

**Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra biologických a lékařských věd**

**LNA sondy ve stanovení genového přepisu prasečích
cytokinů**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.

Školitel specialista: Doc. MVDr. Vladimír Celer, PhD.

Hradec Králové, 2008

Ing. Igor Šplíchal, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci „LNA sondy ve stanovení genového přepisu prasečích cytokinů“ vypracoval samostatně. Veškerá literatura a zdroje, které jsem při zpracování použil, jsou uvedené v seznamu literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové, dne 1.9. 2008

Podpis:

PODĚKOVÁNÍ:

Děkuji vedoucímu práce PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. za odborné vedení a doc. MVDr. Vladimíru Celerovi, PhD. za cenné rady.

Děkuji za spolupráci všem svým kolegům a spolupracovníkům, zvláště Iljovi Trebichavskému (RNDr., CSc.), Alle Šplíchalové (MUDr., PhD.), Martinu Schwarzerovi (Mgr.) – kolegům z Mikrobiologického ústavu AVČR v Novém Hrádku, dále zahraničním kolegům a dlouholetým spolupracovníkům v oblasti cytokinů prasete Yasuyuki Morimu (DVM, PhD.) a Yoshihiro Munetovi (DVM, PhD.) z National Institute of Animal Health v Tsukubě v Japonsku. Velice si vážím a děkuji za skvělou práci a pomoc při získávání a zpracovávání vzorků technickým pracovnícím - Marii Zahradníčkové, Janě Machové (Bc.) a Jarmile Jarkovské z Mikrobiologického ústavu AV ČR v Novém Hrádku.

Dále děkuji i zbylým příslušnicím své rodiny za podporu, trpělivost a toleranci.

Práce byla vypracována v rámci grantu Grantové agentury České republiky č. 523/07/0572 „Modulace přirozené složky imunitní odpovědi probiotickými bakteriemi“ a institucionálního záměru Mikrobiologického ústavu AV ČR AVOZ 5020510.

Obsah

1.	Úvod.....	9
2.	Literární přehled.....	11
2.1.	Polymerázová řetězová reakce – PCR (Polymerase Chain Reaction).....	11
2.2.	Reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce	11
2.3.	Izolace RNA	11
2.4.	Reverzní transkripce.....	12
2.5.	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase – real time PCR	13
2.5.1.	Metody nespecifické fluorescence v real time PCR	13
2.5.2.	Metody specifické fluorescence v real time PCR	14
2.5.3.	LNA sondy.....	17
2.6.	Cytokiny, kaspáza 1 a kontrolní (housekeeping) geny.....	18
2.6.1.	Interleukin 1 α (IL-1 α).....	18
2.6.2.	Interleukin 1 β (IL-1 β).....	18
2.6.3.	Interleukin 4 (IL-4).....	18
2.6.4.	Interleukin 6 (IL-6).....	19
2.6.5.	Interleukin 8 (IL-8).....	19
2.6.6.	Interleukin 10 (IL-10).....	19
2.6.7.	Interleukin 12/23 p40 (IL-12/23 p40).....	19
2.6.8.	Interleukin 18 (IL-18).....	19
2.6.9.	Interferon γ (IFN- γ)	20
2.6.10.	Faktor nekrotizující nádory α (TNF- α)	20
2.6.11.	Kaspáza 1 (ICE, IL-1 β invertáza).....	20
2.6.12.	β -aktin	20
2.6.13.	GAPDH.....	20
2.6.14.	Cyklofilin.....	20
2.7.	Prasečí gnotobiotický model.....	21

3.	Cíl práce	22
4.	Materiál a metody	23
4.1.	Bakteriální kultury	23
4.2.	Vzorky tkání.....	23
4.3.	Izolace celkové RNA a kontrola její kvality.....	24
4.3.1.	Izolace celkové RNA	24
4.3.2.	Stanovení koncentrace a čistoty celkové RNA	25
4.4.	Syntéza cDNA.....	25
4.5.	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	27
4.6.	Elektroforéza v agarózovém gelu.....	28
4.7.	Další přístroje, pomůcky a použitý software.....	28
5.	Výsledky	29
5.1.	Izolace celkové RNA a syntéza cDNA	29
5.2.	Návrh LNA sond a odpovídajících primerů.....	29
5.3.	Potvrzení specifity ampliconu elektroforézou v agarózovém gelu.....	32
5.4.	Aplikace metody	32
6.	Diskuze.....	34
7.	Závěr	37
8.	Zkratky, odborné termíny a klíčová slova	38
9.	Použitá literatura	40
10.	Přílohy	43

SOUHRN

Cytokiny jsou molekuly mezibuněčné komunikace. Jsou redundantní, tj. překrývající se ve svém působení a pleiotropní tj. vykazující různý účinek na různé buněčné populace. To vše ale vede ke složitosti cytokinové sítě a její regulace. Při bakteriálních infekcích jsou mechanismy obranných reakcí regulovány zánětovými cytokiny. Při těchto infekcích často dochází k nadprodukcí cytokinů tzv. cytokinové bouři, která má za následek multiorgánové poškození (MODS).

Pro studium regulačních mechanismů cytokinové sítě je vhodné provést analýzu na úrovni aktivace genového přepisu, sekrece cytokinu a produkce biologicky aktivního cytokinu, což umožňují např. metody RT-PCR, ELISA a bioassay. V posledních letech se však od bioassaye upouští pro jeho pracnost a menší specifčnost, která může být právě odrazem pleiotropního působení cytokinů. V předložené práci jsme vypracovali novou metodu stanovení sedmi zánětových cytokinů (IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 a IL-12/23 p40), kaspázy 1 a kontrolních (housekeeping) genů (β -aktinu, GAPDH a cyklofilinu) za pomoci LNA (Lock Nucleic Acid) sond kdy jsme vybrali vhodné nukleotidové sekvence, navrhli LNA sondy s primery, potvrdili specifitu amplikonu elektroforézou a na malém počtu vzorků vyzkoušeli použitelnost metody. Na závěr jsme navrhli další postup pro zdokonalení, potvrzení specifity metody a možnosti kontroly dalších zánětových cytokinů (IL-18, IFN- γ a TNF- α), jejichž amplikony neodpovídaly svou velikostí.

SUMMARY

Cytokines are molecules of cell communication. They are redundant, i.e. congruous in some effects and pleiotropic, what means that they have different effect in different cell populations. These properties lead to the complexity of cytokine net and its regulations. In the course of bacterial infections, mechanisms of defence are regulated by inflammatory cytokines. Severe infections may cause overproduction of inflammatory cytokines or so called cytokine storm leading to multiorgan dysfunction syndrome (MODS).

Gene transcription, measuring of protein secretion and production of biologically active molecules are the main methods used in studies of cytokine regulations. These methods are RT-PCR, ELISA and bioassay. The latter method is, however, abandoned, for its labouriosness and lower specificity, which on the other side can be a wittness to pleiotropic effect of cytokines. In this work, we have developed the method of the detection of seven inflammatory cytokines (interleukin-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12/23 p40), caspase 1 and three housekeeping genes: β -aktin, GAPDH and cyklofilin using the LNA (Lock Nucleic Acid). Relevant nucleotide sequences were chosen, LNA probes with primers were designated, specificity of amplicons was confirmed by the electrophoresis and efficiency of the method was proven in small number of biological samples. Finally, next steps for further improvement and for the confirmation of method specificity were proposed and a possibility of a detection of other inflammatory cytokines (IL-18, interferon gamma and tumor necrosis factor alpha) the amplicons of which did not correspond with a predicted size.

1. ÚVOD

Cytokiny jsou molekuly zprostředkovávající mezibuněčnou komunikaci. Uplatňují se při různých fyziologických stavech probíhajících během celé ontogeneze organismu, jako jsou např. nidace, buněčná diferenciaci, spouštění porodu apod. nebo při obranných reakcích jako je např. zánětová reakce. Nadprodukce cytokinů však může vést k poškození organismu, případně způsobit jeho smrt, jako je to známo např. u septického šoku. Znalost regulačních mechanismů cytokinů a jejich možné ovlivnění jsou proto důležité pro prevenci onemocnění a léčbu člověka a zvířat.

Stanovení produkce cytokinů je možno provádět na různých úrovních. Optimální by bylo 1) stanovení genového přepisu, 2) stanovení množství proteinu a 3) stanovení množství biologicky aktivního proteinu. Příklady kvantitativního stanovení cytokinů na těchto jednotlivých úrovních jsou metody ad 1) reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce (PCR), ad 2) ELISA a ad 3) použití buněčné linie a cytokin-specifických neutralizačních monoklonálních protilátek [1]. V posledních letech je velice populární stanovení genového přepisu metodou reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce v reálném čase [2, 3].

V PCR v reálném čase jsou používány buď metody kdy je intenzita fluorescence přímo úměrná množství dvouřetězové deoxyribonukleové kyseliny (dsDNA) nehledě na její sekvenci nebo metody využívající sekvence-specifické sondy značené fluorochromy (hydrolyzační, hybridizační a jiné) nebo další přístupy zvyšující specifickou metodu jako jsou například fluorochromy značené primery (LUX, BD QZyme primery apod.) .

Prase (*Sus scrofa*) je hospodářsky významné zvíře. Pro svou výrazně vyšší podobnost člověku ve srovnání s běžně používanými laboratorními hlodavci je i významným laboratorním modelem. Na pracovišti Mikrobiologického ústavu AV ČR je miniaturní prase využíváno jako model antiinfekční imunity již od 50. let minulého století. Zhruba stejnou dobu pracují s modelem miniaturního prasete také v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Liběchově (v současnosti např. pracovní skupina RNDr. Horáka – melanom). Kromě těchto pracovišť je biologický model prasete dlouhodobě využíván v České republice také Fakultou vojenského zdravotnictví Univerzity obrany (MVDr. Špelda) a Ústavem veterinární medicíny (MVDr. Faldyna). V posledních letech zájem o prase jako biologický model výrazně roste a začínají s ním pracovat i pracovní skupiny, které se dříve orientovaly výhradně na inbrední kmeny laboratorních hlodavců

(Doc. Holáň, ÚMG AV ČR). Prase je doceňováno jako biologický model především v transplantační chirurgii – pracovní skupina MUDr. Oliveriuse (IKEM) a pro septické stavy (MUDr. Kieslichová, IKEM).

