

Abstrakt

Leishmanióza je opomíjené tropické onemocnění, které se řadí k nejzávažnějším zdravotnickým problémům. Je endemické v 98 zemích Asie, Afriky, Ameriky a Středomoří a postupně se šíří do nových oblastí včetně střední Evropy a USA. Klinické formy leishmaniózy zahrnují široké spektrum projevů od kožní leishmaniózy až po potenciálně smrtelnou viscerální leishmaniózu. V endemických oblastech je znám výskyt asymptomatických případů. Různé druhy leishmanií indukují různé symptomy, ale dokonce pacienti infikovaní stejným druhem parazita mohou projevovat různé symptomy onemocnění a různě reagovat na léčbu. Proto je jednou z velkých výzev vysvětlení pozorované variability, kterou nelze vysvětlit pomocí současně známých faktorů. Abychom našli nové faktory regulující leishmaniózu, testovali jsme úlohu molekul, o nichž je známo, že se účastní regulace jiných infekcí, a mapovali jsme lokusy kontrolující množství parazitů po infekci *L. major*. Také jsme determinovali kontrolu přežití po infekci virem klíšťové encefalitidy (TBEV) s cílem určit, zda existují společné prvky v odpovědi k *L. major* a TBEV.

Interferonem indukované GTPázy (guanylate-binding proteins, GBPs) hrají významnou úlohu v aktivaci inflamazómu a zprostředkovávají vrozenou rezistenci proti mnoha vnitrobuněčným patogenům. O jejich roli v leishmanióze je ale známo jen velmi málo. Fc γ receptor IV (FCGR4), receptor pro Fc fragment imunoglobulinu G (IgG), se podílí na efektorových funkcích imunitní odpovědi závislých na IgG2a a IgG2b. Pokusy s myšmi, které měly inaktivované jiné Fc γ receptory, ukázaly, že genetické pozadí hostitele určovalo jejich úlohu v odpovědi k parazitům a vedlo buď k rozvoji pretektivní imunity nebo k zhoršení projevů nemoci. Úloha FCGR4 v leishmanióze není známa.

Proto jsme studovali expresi mRNA pro *Gbp2b/Gbp1*, *Gbp5* a *Fcgr4* v kůži, inguinálních lymfatických uzlinách, slezině a játrech po infekci *L. major* a u neinfikovaných kontrol. Použili jsme dvě různé skupiny příbuzných myších kmenů, které byly klasifikovány na základě velikosti kožních lezí způsobených infekcí jako vysoce vnímavé (BALB/c, CcS-16), vnímavé (B10.O20), středně odolné (CcS-20) a rezistentní (STS, O20, B10, OcB-9, OcB-43).

Pozorovali jsme silné genetické ovlivnění hladin mRNA *Gbp2b/Gbp1* a *Gbp5*. Některé kmeny se lišily v expresi *Gbp2b/Gbp1* a *Gbp5* již před infekcí. Několik z nich se odlišovalo v expresi *Gbp2b/Gbp1* a/nebo *Gbp5*, přesto, že nesly stejné alely *Gbp2b/Gbp1* a/nebo *Gbp5*, což odhalilo trans-regulaci *Gbps*.

Infekce vedla k přibližně desetinásobné upregulaci mRNA *Gbp2b/Gbp1* a *Gbp5* v orgánech vnímavých i rezistentních kmenů a byla nejvíce výrazná v kůži. Ko-lokalizace proteinů GBP2b a parazitů *L. major* v kůži odolných a středně odolných kmenů, ale ne v kůži vysoce vnímavého kmene BALB/c naznačila, že tato molekula může mít úlohu v obraně proti leishmanióze.

Podobně jako ve studii exprese *Gbps* jsme pozorovali silné genetické ovlivnění hladin mRNA *Fcgr4* a také trans-regulaci exprese jak u neinfikovaných, tak u infikovaných myší. Infekce způsobuje v orgánech myších kmenů různou míru upregulace (až 50x) genu *Fcgr4* nazávisle na vnímavosti nebo rezistenci. Upregulace FCGR4 po infekci byla potvrzena imunohistochemicky. Srovnali jsme umístění parazitů a FCGR4 a zjistili jejich částečnou ko-lokalizaci. Tento náález naznačuje vztah této molekuly a odpovědi k infekci *L. major*.

