgdorferi* (lokus *Bbaa4* – „*B.burgdorferi*-associated arthritis 4“, ROPER *et al.*, 2001, WEIS *et al.*, 1999) a *Salmonella typhimurium*

(lokusy *Ity3*, „immunity to *S. typhimurium* 3“, a *Ssta4*, „susceptibility to *S. typhimurium* antigens 4“, SEBASTIANI *et al.*, 1998, TREZENA *et al.*, 2002). *Lmr15* by tedy mohl být totožný s některým z těchto lokusů. Jinou možností je, že každou z těchto infekcí kontrolují různé geny, které se však na chromozomu nacházejí blízko sebe.



Obr. 10: Lokusy nalezené na F₂ hybridech mezi kmeny BALB/c a CcS-9. Rámečkem jsou označené ty markery, které mají vazbu k určitému fenotypovému znaku.

5.3.2. *Lmr18*

Lokus *Lmr18* byl objeven na 16. chromozomu na pozici 60 cM, kde kontroluje spontánní proliferaci lymfocytů z infikovaných myši *in vitro* (HAVELKOVÁ *et al.*, 2006). Mnou objevená vazba mezi markerem D16Mit19 a velikostí lézí, příp. počtem parazitů ve slezině by mohla do tohoto lokusu patřit. Marker D16Mit19 leží také na 16. chromozomu, ale na pozici 54 cM. Přesný vztah lokusu *Lmr18* a markeru D16Mit19 si vyžádá ještě další studium. V oblasti *Lmr18* se nachází mimo jiné gen *Ifngr2* (receptor pro IFN γ 2, SWIHART *et al.*, 1995).

Zbylé tři lokusy nebyly doposud ještě nikým publikovány. Těmito lokusy jsou *Lmr24*, *Lmr25* a *Lmr26* (viz. Tab.7., Obr. 10).

5.3.3. *Lmr24*

Lmr24 leží na druhém chromozomu. Nalezla jsem vazbu mezi markerem D2Mit283 na pozici 83,5 cM, a množstvím parazitů v lymfatických uzlinách. Okolo tohoto markeru byla ale příliš rozsáhlá oblast neznámého původu. Nalezla jsem si tedy v databázi e!Ensembl (www.ensembl.org) několik dalších markerů v okolí markeru D2Mit283 (konkrétně D2Mit257 na pozici 75.1 cM, D2Mit285 na pozici 86.0 cM a D2Mit286 na pozici 87.0 cM) a pomocí nich jsem zúžila rozsah oblasti neznámého původu pouze na úsek mezi 75.1 – 86.0 cM.

5.3.4. *Lmr25*

Lmr25 je na čtvrtém chromozomu. Je zde vazba mezi markery D4Mit172, D4Mit23 a D4Mit53 a několika znaky – velikostí kožních lézí, splenomegalií a hladinou IL-4 a IFN γ v krevním séru. Minimální velikost tohoto lokusu je mezi 8.6 – 19.8 cM, maximální 5.2 – 42.5 cM, je tedy značně rozsáhlý. *Lmr24* a *Lmr25* jsou příliš rozsáhlé na to, aby v nich mohly být vytypovány nějaké kandidátní geny.

Nejprve je bude nutno, podobně jako *Lmr15*, pomocí rekombinací zkrátit jen na několik málo cM.

5.3.5. *Lmr26*

Poslední objevený lokus, *Lmr26*, se nachází na 17. chromozomu. Je zde vazba mezi markerem D17Mit120 na pozici 42 cM a velikostí kožních lézí. Rozsah tohoto lokusu je minimálně 42.0 – 43.4 cM, maximálně 41.5 – 45.3 cM. *Lmr26* je tedy zapován s přesností 3.8 cM. Takové přesnosti lze obvykle dosáhnout pouze při rekombinantním mapování. Kandidátním genem v tomto lokusu byl mohl být gen *Xdh*, xanthin dehydrogenáza. Systém xanthin dehydrogenázy/xanthin oxidázy je v biologických systémech jedním z hlavních zdrojů volných radikálů. V literatuře bylo popsáno, že je tento enzym v aktivovaných makrofázích posttranskripčně inhibován oxidem dusnatým (RINALDO, 1994).

6. SOUHRN

V Laboratoři molekulární a buněčné imunologie jsem se během vypracování své diplomové práce podílela na jednom z projektů výzkumu, který se zabývá analýzou imunitní odpovědi u myši po infekci vnitrobuněčným parazitem *Leishmania major*. Cílem tohoto projektu je lokalizace genů, které tyto odpovědi kontrolují, a zjištění jejich funkcí.