Ústředním tématem předložené práce je metoda RT-PCR v reálném čase pro stanovení genového přepisu (mRNA) prasečích zánětových cytokinů IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12/23 p40, IL-18, IFN- γ a TNF- α , kaspázy 1 a kontrolních (housekeeping) genů. V metodě jsou použity LNA (lock nucleic acid) sondy vyvinuté firmou Exiqon a v komerčním systému nabízené firmou Roche Diagnostics.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Polymerázová řetězová reakce – PCR (Polymerase Chain Reaction)

Metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) byla vyvinuta K. Mullisem a jeho spolupracovníky v polovině 80. let minulého století [4-6]. Základním principem PCR je selektivní amplifikace libovolné sekvence nukleové kyseliny přítomné v reakční směsi v cyklickém procesu střídání teplot. Tento proces vede k mnohonásobnému zvýšení počtu kopií vybrané sekvence DNA až se dosáhne množství umožňující DNA detekovat nebo analyzovat. Objev a následné využití PCR se stalo naprosto výjimečným objevem, který nejen zavedl molekulárně genetické metody do celých oblastí biologie, ale vytvořil řadu nových oborů (paleomikrobiologie, forensní DNA diagnostika apod.). Za tento objev obdržel K. Mullis v r. 1993 Nobelovu cenu za chemii.

PCR je prováděna na základě templátové (matricové) DNA, která může být jedno nebo dvouvláknová, v teplotních cyklech, které jsou většinou 95°C jako denaturační teplota (odděluje DNA vlákna od sebe), anelační teploty obvykle v rozmezí 50 - 60°C (primery přisednou k templátové DNA) a syntézy probíhající při 72°C a spočívající v prodlužování primerů o nukleotidy komplementární k templátové DNA. Jedná se většinou o tzn. end point analýzu nebo semikvantitativní stanovení, kdy jsou produkty reakce většinou hodnoceny elektroforeticky v agarózovém gelu srovnáváním velikosti amplikonu s markery molekulových hmotností. Potvrzení specifičnosti při metodickém zavádění reakce je většinou prováděno sekvenací (určováním sledu nukleotidů) amplikonu [7, 8].

2.2. Reverzní transkripce a polymerázová řetězová reakce

2.3. Izolace RNA

Pravděpodobně historicky nejstarší rozšířenou metodou používanou i v současnosti je fenol chloroformová extrakce [9]. Principem metody je precipitace a extrakce guanidinisothiokyanátem

(GITC) v acetátovém pufru po přidání chloroformu, dále precipitace RNA obsažené ve vodné fázi v isopropylalkoholu a promytí pelety RNA v etanolu. Výsledkem je izolovaná celková RNA. Nejznámější komerční izolační směs tohoto typu je pravděpodobně Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA). Obdobné izolační směsi používají i další firmy pod různými komerčními názvy např. TRIR (ABgene, Epsom, UK) a RNA Blue (Top-Bio, Praha, ČR). Protože jsou fenol a chloroform toxické látky, jsou zavedeny některé modifikace této extrakčně-precipitační metody využívající reagentie zdraví podstatně méně škodlivé – např. Aqua pure RNA Isolation Kit (Bio-Rad, Hercules, USA) obsahující GITC, kyselinu citrónovou a sodium dodecil sulfát.

V poslední době se používají především kity s kolonami, kde je izolována RNA na různě modifikovaných sorbentech na snížení kontaminace preparátu RNA genomovou DNA a to buď dodatečným ošetřením DNázou - např. Nucleo Spin II kit (Macherey–Nagel, Důren, SRN) nebo bez něj – např. RNA Mini Elute Plus kit (Qiagen, Hilden, SRN). Modifikací nosičů je možné izolovat namísto celkové RNA také přímo mRNA. Kvalita izolované RNA má prvořadý význam pro následující reakce, a proto je různým metodám izolace RNA zabezpečující integritu RNA věnována velká pozornost [10, 11].

2.4. Reverzní transkripce

Základem pro RT-PCR v reálném čase jsou RNA sloužící jako templát pro reverzní transkripci (syntézu cDNA). Pro reverzní transkripci, tedy přepis mRNA do komplementární DNA (cDNA) sloužící jako templát pro PCR jsou používány především reverzní transkriptázy ptačího viru - AMV (Avian Myeloblastosis Virus) a myšího viru - MLV (Moloney Leukemia Virus). Tyto reverzní transkripce se většinou provádějí komerčními kity, které využívají AMV nebo MLV reverzní transkriptázy nebo kombinaci obou těchto reverzních transkriptáz. Pro zahájení zpětné transkripce a syntézy komplementárního řetězce je nutno použít primery, tj. krátké oligonukleotidy, které se používají jako náhodné n-mery (např. nonamery), oligo d(T)_n (např. oligo d(T)₁₈) nebo specifické primery. Náhodně n-mery hybridizují na náhodně komplementární sekvenci v průběhu RNA, oligo d(T)_n hybridizují na poly (A⁺) konec RNA a specifické primery hybridizují se sekvencí zájmu [2]. Součástí kitů bývají také inhibitor RNáz, směs oligonukleotidů a voda v kvalitě vhodné pro PCR.

2.5. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase – real time PCR

Původní PCR však má své limitace a to především nemožnost určit výchozí množství DNA po proběhnutí celého cyklického procesu, protože často dochází k syntéze DNA ve velkém nadbytku. Toto bylo řešeno různými semikvantitativními modifikacemi PCR např. použitím tzn. kompetitorů [12, 13]. Tento nedostatek vyřešili v r. 1992 Higuchi se spolupracovníky vyvinutím polymerázové řetězové reakce v reálném čase - real time PCR [14]. Při real time PCR vstupuje do reakce molekula fluorochromu a je průběžně zaznamenávána fluorescence, která je přímo úměrná množství DNA v době záznamu. Snímání fluorescenčního signálu umožňují termocyklery s modulem pro detekci fluorescence. Zvyšování fluorescence je většinou snímáno po každém proběhnutém cyklu. Předností této metody je to, že ve srovnání s „end point“ metodami umožňuje určit množství výchozí DNA, která byla použita jako templát pro následnou amplifikaci. V kombinaci s reverzní transkripcí kdy je nejdříve přepsána mRNA do cDNA je potom možné určit množství původně přítomné mRNA jako měřítka aktivace genového přepisu [3, 15].

Fluorescence bývá využívána ve dvou hlavních systémech. Jednak jsou to DNA vázající fluorochromy využívající na sekvenci nezávislé (nespecifické) a jednak fluorochromy značené specifické sekvence nukleotidů [16, 17].

2.5.1. Metody nespecifické fluorescence v real time PCR

SYBR Green I (Invitrogen) se váže nespecificky na dvouvláknovou DNA (double strand DNA – dsDNA). SYBR Green I vykazuje nízkou fluorescenci, je-li nenavázaná v reakční směsi. Při vazbě k dsDNA dochází až k 1000 násobnému zvýšení fluorescence a výsledný signál je úměrný množství přítomné dsDNA, čehož se využívá ke kvantifikaci dsDNA. Specifičnost systému je možné ověřit pomocí křivky tání (melt point curve). Křivka tání je konstruována tak, že se teplota zvyšuje v malých skocích, při kterých dochází ke snižování fluorescence vzhledem ke snižování podílu dsDNA. Negativní první derivace změny fluorescence je zaznamenávána jako funkce teploty. Hlavní charakteristikou je teplota T_m tj. teplota kdy 50 % DNA duplexu je rozděleno [17-19].

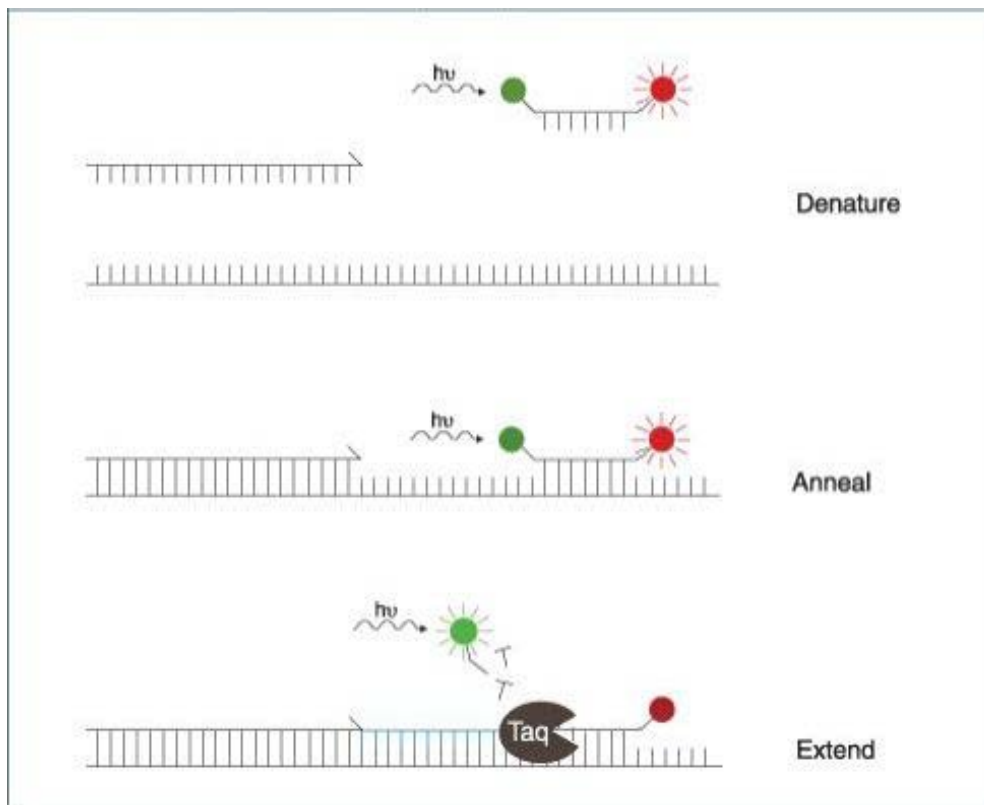
Výhodou této metody je to, že je aplikovatelná na stávající systém primerů end point metody a jednoduchost návrhu primerů. Nevýhodou SYBER Greenu I a podobných interkalačních fluorochromů je to, že není možné rozlišit fluorescenci odpovídající různým ampikonům a není tedy tento systém použitelný pro multiplexové stanovení.