Jak dochází k rozvoji viscerální leishmaniózy, která je bez léčby smrtelná, není dosud známo. Proto jsme analyzovali genetické ovlivnění počtu parazitů, jejich šíření do

vnitřních orgánů a následnou viscerální patologií. Určení počtu parazitů v lymfatických uzlinách, slezině a játrech infikovaných F₂ hybridů mezi kmenem BALB/c a rekombinantními kongenními kmeny CcS-9 a CcS-16 nám umožnilo popsat síti podobný soubor interagujících genetických lokusů, které kontrolují množství parazitů v různých orgánech. Zmapovali jsme dva nové lokusy, které determinují množství parazitů: *Leishmania major* response 24 a 27 (*Lmr24* a *Lmr27*). Také jsme detekovali roli v kontrole parazita u dříve popsaných lokusů *Lmr4*, *Lmr11*, *Lmr13*, *Lmr14*, *Lmr15* and *Lmr25* a *Lmr27* a popsali 8 genetických interakcí mezi nimi. *Lmr4*, *Lmr15*, *Lmr25* a *Lmr27* kontrolují množství parazitů v játrech a lymfatických uzlinách. Dále jsme zjistili, že množství leishmanií v lymfatických uzlinách, ale ne v játrech je ovlivněno *Lmr4* a *Lmr24*. Ve slezinách bylo množství parazitů kontrolováno *Lmr11* a *Lmr13*. Detekovali jsme silný vliv sexu na některé z popsaných genů.

V poslední části předkládané práce jsme studovali genetickou kontrolu vnímavosti k TBEV (virus klíšťové encefalitidy). Naše předchozí výsledky ukázaly, že kmen CcS-11, který nese 12,5% STS genomu na pozadí genomu kmene BALB/c, vykazuje vyšší vnímavost než rodičovské kmeny. Proto jsme připravili F₂ křížence mezi kmeny BALB/c a CcS-11 a provedli vazebnou a bioinformatickou analýzu. Tyto studie odhalily nový pravděpodobný lokus na myším chromozomu 7, který obsahuje 9 potenciálních kandidátních genů pro vnímavost k TBEV. Je zajímavé, že na myším chromozomu 7 byl u kmene CcS-11 mapován lokus *Lmr21*, který kontroluje vnímavost k *L. major*. Tento lokus je však zmapován na dlouhém chromozomálním úseku, takže za popsané účinky mohou být zodpovědné různé geny.

V souhrnu práce prezentuje nový vhled do odpovědi k parazitu *L. major*. Jako první popisuje roli genů *Gbps* a *Fcgr4* jako markerů zánětu způsobeného infekcí *L. major*. Naše výsledky také ukazují, že exprese *Gbps* a *Fcgr4* byla zvýšena dokonce v orgánech rezistentních myší, což může naznačovat skrytý zánět. Zbývá určit, zda klinicky asymptomatická infekce může představovat nebezpečí tím, že organismus disponuje k náchylnosti k dalším chorobám. Také jsme provedli první systematický celogenomový screening pro odhalení genů kontrolujících množství parazitů v savčích orgánech po infekci *L. major*. Ukázalo se, že tyto geny vnímavosti hostitele se vyznačují heterogenními účinky zahrnujícími orgánově-specifickou kontrolu, geny se samostatným účinkem, genové interakce a geny, jejichž vliv je vázaný na pohlaví.

Další hlubší charakterizace role genů *Gbps* a *Fcgr4* a přesné mapování nově identifikovaných lokusů podílejících se na kontrole množství parazitů po infekci leishmanií v různých orgánech může pomoci porozumět podrobným mechanismům nemoci a otevřít nové perspektivy výzkumu, léčby a vývoje vakcíny proti leishmanióze.