Cílem mé práce bylo mapování genů, které kontrolují odpověď k *L. major* u kmene CcS-9 pomocí speciálního genetického modelu – kříženců rekombinantních kongenních myších kmenů, konkrétně F₂ hybridů mezi rodičovskými kmeny BALB/c a CcS-9.

Pomocí mikrosatelitních markerů jsem provedla genotypizaci F₂ hybridů. Tím jsem zjistila, které úseky genomů zdědili po kterém rodiči.

Dále jsem otestovala hladinu IgE a cytokinů IFN γ , IL-4, IL-10, IL-12 a IL-13 v krevním séru metodou ELISA.

Vytvořila jsem databázi, která obsahovala výsledky fenotypizace (výsledky mé a dále výsledky získané v dřívějších částech experimentu – splenomegalii, hepatomegalii, velikost kožních lézí, počty parazitů ve slezině a lymfatických uzlinách, spontánní proliferaci lymfocytů z infikovaných myši *in vitro*) a genotypizace. V programu NCSS jsem pomocí metody ANOVA provedla statistické vyhodnocení výsledků. Detekovala jsem několik vazeb. Po porovnání mých výsledků s výsledky předchozích studií jsem došla k závěru, že dva lokusy (*Lmr15* a *Lmr18*) již byly dříve popsány, ale rozšířila jsem u nich spektrum znaků, které kontrolují. Další tři lokusy, *Lmr24*, *Lmr25* a *Lmr26*, ještě nebyly v literatuře popsány.

Moje výsledky budou sloužit jako základ pro určení konkrétních genů, které se nacházejí v těchto lokusech a modifikují vnímavost k infekci *L. major* u myši. V těchto experimentech budou nejdříve nalezené lokusy zúženy pomocí myši nesoucích rekombinantní haplotypy ve studovaných lokusech. Dále budou vytypovány kandidátní geny a provedena jejich funkční analýza.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aitman, T.J., Heame, C.M., McAleer, M.A., Todd, J.A. (1991): Mononucleotide repeats are an abundant source of length variants in mouse genomic DNA. *Mamm Genome* **1**:206-210.

Alexander, J., Bryson, K. (2005): T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett* **99**:17-23.

Alexander, J., Satoskar, A.R., Russell, D.G. (1999): *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* **112**:2993-3002.

Awasthi, A., Mathur, R.K., Saha, B. (2004): Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* **119**:238-258.

Badalová, J., Svobodová, M., Havelková, H., Vladimirov, V., Vojtíšková, J., Engová, J., Pilčík, T., Volf, P., Demant, P., Lipoldová, M. (2002): Separation and mapping of multiple genes that control IgE level in *Leishmania major* infected mice. *Genes Immun* **3**:187-195.

Bailey, D.W. (1971): Recombinant-inbred strains. An aid to finding identity, linkage, and function of histocompatibility and other genes. *Transplantation* **11**:325-327.

Barbier, D., Demenais, F., Lefait, J.F., David, B., Blanc, M., Hors, J., Feingold, N. (1987): Susceptibility to human cutaneous leishmaniasis and HLA, Gm, Km markers. *Tissue Antigens* **30**:63-67.

Beebe, A.M., Mauze S., Schork, N.J., Coffman, R.L. (1997): Serial backcross mapping of multiple loci associated with resistance to *Leishmania major* in mice. *Immunity* **6**: 551-557.

Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., Sacks, D.L. (2002): CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* **420**:502-507

Brookes, A.J. (1999): The essence of SNPs. *Gene* **234**:177-186.

Courret, N., Fréhel, C., Gouhier, N., Pouchelet, M., Prina, E., Roux, P., Antoine, J.C. (2002): Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J Cell Sci* **115**:2303-2316.

Darvasi, A., Soller, M. (1995): Advanced intercross lines, an experimental population for fine genetic mapping. *Genetics* **141**:1199-1207.

DeBry, R.W., Seldin, M.F. (1996): Human/mouse homology relationships. *Genomics* **33**:337-351.

Demant, P., Hart, A.A. (1986): Recombinant congenic strains – a new tool for analyzing genetic traits determined by more than one gene. *Immunogenetics* **24**:416-422.

Demant, P. (2003): cancer susceptibility in the mouse: genetics, biology and implications for human cancer. *Nat Rev Genet* **4**:721-734.

Diamond, L.S., Herman, C.M. (1954): Incidence of trypanosomes in the Canada goose as revealed by bone marrow culture. *J Parasitol* **40**:195-202.

Dietrich, W.F., Katz, H., Lincoln, S.E., Shin, H.S., Friedman, J., Dracopoli, N.L., Lander, E.S. (1992): A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses. *Genetics*. **131**:423-447.