Dalšími interkalačními fluorochromy používanými pro real time PCR jsou např. SYBER Green Gold (Invitrogen) a Eva Green (Biotium, Hayward, USA). Eva Green má ve srovnání se SYBR Green podle údajů výrobce některé výhody jako jsou nižší inhibice PCR reakce, není cytotoxická ani mutagenní (standardní Ames test), vyšší citlivost, vyšší teplotní a hydrolytická stabilita a nižší citlivost na vystavení světlu [20].

2.5.2. Metody specifické fluorescence v real time PCR

Sondy nebo primery o známých sekvencích jsou značeny fluorochromy a ke zvyšování fluorescence dochází pouze v přítomnosti specifického produktu.

Pravděpodobně nejrozšířenější jsou hydrolyzační sondy **TaqMan**. Jedná se o fluorescenčně značené oligonukleotidy (25-35 nukleotidů). Systém TaqMan sond doplňují sekvence specifické primery. TaqMan systém využívá 5'- exonukleázovou aktivitu termostabilních DNA polymeráz jako jsou např. Taq nebo Tth DNA polymerázy. Sonda obsahuje na svém 5' konci fluorescenční reportér a na 3' konci zhášec (quencher). Sonda se hybridizuje se svou cílovou sekvencí a dsDNA specifická 5'→3' exonukleázová aktivita Taq nebo Tth DNA polymerázy odštěpí reportér. Reportér takto vzdálený od zhášec výrazně zvýší svou fluorescenci a tento signál je úměrný množství amplifikovaného produktu. Většinou je používán jako reportér fluorescein (FAM) a v kombinaci s ním zhášec „Black Hole Quencher 1“ (BHQ1) [16, 18, 19].



Výhodou TaqMan systému je vysoká speciřičnost, vysoký poměr signál/řum a možnost vytvoření multiplexového systému za použití různých systémů reportér-zhášeeř. Nevýhodou jsou vysoké počáteční náklady a složitost návrhu systému.

Dalřím poměrně rozřířeným systémem je **Molecular Beacon**. Značené oligonukleotidy (25-40 nukleotidů), které tvoří vlásenku s „kmenem“ a „smyčkou“. Fluorochrom je navázaný na 5' konec a zhášeeř na 3' konec. Smyčka je navržena tak, aby hybridizovala specificky s 15-30 nukleotidovou cílovou sekvencí. Na každém konci smyčky jsou nukleotidové sekvence 5-6 nukleotidů, které jsou navzájem komplementární a vzájemnou hybridizací tvoří „kmen“, který způsobí, že se fluorochrom a zhášeeř dostanou k sobě. Při této vlásenkové struktuře tedy není řádný (nebo je nízký) fluorescenční signál. Když se během anelace (nasednutí) rozvolní vlásenková struktura, dostane se fluorochrom od zhášeeře a dojde k výraznému zvýšení fluorescence. Na rozdíl od systému TaqMan jsou molecular beacons odstraňovány, ale ne hydrolyzovány jako sondy TaqMan, protože jsou používány DNA polymerázy bez 5' exonukleázové aktivity. Molecular beacon jsou vysoce specifické sondy a mohou být použity pro multiplexové stanovení. Jejich velkou nevýhodou je složitost navrhování [18, 19].

Hybridizační sondy - jedná se o dvě specifické sondy a dva primery. Obě sondy jsou navrženy tak, aby se hybridizovaly na sousední úseky DNA řetězce. První sonda je konjugována s donorem fluorescence na svém 3' konci a druhá sonda nese akceptor fluorescence na svém 5' konci. Donor a akceptor jsou voleny tak, aby emisní spektrum donoru překrývalo excitační spektrum akceptoru. Excitace je provedena při vlnové délce specifické pro donor a reakce je zaznamenávána jako emise při vlnové délce akceptoru. Sondy se k sobě přibližují během anelace a zvyšuje se fluorescence, která je úměrná množství přítomného amplikonu [18, 19].

Systém **Eclipse sond** se skládá ze sondy a dvou primerů. Sonda má komplementární sekvenci k amplikonu a má na 3' fluorochrom a na 5' konci zhášec. Zároveň má také strukturu, která udržuje fluorochrom a zhášec u sebe (minor groove binder - mgb). Během anelace hybridizuje k cílové sekvenci za pomoci mgb. V linearizované sondě se od sebe vzdálí fluorochrom a zhášec, což se projeví zvýšením fluorescence, která je úměrná množství amplikonu [18, 19].

Amplifluor se skládá se ze dvou primerů a jednoho primeru zvaného UniPrimer. První cílová sekvence obsahuje 5' začínající sekvenci je nazývá se Z sekvence. Tato sekvence je také na 3' konci UniPrimeru. UniPrimer vytváří vlásenkovou strukturu. Fluorochrom a zhášec jsou na 5' a 3' konci kmenové struktury. Ve vlásenkové konformaci jsou fluorochrom a zhášec v těsné blízkosti a nedochází k výrazné fluorescenci. Během prvního amplifikačního cyklu první primer hybridizuje s templátem a je syntetizováno vlákno DNA. Ve druhém amplifikačním cyklu je druhý primer použit pro syntézu nového cílového templátu, který obsahuje sekvenci, která je komplementární k Z sekvenci. Produkt druhého amplifikačního kroku je zároveň templátem pro UniPrimer. Ve třetím amplifikačním kroku slouží UniPrimer jako templát a ve čtvrtém cyklu prodloužení templátu přes vlásenkovou oblast UniPrimeru způsobí, že se UniPrimer otevře a zaujme lineární konfiguraci a zvýší se fluorescence [18, 19].

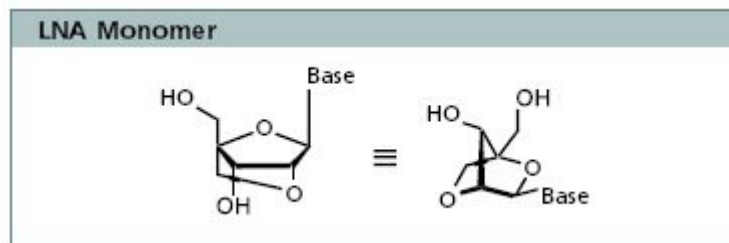
Jeden ze dvou primerů systému **LUX primerů** má vlásenkovou strukturu a fluorochrom blízko 3' konci. V průběhu amplifikace se LUX primer linearizuje a je začleněn do produktu. Tím se vzdálí fluorochrom od zhášec a dojde ke zvýšení fluorescence [18, 19].

Dalšími systémy používanými pro PCR v reálném čase jsou **LightUp sondy**, **Scorpion primery**, **QZyme primery** a další [18, 19].

2.5.3. LNA sondy

LNA sondy jsou hydrolyzační sondy založené na principu systému TaqMan. Jedná se o 165 sond pro člověka a vybrané organismy (člověk, primáti, myš, potkan, drosophila, *C.elegans*, *Arabidopsis*, *E.coli*). Pro jednotlivé druhy je určena sada 90 sond pokrývající 95-99% transkriptomu vybraného organismu [21].

Na rozdíl od systému TaqMan používající 25-35 nukleotidové sondy jsou LNA sondy výrazně kratší (8-9 nukleotidů). Toto výrazné zkrácení sond je umožněno začleněním jednoho nebo více modifikovaných nukleotidů do sekvence sondy. Nukleotidy jsou modifikovány tak, že je mezi 2'-O a 4'-C methylenový můstek, který je v 3'-endo konformaci a mění flexibilní ribofuranosový kruh na rigidní bicyklickou strukturu. Tato struktura zlepšuje hybridizační vlastnosti sondy a její biologickou stabilitu.



LNA monomer může zvyšovat T_m až o 8°C na jeden LNA monomer zařazený do struktury sondy. To výrazně rozšiřuje možnosti assaye pro optimalizaci T_m a tím i hybridizační specifitu a dále pro multiplexovou analýzu. Zvýšením stability a specifity se snižuje pozadí fluorescence způsobené nespecifickou vazbou sondy a zvyšuje se poměr signál/šum [19, 21].

Díky krátkým sondám v kombinaci s primery, které určují místo hybridizace na templátu dokáže každá sonda rozlišit u člověka okolo 7000 transkriptů, či jeden transkript může být detekován 16 různými sondami z 90 sondové sady. Systém LNA sond vyvinula dánská firma Exiqon a komercializovány byly firmou Roche Diagnostic (Manheim, SRN) [21]. Potřebný software pro výběr sond a návrh primerů je volně k použití na webových stránkách firmy Roche - www.universalprobelibrary.com [22]. V případě člověka, primátů, myši a potkana je možné rozlišení oblastí exonů a intronů a navržení sond tak, aby překrývaly nukleotidové sekvence dvou sousedních exonů a eliminovat tak možnou amplifikaci templátu genomové DNA v PCR. V případě jiných druhů, např. prasete je možné polohu exonů a intronů zadat manuálně.

2.6. Cytokiny, kaspáza 1 a kontrolní (housekeeping) geny

Působení cytokinů je pleiotropní (jeden cytokin má více funkcí) a redundantní (cytokin je ve svém účinku zastupitelný jiným nebo jinými cytokiny). Je proto velice obtížné sestavit jednoduchou tabulku s popisem produkujících buněk a buněk na něž cytokin působí jako na cílové a vlastní funkci cytokinu. V uvedeném přehledu jsou proto uvedeny tyto údaje nevyčerpávajícím způsobem.

Jedním ze systémů klasifikace cytokinů je rozdělení na Th1 a Th2 cytokiny. Toto dělení platné pro člověka však nemusí plně platit pro různé zvířecí druhy, a proto se jím nebudeme zabývat. Naším zájmem je anti-infekční imunita a zánětové cytokiny, kde i u různých druhů savců je jejich funkce a regulace podobná. Z nich to jsou:

2.6.1. Interleukin 1 α (IL-1 α)

Produkující buňky: Hlavně monocyty a makrofágy, ale také další buněčné typy (jako u IL-1 β). Cílové buňky: leukocyty, Leydigovy buňky, endotel. Funkce: prozánětový cytokin, myelopoeza, regulace imunitní odpovědi [23].

2.6.2. Interleukin 1 β (IL-1 β)

Produkující buňky: většina buněk organismu, zejména výstelek (enterocyty, endotel, keratinocyty, mesotel, urogenitální výstelky, ependym), pojiv (fibroblasty, hladké svalové buňky, osteoblasty), imunitního systému (zejména makrofágy, dendritické buňky, neutrofilny, lymfocyty T, B a NK, trombocyty). Cílové buňky: zejména lymfocyty, ale také buňky přirozené imunity a ovlivňuje také buňky neuroendokrinního systému. Funkce: významný systémový cytokin regulačních soustav organismu, cytokin zánětu, časný cytokin produkovaný inflammasomem, endogenní pyrogen, indukce ACTH a dalších mediátorů, aktivace imunitních buněk (TH, B), chemoatraktant, induktor proteinů akutní fáze aj. [23].

2.6.3. Interleukin 4 (IL-4)

Produkující buňky: zejména TH2 lymfocyty. Cílové buňky: zejména B lymfocyty. Funkce: stimulace, proliferace a diferenciacie B buněk, protekce před jejich smrtí a schopnost jejich

prezentace antigenů T buňkám, indukce isotopového přesmyku tvorby IgG1 a IgE, inhibice tvorby IL-1, IL-6 a TNF (tzv. protizáněťový TH2 cytokin) a indukce cytokinů IL-5 a IL-10 [23].

2.6.4. Interleukin 6 (IL-6)

Produkující buňky: makrofágy, granulocyty, lymfocyty, fibroblasty, chondrocyty, keratinocyty. Cílové buňky: T a B lymfocyty, makrofágy. Funkce: diferenciacie B buněk, reakce akutní fáze [23].

2.6.5. Interleukin 8 (IL-8)

Produkující buňky: monocyty, makrofágy, keratinocyty, endotel, enterocyty, fibroblasty, chondrocyty. Cílové buňky: neutrofilů, lymfocyty a další buňky. Funkce: chemoatraktant a aktivátor neutrofilů [23].

2.6.6. Interleukin 10 (IL-10)

Produkující buňky: T regulační a TH lymfocyty. Cílové buňky: leukocyty a řada dalších buněk. Funkce: inhibice prozáněťových cytokinů IL-1, IL-6 a TNF, diferenciacie B lymfocytů, regulace funkcí leukocytů, keratinocytů a endotelu [23].

2.6.7. Interleukin 12/23 p40 (IL-12/23 p40)

Produkující buňky: lymfocyty. Cílové buňky: lymfocyty. Funkce: proliferace lymfocytů, indukce interferonu gama [23].

2.6.8. Interleukin 18 (IL-18)

Produkující buňky: makrofágy, dendritické buňky, keratinocyty, endotel, epitel mléčné žlázy, žírné buňky, plodové blány. Cílové buňky: makrofágy, neutrofilů, lymfocyty, endotel, hladké svalové buňky. Funkce: produkt inflamasomu, raný záněťový cytokin, induktor interferonu gama, regulace zánětu (indukce pro- i protizáněťových cytokinů), významný v antibakteriální imunitě [23].

2.6.9. Interferon γ (IFN- γ)

Produkující buňky: lymfocyty (zejména T a NK). Cílové buňky: leukocyty (zejména monocyty).
Funkce: prozáněťový cytokin, význam v obraně proti intracelulárním parazitům a v antiinfekční imunitě obecně, aktivace makrofágů k produkci reaktivních metabolitů, indukce exprese MHCII antigenů, indukce sekrece a synergismus s TNF [23].

2.6.10. Faktor nekrotizující nádory α (TNF- α)

Produkující buňky: monocyty, makrofágy, lymfocyty, neutrofil, keratinocyty, endotel. Cílové buňky: myeloidní buňky. Funkce: endogenní pyrogen, zánět (negativní role v patogenezi gramnegativní sepse), adheze leukocytů, produkce bílkovin akutní fáze, katabolismus, metabolismus lipidů, stimulace osteoklastů [23].

2.6.11. Kaspáza 1 (ICE, IL-1 β invertáza)

Produkující buňky: leukocyty a další buňky. Cílové buňky: viz. IL-1 β a IL-18. Funkce: aktivovaná kaspáza 1 v inflamasomu vytváří IL-1 β a IL-18 [23].

2.6.12. β -aktin

β -aktin je používána jako housekeeping gen s předpokladem jejího konstitutivního přepisu většinou buněčných populací organismu [23].

2.6.13. GAPDH

GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) je používána jako housekeeping gen s předpokladem jejího konstitutivního přepisu většinou buněčných populací organismu [23].

2.6.14. Cyklofilin

Cyklofilin (peptidylprolyl isomerie) je používán jako housekeeping gen s předpokladem jeho konstitutivního přepisu většinou buněčných populací organismu [23].

2.7. Prasečí gnotobiotický model

Prase má epiteliální typ placentace, která znemožňuje přestup imunoglobulinů z mateřského krevního oběhu do fetální cirkulace a tím i pasivní imunizaci plodu [24]. Novorozená selata, kterým je upřen příjem kolostra, hynou v konvenčních podmínkách během 24 hodin na sepsi způsobenou především *E.coli*. Hysterektomií asepticky získaná selata přežijí ve sterilních podmínkách i bez příjmu kolostra. Prasečí gnotobiotický model (chovaný v mikrobiologicky definovaných a řízených podmínkách) umožňuje studium interakce hostitele a vybrané složky mikroflóry bez konvenčního pozadí [25, 26]. Je proto vhodný model pro studium antiinfekční imunity .

3. CÍL PRÁCE

Hlavním cílem práce je zavést systém pro kvantifikaci genového přepisu prasečích zánětových cytokinů IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12/23 p40, IL-18, IFN- γ , TNF- α , kaspázy a kontrolních (housekeeping) genů β -aktinu, GAPDH a cyklofilinu metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase za použití LNA sond.

Dílčí cíle jsou:

- a) Výběr nukleotidových sekvencí pro prasečí cytokiny z literatury a z databáze
- b) Návrh LNA sond a odpovídajících primerů
- c) Potvrzení specifity amplikonu elektroforézou v agarózovém gelu
- d) Zhodnocení metody

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Bakteriální kultury

Bifidobaktérie jsme kultivovali v TPY bujónu (Scharlau, Barcelona, Španělsko) v anaerobních podmínkách. Suspenze bakterií byla centrifugována 15 min. při 4000 rpm, odebrali jsme supernatant a buňky resuspendovali v DPBS a znovu centrifugovali. Kontrolu jsme provedli kultivací bakterií na TPY agaru (Scharlau) v anaerostatu. Z kultur *E.coli* O55 a *Salmonella* Typhimurium LT2 narostlých 24 hod. na šikmém agaru jsme připravili suspenzi v PBS, a promyli ji tak jako v případě bifidobakterií. Předpokládané množství CFU jsme odečetli z kalibrační křivky po změření na fotometru při 550 nm a selatům podali 1×10^8 CFU intragastrickou sondou v 5 mL mléka. Počet bifidobakterií jsme ověřili kultivací na TPY agaru v anaerostatu nebo na Endově půdě (Oxoid, Basingstoke, UK) 24 hodin při 37°C.

4.2. Vzorky tkání

Vzorky tkání pocházely z gnotobiotických (tj. mikrobiologicky definovaných) selat, která jsme získali hysterektomií gravidní miniaturní prasnice 112. dne březosti. Selata jsme dále odchovávali v sklolaminátovém izolátoru a krmili mléčnou dietou s přídatkem vitamínů a minerálních látek [25]. Ve věku 1 týden jsme selata cíleně osadili *B. bifidum* JKM a po týdnu infikovali enteropatogenní *E.coli* O55 nebo *Salmonellou enterica* serovar Typhimurium, kmenem LT2 po dobu 24 hodin. Kontrolní skupina nebyla infikována patogenními bakteriemi a měla pouze bifidobakterie. Vzorky tkání jsme odebírali po vykrvení selete v anestezii do 0,75 ml RNAlater™ (Qiagen, Hilden, Německo) v množství doporučeném výrobcem, ponechali 10 minut při pokojové teplotě a poté uchovávali při -20°C do izolace celkové RNA.

4.3. Izolace celkové RNA a kontrola její kvality

4.3.1. Izolace celkové RNA

Pro izolaci celkové RNA z terminálního ilea jsme použili Invitek - Invisorb® Spin Cell RNA Mini Kit (Invitek, Berlín, SRN). Centrifugace jsme prováděli v centrifuze Hettich 32R s úhlovým rotorem 1614 (Hettich, Tuttlingen, SRN).

1. Vyjmuli jsme odpovídající vzorek tkáně z RNA later a odstříhli kousek terminálního ilea v přibližném rozměru 2 x 2 mm.
2. Tkáň jsme homogenizovali teflonovým homogenizátorem přímo v 1,5 mL eppendorfce ve 300 μ L Lysis solution DCT, po homogenizaci přidali dalších 300 μ L lyzovacího roztoku a promíchali překlápěním zavřené zkumavky.
3. Homogenát jsme centrifugovali 2 minuty při maximální rychlosti centrifugy (14 000 rpm).
4. Supernatant jsme přemístnili do 2,0 mL Receiver Tube, přidali 330 μ L 99,8 % etanolu a dobře promíchali pipetováním.
5. Celý objem jsme přenesli do RTA-Spin Filter Setu, 1 min. inkubovali a centrifugovali 1 min. při 10 000 rpm. To, co prošlo kolonkou, jsme vylili.
6. Přidali jsme 500 μ L Wash Buffer R1 pufru do Spin Filter kolonky a centrifugovali 30 s při 10 000 rpm. To co, prošlo kolonkou, jsme vylili.
7. Přidali jsme 700 μ L Wash Buffer R2 pufru do Spin Filter kolonky a centrifugovali 30 s při 10 000 rpm. To, co prošlo kolonkou, jsme vylili.
8. Zopakovali jsme předchozí krok.
9. Centrifugovali jsme vzorek 5 min. při 14 000 rpm a poté vyhodili Receiver Tube.
10. Přendali jsme Spin Filter do RNase-free Elution Tube a přidali 45 μ L Elution Buffer pufru přímo na membránu Spin Filter kolonky. Inkubovali jsme kolonku 2 min. a centrifugovali 1 min při 10 000 rpm.
11. Eluovanou celkovou RNA jsme uložili na led.