Dietrich, W.F., Miller, J., Steen, R., Merchant, M.A., Damron-Boles, D., Husain, Z., Dredge, R., Daly, M.J., Ingalls, K.A., Tara, J., O'Connorevans, Ch.A., Deangelis M.M., David, M., Levinsonkruglyak, L., Goodman, N., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Hawkins, T.L., Stein, L., Page, D.C., Lander, E.S. (1996): A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature* **380**:149-152.

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., Henson, P.M. (1998): Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory

cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *J Clin Invest* **101**:890-898.

Griffiths, W.A.D. (1987): Old World cutaneous leishmaniasis. In: The Leishmaniasis vol.II, Academic Press, Inc., London, 617-636.

Handman, E., Bullen, D.V.R. (2002): Interaction of *Leishmania* with host macrophage. *Trends Parasitol* **18**:332-334.

Havelková, H., Badalová, J., Svobodová, M., Vojtíšková, J., Kurey, I., Vladimirov, V., Demant, P., Lipoldová, M. (2006): Genetics of susceptibility to leishmaniasis in mice: four novel loci and functional heterogeneity of gene effects. *Genes Immun* **7**:220-233.

Iakoubova, O.A., Olsson, C.L., Dains, K.M., Ross, D.A., Andalibi, A., Lau, K., Choi, J., Kalcheva, I., Cunanan, M., Louie, J., Nimon, V., Machrus, M., Bentley, L.G., Beauheim, C., Silvey, S., Cavalcoli, J., Lusic, A.J., West, D.B. (2001): Genome-tagged mice (GTM): two sets of genome-wide congenic strains. *Genomics* **74**:89-104.

Kedzierski, L., Montgomery, J., Bullen, D., Curtis, J., Gardiner, E., Jimenez-Ruiz, A., Handman, E. (2004): A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3. *J Immunol* **172**: 4902-4906.

Kirkpatrick, C.E., Nolan, T.J., Farrell, J.P. (1987): Rate of *Leishmania*-induced skin-lesion development in rodents depends on the site of inoculation. *Parasitology* **94**:451-465.

Lainson, R., Shaw, J.J. (1987): Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, W., Killick-Kendrick E. (eds): The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Academic Press, London, p. 1-120.

Laird, P.W., Zijderveld, A., Linders, K., Runicki, M.A., Jaenisch, R., Berns, A. (1991): Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* **19**:4293.

Lander, E., Kruglyak, L. (1995): Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* **11**:241-247.

Lander, E.S., Schork, N.J. (1994): Genetic dissection of complex traits. *Science* **265**:2037-2048.

Laskay, T., van Zandbergen, G., Solbach, W. (2003): Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol* **11**:210-214.

Leiby, D.A., Kanessa-thasan, N., Scott, P., Nacy, C.A. (1994): Leishmaniasis. In: Parasitic infections and the immune system, Academic Press, Inc., London, p. 87-118.

Liew, F.Y., Li, Y., Millott, S. (1990): Tumor necrosis factor- α synergizes with IFN- γ in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* **145**:4306-4310.

Lipoldová, M., Demant, P. (2006): Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nat Rev Genet* **7**:294-305.

Lipoldová, M., Svobodová, M., Krulová, M., Havelková, H., Badalová, J., Nohýnková, E., Holáň, V., Hart, A.A., Volf, P., Demant, P. (2000): Susceptibility to *Leishmania major* infection in mice: multiple loci and heterogeneity of immunopathological phenotypes. *Genes Immun* **1**:200-206.

Lipoldová, M., Svobodová, M., Havelková, H., Krulová, M., Badalová, J., Nohýnková, E., Hart, A.A., Schlegel, D., Volf, P., Demant, P. (2002): Mouse genetic model for clinical and immunological heterogeneity of leishmaniasis. *Immunogenetics* **54**:174-183.

Mackay, T.F. (2001): Quantitative trait loci in *Drosophila*. *Nat Rev Genet* **2**:11-20.

Marx, J. (1996): *Leishmania* susceptibility puzzle gets another twist. *Science* **271**: 912-913.

Mitchell, G.F., Curtis, J.M., Scollay, R.G., Handman, E. (1981): Resistance and abrogation of resistance to cutaneous leishmaniasis in reconstituted BALB/c nude mice. *Aust J Exp Biol Med Sci* **59**: 539-544.

Moen, C.J., van der Valk, M.A., Snoek, M., van Zutphen, B.F., von Deimling, O., Hart, A.A., Demant, P. (1991): The recombinant congenic strains – a novel genetic tool applied to the study of colon tumor development in the mouse. *Mamm Genome* **1**:217-227.

Molyneux, D.H., Killick-Kendrick, R. (1987): Morphology, ultrastructure and life cycle. In: *The Leishmaniasis*, vol. I, Academic Press, Inc., London, 141-163.