4.3.2. Stanovení koncentrace a čistoty celkové RNA

Vyizolovanou RNA jsme naředili 20x do celkového objemu 300 μL deionizované vody. Měření jsme provedli na UV/VIS spektrofotometru Ultrospec *pro* (Pharmacia, Upsala Švédsko) v kyteti z křemenného skla o šířce 10 mm. Výpočet koncentrace celkové RNA jsme provedli podle vzorce:

$$\text{Koncentrace RNA} = A_{260} \times 0,040 \times 20 \quad [\mu\text{g}/\mu\text{L}]$$

Čistotu jsme hodnotili jako poměr absorbancí při 260 nm (absorbční maximum nukleových kyselin) a 280 nm (absorbční maximum bílkovin) – $A_{260/280}$

4.4. Syntéza cDNA

Syntézu cDNA jsme provedli ve dvou krocích pomocí kitu „Enhanced Avian HS RT-PCR kit“ (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA). Jako primery jsme použili oligo d(T) primery, které jsou jednou z možností obsažených v kitu.

Tabulka č. 1. Syntéza cDNA – 1. krok		
Reagencie	Objem v μL	Výsledná koncentrace
PCR voda	-	q.s.
RNA templát	8	0,005-0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ celkové RNA
Směs dNTP	1	500 μM každého dNTP

Oligo d(T) ₂₃ primery	1	3,5 μM
Výsledná směs 1	10	

Vzniklou směs jsme jemně zamíchali a krátce centrifugovali. Poté jsme ji inkubovali v termálním cyklu 10 minut při 70°C. Bezprostředně po ukončení teplotního režimu jsme umístili zkumavku se směsí na led a po ochlazení přidali 10 μL směsi obsahující následující reagenty:

Tabulka č. 2. Syntéza cDNA – 2. Krok		
Reagencie	Objem v μL	Výsledná koncentrace
PCR voda	6	---
10X pufr pro AMV-RT	2	1X
Inhibitor RNAs	1	1 U/μL
Enhanced avian AMV-RT	1	1 U/μL
Výsledná směs 2	10	

Směs jsme inkubovali při 45°C po dobu 50 minut, poté při 70°C po dobu 10 minut.

4.5. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Použité primery byly syntetizovány jako 50 nM osolené a dodány v lyofilizovaném stavu (Invitrogen). Rekonstituovány na 100 μ M koncentraci byly přidáním odpovídajícího množství vody pro PCR (Invitrogen) podle údajů výrobce o množství primeru.

K vlastní polymerázové reakci v reálném čase byl použit master mix FastStart TaqMan® Probe Master (Roche), voda pro PCR, primery a odpovídající LNA sondy (Roche) podle následující tabulky:

Tabulka č. 3. Reakční směs pro PCR		
Reagencie	Objem [mL]	Výsledná koncentrace
FastStart Universal Probe Master 2x	10	1
LNA sonda (25 μ M)	0,2	250 nM
Left primer (100 μ M)	0,1	500 nM
Right primer (100 μ M)	0,1	500 nM
PCR H ₂ O	7,6	
Celkový objem reakční směsi	18	

Reakční směs byla rozpipetována po 18 μ L do 200 μ L zkumavek 96-zkumavkové destičky, přelepena fólií, mírně centrifugována, protřepána a opět mírně centrifugována a dána do termocyklu iQ5 pro real time PCR s iQ5 Optical System Software, verze 1.0 (Bio-Rad, Hercules, USA). Amplifikační reakce byla provedena v následujícím teplotním režimu:

1. 95°C – 10 min. (1 x)
2. 95°C po 20 s a 59°C po 40 s (50 x)
3. 4°C (∞)

Vyhodnocení amplifikační reakce jsme provedli pomocí iQ5 Optical System Software (Bio-Rad) a GenEx Pro (Tataa, Göteborg, Švédsko).

4.6. Elektroforéza v agarózovém gelu

Kontrolu produktů PCR jsme provedli v 5% agarózovém gelu (Invitrogen) s přidavkem 0,2% GelRedu™ (Biotium, Hayward, USA) v TAE pufru pH 7,4. Elektroforéza proběhla při 100 V po dobu 30 minut. Gel jsme prosvítili na transiluminátoru při 312 nm a zdokumentovali (Ultralum, Claremont, USA).

4.7. Další přístroje, pomůcky a použitý software

Jednokanálové a 12-kanálové pipety řady Digital (ThermoLabsystems, Helsinky, Finsko), Pipetus Aku (Hirschmann, Eberstadt, SRN), vortex a třepačky (Labnet, Edison, USA).

Úpravu obrázku jsme provedli pomocí Adobe Photoshop, verze 7.0 (Adobe) a literární reference zpracovali Reference Managerem, verze 10 (Thomson Scientific, Carlsbad, USA). Zvolen byl formát časopisu Immunology.

5. VÝSLEDKY

5.1. Izolace celkové RNA a syntéza cDNA

Vzorky terminálního ilea			Absorbance		Poměr	Koncentrace	1 µg RNA	H ₂ O
Poř.		Infekce	A ₂₆₀	A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	[µg/µL]	[µL]	[µL]
1	808/0	JKM	0,157	0,09	1,74	0,126	8,0	0,0
2	808/2	JKM	0,161	0,089	1,81	0,129	7,8	0,2
3	815/6	JKM + O55	0,419	0,235	1,78	0,335	3,0	5,0
4	815/7	JKM + O55	0,320	0,181	1,77	0,256	3,9	4,1
5	815/8	JKM + O55	0,505	0,287	1,76	0,404	2,5	5,5
6	817/2	JKM + LT2	0,788	0,437	1,80	0,630	1,6	6,4
7	817/3	JKM + LT2	0,320	0,178	1,80	0,256	3,9	4,1
8	817/5	JKM + LT2	0,396	0,208	1,90	0,317	3,2	4,8

Pro syntézu cDNA jsme použili 1 µg RNA izolované ze vzorků 808/0, 808/2, 815/6, 815/7, 817/2 a 817/3. cDNA posloužila jako templát pro PCR v reálném čase. Čistota jednotlivých RNA udávaná poměrem se blížila požadovanému poměru 1,8.

5.2. Návrh LNA sond a odpovídajících primerů

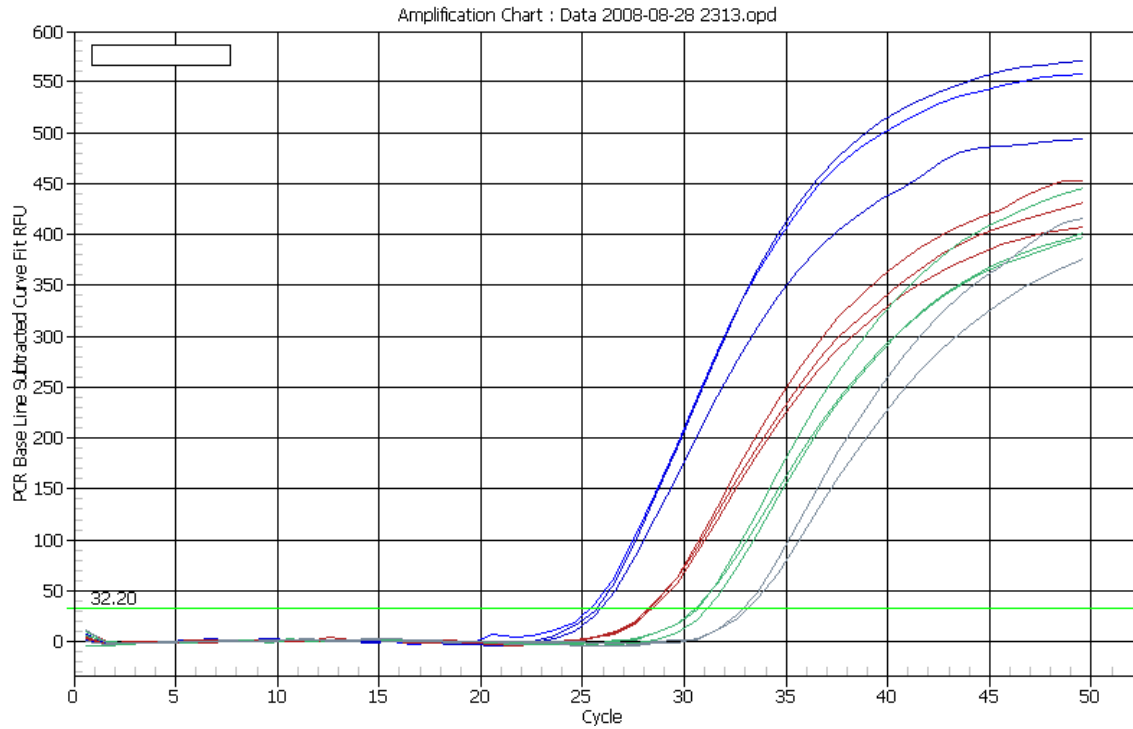
Při návrhu sond software zároveň vytváří pořadí navržených kombinací sondy a primerů. Pokud to bylo možné, tak jsme vybírali kombinaci na prvním nebo předním pořadí. Vybrané kombinace sonda-primery pro jednotlivé transkripty jsou uspořádány v následující tabulce.

Na obrázku č. 1 jsou znázorněny amplifikační charakteristiky pro IL-6 na obrázku č. 2 kalibrační křivka pro IL-6. Kalibrační křivky pro ostatní transkripty jsou v přílohách.

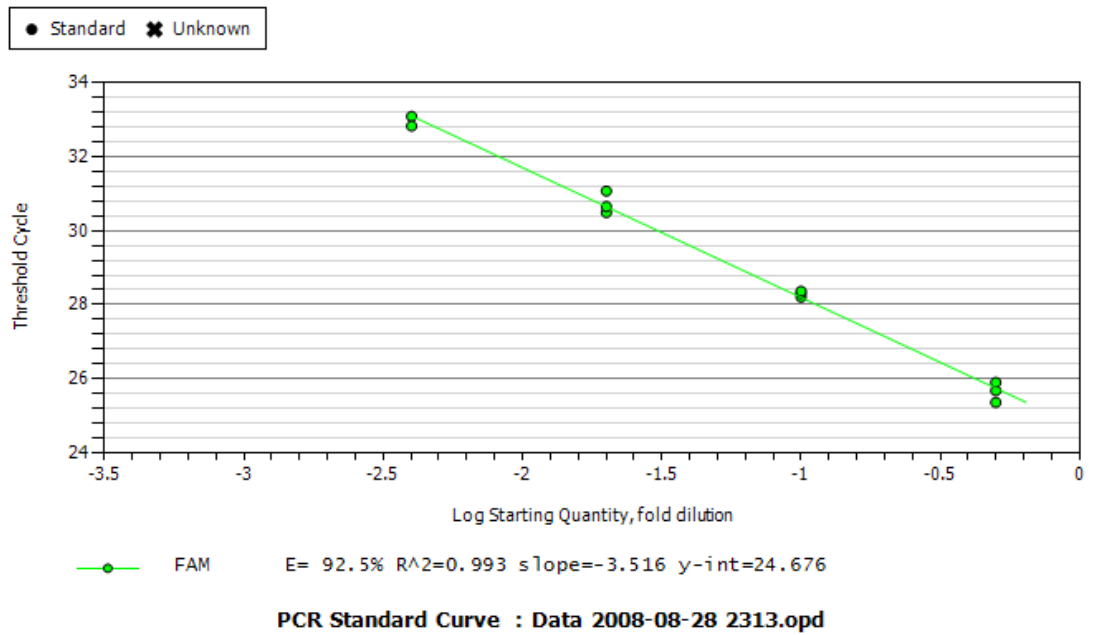
LNA sondy a primery

Tabulka č. 5. LNA sondy a primery pro stanovení mRNA cytokinů, kaspázy 1 a kontrolních genů		
Transkript	Levý primer	Označení levého primeru
Přístup č.	Pravý primer	Označení pravého primeru
Velikost	Amplikon	
IL-1α NM_214029 75 nt	5'-gacggttgagtttaaatcagttca-3	pIL-1a-L-85
	5'-tgatttcttctgtgcattgg-3	pIL-1a-R-85
	5'-gacggttgagtttaaatcagttcatcaccgatgacgacctggaagccattgccaatgacacagaagaagaatca-3	
IL-1β M86725 61 nt	5'-cctggaccttggttctctga-3	pIL-1b-L-42
	5'-ccagagctggtgagagattg-3	pIL-1b-R-42
	5'-cctggaccttggttctctgagaaatgggagcatccagctgcaaatctctcaccagctctgg-3	
IL-4 NM_214123 63 nt	5'-gagaacacgacggagaagga-3	pIL-4-L-29
	5'-tctgtatgtgccaagca-3	pIL-4-R-29
	5'-gagaacacgacggagaagaaaccttctgcccggcctcgactgtcttcggcacatctacaga-3	
IL-6 M86722 66 nt	5'-caaagccaccaccctaac-3	pIL-6-L-40
	5'-tcgttctgtgactgcagctt-3	pIL-6-R-40
	5'-caaagccaccaccctaaccaccacaatgcccggcctgctgataagctgcagtcacagaacga-3	
IL-8 M99367 63 nt	5'-ttcttcttatccccaaactgg-3	pIL-8-L-41
	5'-ccacatgtcctcaagtagga-3	pIL-8-R-41
	5'-ttcttcttatccccaaactggagaaaaagcttcagccccatcctccttgaggacatgtgg-3	
IL-10 L20001 60 nt	5'-tccagttttacctggaagacg-3	pIL-10-L-8
	5'-ccttgatatcctccccatca-3	pIL-10-R-8
	5'-tccagttttacctggaagacgtaatgccgaaggcagagagtgatggggaggatcaagg-3	
IL-12 p40 NM_214013 60 nt	5'-ttcctgtgcatgaaaacttc-3	pIL-12p40-L-77
	5'-aggtaccagtgccctgaat-3	pIL-12p40-R-77
	5'-ttcctgtgcatgaaaacttcctgcaggggtggttaattcagggccactggtacct-3	
IL-18 NM_214013 94 nt	5'-actttactttagctgaaaacgatg-3	pIL-18-L-85
	5'-ttaggttcaagcttgccaag-3	pIL-18-R-85
	5'-tcagcttgggaaatgaagttattaacaatacacttactttagctgaaaacgatgaagacctggaatcggtacttggcaagcttga-3	
IFN-γ NM_213948 94 nt	5'-tggaaagaggagagtgacaaaaa-3	pIFN-g-L-21
	5'-caaagaattgaagtagaaggagaca-3	pIFN-g-R-21
	5'-tggaaagaggagagtgacaaaaaataattcagagccaattgtctccttacttcaaattcttggaaatctcaagataaccaggccattc-3	
TNF-α NM_214022 63 nt	5'-tggtagaaccctctacctg-3	pTNF-a-L-11
	5'-ggcactgagtcgatcatct-3	pTNF-a-R-11
	5'-tggtagaaccctctacctggagggtcttcagctggagaaggatgatgactcagtgcc-3	
Kaspáza 1 NM_214162 76 nt	5'-atggcctctggatgaactatta-3	pCasp-1-L-63
	5'-gcgtttcaccttactatctcc-3	pCasp-1-R-63
	5'-atggcctctggatgaactattagaccagagctcctgaaccaggagggtggagatagaaggtgaaaaacgc-3	
β-aktin U07786 83 nt	5'-tcctggagaagagctacga-3	pb-Actin-L-9
	5'-aagagcgctctggacac-3	pb-Actin-R-9
	5'-tcctggagaagagctacgagctgcccagcggcaggtcatcaccatcggaacgagcgtccgggtgctcagaggcgctctt-3	
GAPDH X94251 93	5'-caaccacagcaagagcac-3	pGAPDH-L-63
	5'-cgagttgggctgtgact-3	pGAPDH-R-63
	5'-aggagtaagagccccggaccaccaaccacagcaagagcagcagaggaggagagccctcagctgctggggagtcacagcccaactcgat-3	
Cyklofilin NM_214353 121 nt	5'-cctgaagcatacgggtcct-3	pCyclophilin-L-48
	5'-aaagaccacatgttgcctc-3	pCyclophilin-R-48
	3'-cctgaagcatacgggtcctgctgttccatggcaaatgctggcccaacacaaacgggtcccagttttcattgcactgccaagactgagtggtggatggcaaacatgtggtctt-5	

Obr. č. 1. Amplifikační charakteristiky pro IL-6

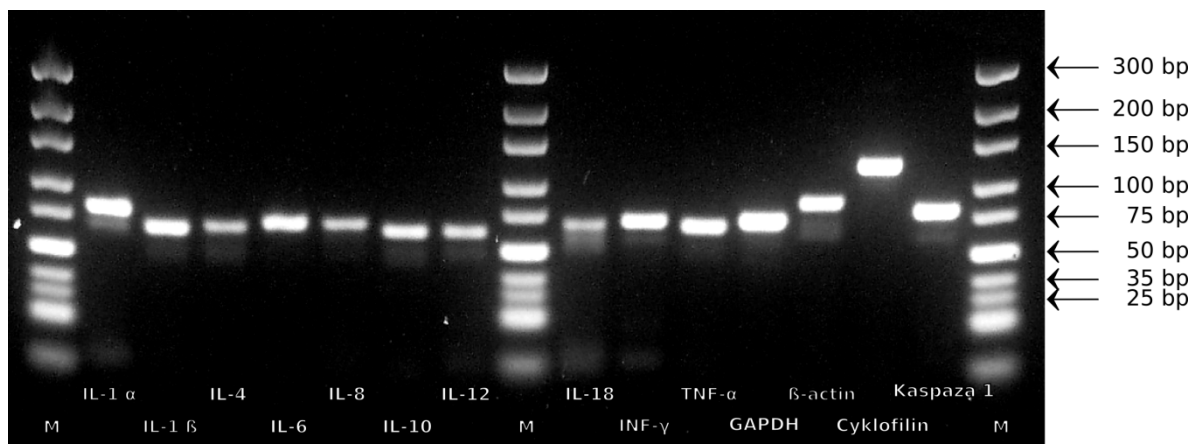


Obr. č. 2. Standardní křivka pro IL-6



5.3. Potvrzení specifity amplikonu elektroforézou v agarózovém gelu

Obr. č. 3. Elektroforéza PCR produktů v 5% agarózovém gelu

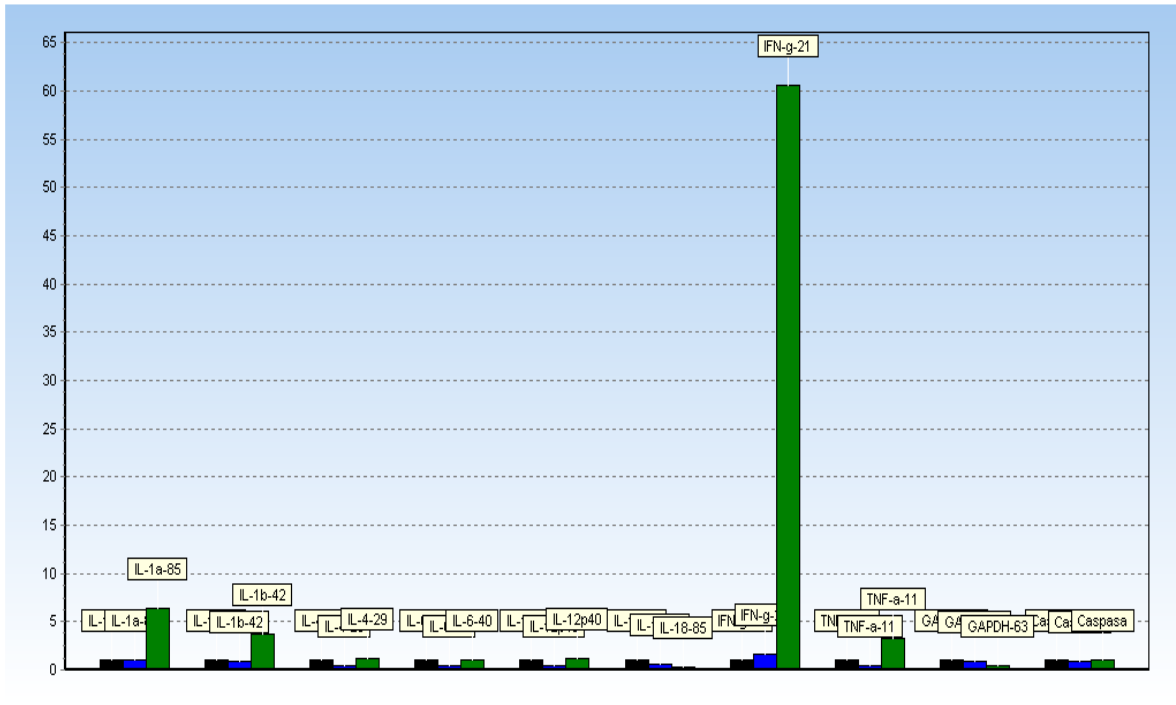


Velikosti amplikonů pro IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12/23 p40, β -aktin, GAPDH a cyklofilin se shodovaly s předpokládanou velikostí PCR produktu. V případě IL-18, INF- γ a TNF- α byly velikosti odlišné.