Nadeau, J.H., Singer, J.B., Matin, A., Lander, E.S. (2000): Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains. *Nat Genet* **24**:221-225.

Peters, N., Sacks, D. (2006): Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev* **213**:159-179.

Reiner, S.L., Locksley, R.M. (1995): The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* **13**:151-177.

Reiner, S.L., Wang, Z.E., Hatam, F., Scott, P., Locksley, R.M. (1993): Th1 and Th2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis. *Science* **259**:1457-1460.

Ribeiro-Gomes, F.L., Otero, A.C., Gomes, N.A., Moniz-de-Souza, M.C.A., Cysne-Finkelstein, L., Arnholdt, A.C., Calich, V.L., Coutinho, S.G., Lopes, M.F., Ritting, M.G., Bogdan, C. (2000): *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today* **30**:679-687.

Rinaldo J.E., Clark, M., Parinello, J., Shepherd, V.L. (1994): Nitric oxide inactivates xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in interferon-gamma-stimulated macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* **11** (5):625-30

Roberts, L.J., Baldwin, T.M., Curtis, J.M., Handman, E., Foote, S.J. (1997): Resistance to *Leishmania major* is linked to the H2 region on chromosome 17 and to chromosome 9. *J Exp Med* **185**: 1705-1710.

Roberts, L.J., Baldwin, T.M., Speed, T.P., Handman, E., Foote, S.J. (1999): Chromosomes X, 9, and the H2 locus interact epistatically to control *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol* **29**:3047-3050.

Roberts, L.S., Janovy, J., Jr. (2000): Gerald D. Schmidt and Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology, 6th ed. McGraw-Hill Publishers, Dubuque, Iowa.

Roper, R.J., Weis, J.J., Mc Cracken, B.A., Green, C.B., Ma, Y., Weber, K.S., Fairbairn, D., Butterfield, R.J., Potter, M.R., Zachary, J.F., Doerge, R.W., Teuscher, C.: Genetic control of susceptibility to experimental Lyme arthritis is polygenic and exhibits consistent linkage to multiple loci on chromosome 5 in four independent mouse crosses. *Genes Immun* **2**:388-397.

Rose, K., Curtis, J., Baldwin, T., Mathis, A., Kumar, B., Sakthianandeswaren, A., Spurck, T., Low Choy, J., Handman, E. (2004): Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *Int J Parasitol* **34**:655-664.

Sacks, D., Noben-Trauth, N. (2002): The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* **2**:845-858.

Schork, N.J., Fallin, D., Lauchbury, J.S. (2000): Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet* **58**:250-264.

Sebastiani, G., Olien, L., Gauthier, S., Skamene, E., Morgan, K., Gros, P., Malo, D. (1998): Mapping of genetic modulators of natural resistance to infection with *Salmonella typhimurium* in wild-derived mice. *Genomics* **47**:180-186.

Swihart, K., Fruth, U., Messmer, N., Hug, K., Behin, R., Huang, S., Del Giudice, G., Aguet, M., Louis, J.A. (1995): Mice from a genetically resistant background lacking

the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4⁺ T cell response. *J Exp Med* **181**:961-971.

Tanksley, S.D. (1993): Mapping polygenes. *Annu Rev Genet* **27**:205-233.

Theodos, C.M., Ribeiro, J.M., Titus, R.G. (1991): Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect Immun* **59**:1592-1598.

Titus, R.G., Ribeiro, J.M. (1988): Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia lohngipalis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* **239**: 1306-1308.

Titus, R.G., Ribeiro, J.M. (1990): The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. *Parasitol Today* **6**:157-160.

Trezena, A.G., Souza, C.M., Borrego, A., Massa, S., Siqueira, M., De Franco, M., Sant'Anna, O.A. (2002): *Microbes Infect* **4**:1409-1415.

Vladimirov, V., Badalová, J., Svobodová, M., Havelková, H., Hart, A.A., Blažková, H., Demant, P., Lipoldová, M. (2003): Different genetic control of cutaneous and visceral disease after *Leishmania major* infection in mice. *Infect Immun* **71**:2041-2046.

Walton, B.C., Valverde, L. (1979): Racial differences in espundia. *Ann Trop Med Parasitol* **73**:23-29.

Wei, X.Q., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, G.J., Huang, F.P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S., Liew, F.Y. (1995): Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* **375**:408-411.

Weis, J.J., McCracken, B.A., Ma, Y., Fairbairn, D., Roper, R.J., Morrison, T.B., Weis, J.H., Zachary, J.F., Doerge, R.W., Teuscher, C. (1999): Identification of quantitative trait loci governing arthritis severity and humoral responses in the murine model of Lyme disease. *J Immunol* **162**:948-956.