5.4. Aplikace metody

Stanovili jsme relativní expresi cytokinů v ileu gnotobiotických selat. Všechna selata byla ve stáří 1 týden osazena *B. bifidum* JKM. Po dalším týdnu byla 2 selata ponechána osazena bifidobakteriemi (JKM), 2 selata infikována enteropatogenní *E.coli* O55 (JKM+O55) a 2 selata infikována *Salmonellou* Typhimurium LT2 (JKM+LT2).

Obr. č. 4. Relativní exprese mRNA v ileu gnotobiotických selat



Pomocí software GenEx Pro jsme rozlišil jako nejstabilnější geny (kontrolní – housekeeping) β -aktin a cyklofilin a hodnoty mRNA pro selata infikovaná patogenními bakteriemi byly normalizovány na tyto kontrolní geny a ostatní hodnoty relativizovány vůči selatům osazeným pouze bifidobakteriemi. Na obrázku č. 4 a v tabulce č. 6 jsou stejné hodnoty.

Tabulka č. 6. Relativní exprese mRNA v ileu gnotobiotických selat			
Cytokin-sonda	JKM	JKM + EcO55	JKM + LT2
IL-1 α -85	1,000	1,003	6,414
IL-1 β -42	1,000	0,906	3,752
IL-4-29	1,000	0,402	1,187
IL-6-40	1,000	0,418	1,079
IL-12p40	1,000	0,373	1,207
IL-18-85	1,000	0,596	0,347
IFN- γ -21	1,000	1,707	60,587
TNF- α -11	1,000	0,388	3,282
GAPDH-63	1,000	0,887	0,503
Caspasa 1	1,000	0,924	1,036

6. DISKUZE

Prase (*Sus scrofa*) je hospodářsky významné zvíře. Pro svou výrazně vyšší podobnost člověku, ve srovnání s běžně používanými laboratorními hlodavci, je i významným laboratorním modelem. Gnotobiotické tj. mikrobiologicky definované miniaturní prase je pro epiteliiochoriální typ placenty, kdy nedochází k pasivní imunizaci plodů transplacentárním přenosem imunoglobulinů, a malé rozměry vhodným objektem pro výzkum antiinfekční imunity [24, 27, 28].

Zánětové cytokiny jsou molekuly zprostředkovávající mezibuněčnou komunikaci a při vstupu infekčního agens do organismu přitahují a aktivují imunokompetentní buňky. Cytokiny jsou významnou složkou jak přirozené (atrakce a aktivace neutrofilů, makrofágů, Th buněk apod.), tak zprostředkovaně i adaptivní imunity (Th1/Th2 polarizace, izotypový přesmyk imunoglobulinů apod.). Zatímco k detekci cytokinů na úrovni proteinu jsou většinou zapotřebí monoklonální protilátky připravené hybridomovou nebo rekombinantní technologií [29, 30], v případě genového přepisu je možné při znalosti požadované sekvence vystačit se syntetizovanými oligonukleotidy a několika enzymy [18, 19]. Díky objevu polymerázové řetězové reakce a techniky polymerázové řetězové reakce v reálném čase je tedy možné poměrně jednoduše a efektivně sledovat aktivaci genového přepisu, což přispívá k pochopení mechanismů regulace imunitní odpovědi [5, 14]. Nadprodukce cytokinů ať již způsobena vnějšími vlivy (endotoxin, infekce apod.) nebo poruchou regulace může vést k poškození organismu, případně způsobit jeho smrt, jako je to známo např. u septického šoku [31, 32]. Znalost regulačních mechanismů cytokinů a jejich možné ovlivnění jsou proto důležité pro prevenci onemocnění a léčbu člověka a zvířat.

Kvantifikace genového přepisu začíná izolací kvalitní RNA [10, 11]. K tomu se používají různé metody ať již klasická fenol chloroformová metoda nebo kolonové metody kdy je odstranění nežádoucí kontaminující DNA řešeno tím, že se rozštěpí DNázou po separaci (Macherey-Nagel), nebo je navázána na částice a odstraní se ještě před nanesením homogenátu na kolonu (Invitek) či se naváže na speciální kolonu (Qiagen). Použití různých primerů (oligo d(T)_n, náhodných n-merů nebo specifických) mění nároky na integritu RNA [11]. Z našich zkušeností víme, že ani uchování izolované RNA při -80°C nezajistí její neporušenost, a proto jsme se snažili provést reverzní transkripci co nejdříve po izolaci celkové RNA, kde preferujeme používání oligo d(T)_n jako primerů což klade vyšší nároky na izolovanou RNA než např. při použití náhodných n-merů.

Systém LNA sond vyvinutý firmou Exiqon a komercializovaný firmou Roche spolu s na internetu volně dostupným software nabízí možnost jednoduchého návrhu systému pro detekci

genového přepisu [21, 22]. Zatímco např. pro člověka a myš nabízí systém automatické rozlišování pozic intron/exon, u prasete tato možnost neexistuje, pokud neznáme tyto pozice a nezadáme je manuálně. To nám zvyšuje nároky na čistotu izolované RNA, i když v případě amplifikace templátu genomové DNA při anelaci primerů v různých exonech by s největší pravděpodobností docházelo k podstatně větším produktům PCR, které by byly oproti syntéze malých amplikonů výrazně znevýhodněny [8, 18]. Při návrhu systému jsme vycházeli ze sekvencí, které v literatuře popsali renomované pracovní skupiny pracující s prasetem [8, 16, 33-36]. Pro tyto sekvence jsme navrhovali systémy a pokud se lišily – porovnávali jsme sekvence navzájem a k návrhu používali jen části, kde bylo dosahováno 100% shody. Například pro IFN- γ je shodný detekční systém založený na sondě č. 21 kdy bychom předpokládali amplikon o velikosti 94 bp, avšak námi získaný má přibližnou velikost 75 bp. Není tedy jasné, jestli se jedná o detekci IFN- γ nebo nějaké neznámé sekvence. *Salmonella* Typhimurium způsobuje u myši onemocnění podobné břišnímu tyfu člověka, avšak u prasete (stejně jako u člověka) enteritidu. Pro infikované prase jsou potom typické vysoké hodnoty IFN- γ , jehož funkcí je aktivace fagocytózy makrofágů [37, 38]. Je zřejmé, že relativní exprese genového přepisu u selat infikovaných *Salmonellou* je více než 30x vyšší než u ostatních selat. Tento nález svědčí, byť se jedná jen o 2 selata, pro domněnku, že je opravdu detekována mRNA pro IFN- γ . Dalším krokem pro ověření specifity testu bude objednání nových primerů od různých producentů a samozřejmě sekvenace produktu PCR. Obdobně nejasná situace je i v případě IL-18 majícího jako IFN- γ indukující faktor úzký vztah k IFN- γ a TNF- α . Zatímco v případě IL-18 a IFN- γ nabízí Universal Probe Library firmy Roche jen jediný systém a bude tedy třeba vyvinout značné úsilí pro objasnění neshod, v případě TNF- α je k dispozici více než 10 různých kombinací sonda – primer a je možné volit jiný systém.

V posledních letech je kladen velký důraz na normalizaci transkripce a je doporučováno používat 3 kontrolní geny [39]. Z přehledu prací jsou doporučovány cyklofilin [8], GAPDH a cyklofilin [16] a HPRT1 pro slabě exprimované transkripty [40]. Při testování nám systém pro HPRT1 nevykázal žádnou amplifikaci, a proto jsme od něj upustili. Naopak při testování stability genového přepisu nám software GenEx vyhodnotil β -actin a cyklofilin jako nejvíce stabilní geny a potvrdil tak jejich vhodnost jako kontrolních genů.

Je nám jasné, že v takto malém souboru je těžko možné dělat jednoznačné závěry, že je třeba zavést systém kontroly kvality izolované RNA, sekvenaci produktů PCR a další techniky. Tento

soubor pokusů jsme brali jako začátek naší práce s hydrolyzačními sondami TaqManovského typu na systémech detekce genové aktivace metodou polymerázové řetězové reakce v reálném čase.

7. ZÁVĚR

Cytokiny jsou molekuly zprostředkovávající mezibuněčnou komunikaci. Uplatňují se při různých fyziologických stavech probíhajících během celé ontogeneze organismu. Nadprodukce cytokinů způsobená např. infekcí však může vést k poškození organismu, případně způsobit jeho smrt, jako je to známo např. u multiorgánového poškození. Znalost regulačních mechanismů cytokinů a jejich možné ovlivnění jsou proto důležité pro prevenci onemocnění a léčbu člověka a zvířat. Perspektivní metoda detekce genového přepisu cytokinů pomocí metody polymerázové řetězové reakce za použití LNA sond přispěje ke znalostem regulačních mechanismů, které se rozvíjejí při infekčních onemocněních. Použití LNA sond pro kvantifikaci přepisu genů u prasete zatím nebylo v literatuře popsáno.

8. ZKRATKY, ODBORNÉ TERMÍNY A KLÍČOVÁ SLOVA

Anelace – zde hybridizace primerů k jednovláknému templátu při zchlazení PCR

Amplikon - fragment DNA generovaný PCR

cDNA (complementary DNA) – komplementární DNA

Denaturace – zde tepelné oddělení DNA vláken v PCR

DNA (DeoxyriboNucleic Acid) – kyselina deoxyribonukleová

Elongace – prodloužení vlákna DNA

GHPDH - GlyceraldeHyDe-3-Phosphate deHydrogenase

Gnotobiotický – mikrobiologicky definovaný

HPRT - Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase

IFN – interferon

IL – interleukin

LNA (Locked Nucleic Acid) – „zamknuté nukleové kyseliny“

mRNA (messenger RiboNucleic Acid) – mediátorová kyselina ribonukleová

PBS (Phosphate Buffer Saline) – fosforečnany pufovaný fyziologický roztok

PCR (Polymerase Chain Reaction) – polymerázová řetězová reakce

RNA (RiboNucleic Acid) – kyselina ribonukleová

RPMI 1640 – kultivační médium pro eukaryotické buňky (především pro leukocyty)

RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) – reverzní transkripce
následovaná kvalitativní polymerázovou řetězovou reakcí

Th (T-cell helper) – pomocné T lymfocyty

Templát – zde DNA použitá k PCR

TNF (Tumor Necrosis Factor) – faktor nekrotizující nádory

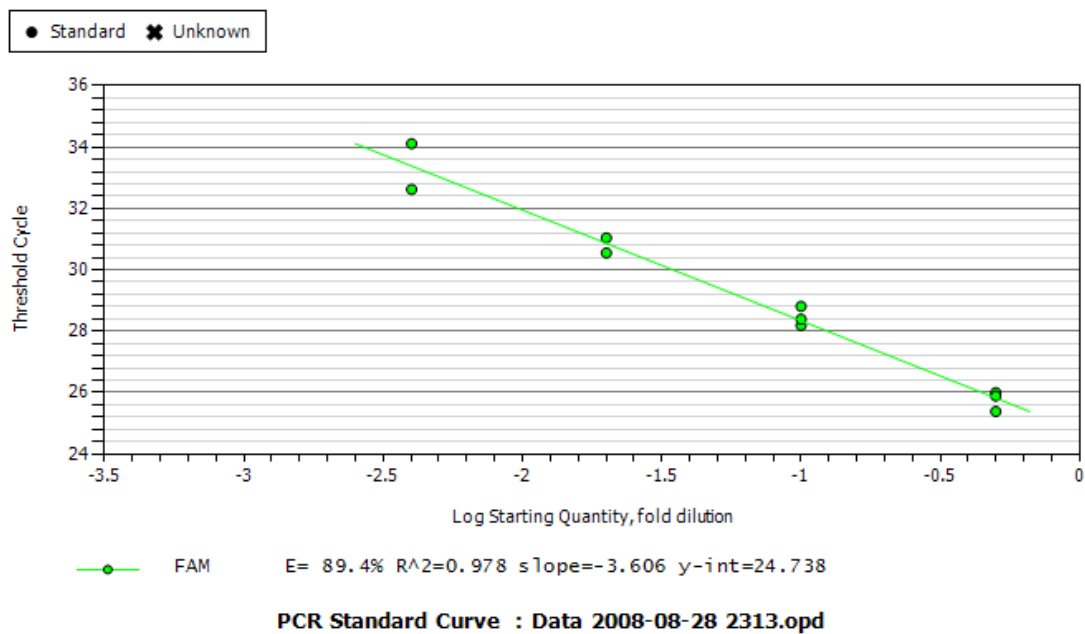
9. POUŽITÁ LITERATURA

1. Murtaugh MP. Porcine cytokines. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;43:37-44.
2. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005;34:597-601.
3. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 2006;1:1559-82.
4. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263-73.
5. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 1992;24:17-27.
6. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350-4.
7. Shinkai H, Muneta Y, Suzuki K, Eguchi-Ogawa T, Awata T, Uenishi H. Porcine Toll-like receptor 1, 6, and 10 genes: complete sequencing of genomic region and expression analysis. *Mol Immunol* 2006;43:1474-80.
8. Dozois CM, Oswald E, Gautier N, Serthelon JP, Fairbrother JM, Oswald IP. A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;58:287-300.
9. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-9.
10. Deng MY, Wang H, Ward GB, Beckham TR, McKenna TS. Comparison of six RNA extraction methods for the detection of classical swine fever virus by real-time and conventional reverse transcription-PCR. *J Vet Diagn Invest* 2005;17:574-8.
11. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech* 2004;15:155-66.
12. Williams NM, Williams H, Majounie E, et al. Analysis of copy number variation using quantitative interspecies competitive PCR. *Nucleic Acids Res* 2008.

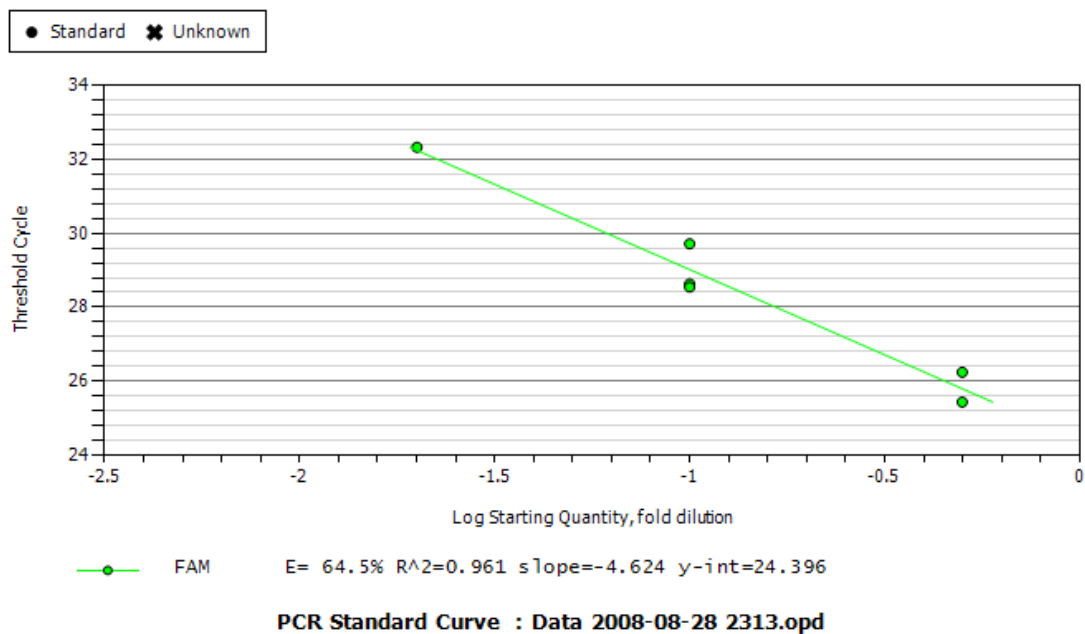
13. Zentilin L, Giacca M. Competitive PCR for precise nucleic acid quantification. *Nat Protoc* 2007;2:2092-104.
14. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992;10:413-7.
15. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002;29:23-39.
16. Duvigneau JC, Hartl RT, Groiss S, Gemeiner M. Quantitative simultaneous multiplex real-time PCR for the detection of porcine cytokines. *J Immunol Methods* 2005;306:16-27.
17. Hardstedt M, Finnegan CP, Kirchhof N, et al. Post-transplant upregulation of chemokine messenger RNA in non-human primate recipients of intraportal pig islet xenografts. *Xenotransplantation* 2005;12:293-302.
18. Anonym 1. Real-Time PCR Applications Guide. Bio-Rad Laboratories, Inc., 2004.
19. Anonym 2. gPCR Technical Guide. Sigma Life Sciences, 2005.
20. Anonym 3. Eva Green. 2004.
21. Anonym 4. Universal ProbeLibrary Assay Design Guide. Roche Applied Science, 2004.
22. Anonym 5. Universal ProbeLibrary. Roche Diagnostic, 2004.
23. Ibelgaufts H. Cytokine & cells online pathfinder encyclopedia. 2008.
24. Sterzl J, Silverstein AM. Developmental aspects of immunity. *Adv Immunol* 1967;6:337-459.
25. Mandel L, Travnicek J. The minipig as a model in gnotobiology. *Nahrung* 1987;31:613-8.
26. Shirkey TW, Siggers RH, Goldade BG, et al. Effects of commensal bacteria on intestinal morphology and expression of proinflammatory cytokines in the gnotobiotic pig. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:1333-45.
27. Splichal I, Rychlik I, Gregorova D, et al. Susceptibility of germ-free pigs to challenge with protease mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Immunobiology* 2007;212:577-82.
28. Splichalova A, Trebichavsky I, Muneta Y, Mori Y, Splichal I. Effect of bacterial virulence on IL-18 expression in the amnion infected with *Escherichia coli*. *Am J Reprod Immunol* 2005;53:255-60.
29. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. 1975. *J Immunol* 2005;174:2453-5.

30. Blazek D, Celer V. The production and application of single-chain antibody fragments. *Folia Microbiol (Praha)* 2003;48:687-98.
31. Jean-Baptiste E. Cellular mechanisms in sepsis. *J Intensive Care Med* 2007;22:63-72.
32. Schefold JC, von HS, Corsepilus M, et al. A novel selective extracorporeal intervention in sepsis: immunoabsorption of endotoxin, interleukin 6, and complement-activating product 5a. *Shock* 2007;28:418-25.
33. Murtaugh MP, Foss DL. Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Vet Immunol Immunopathol* 2002;87:109-21.
34. Murtaugh MP, Johnson CR, Xiao Z, Scamurra RW, Zhou Y. Species specialization in cytokine biology: Is interleukin-4 central to the T(H)1-T(H)2 paradigm in swine? *Dev Comp Immunol* 2008.
35. Sipos W, Duvigneau JC, Willheim M, et al. Systemic cytokine profile in feeder pigs suffering from natural postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) as determined by semiquantitative RT-PCR and flow cytometric intracellular cytokine detection. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;99:63-71.
36. Pauli U, Beutler B, Peterhans E. Porcine tumor necrosis factor alpha: cloning with the polymerase chain reaction and determination of the nucleotide sequence. *Gene* 1989;81:185-91.
37. Trebichavsky I, Splichalova A, Rychlik I, et al. Attenuated aroA *Salmonella enterica* serovar Typhimurium does not induce inflammatory response and early protection of gnotobiotic pigs against parental virulent LT2 strain. *Vaccine* 2006;24:4285-9.
38. Uthe JJ, Royae A, Lunney JK, et al. Porcine differential gene expression in response to *Salmonella enterica* serovars Choleraesuis and Typhimurium. *Mol Immunol* 2007;44:2900-14.
39. Vandesompele J, De PK, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002;3:RESEARCH0034.
40. Foss DL, Baarsch MJ, Murtaugh MP. Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim Biotechnol* 1998;9:67-78.

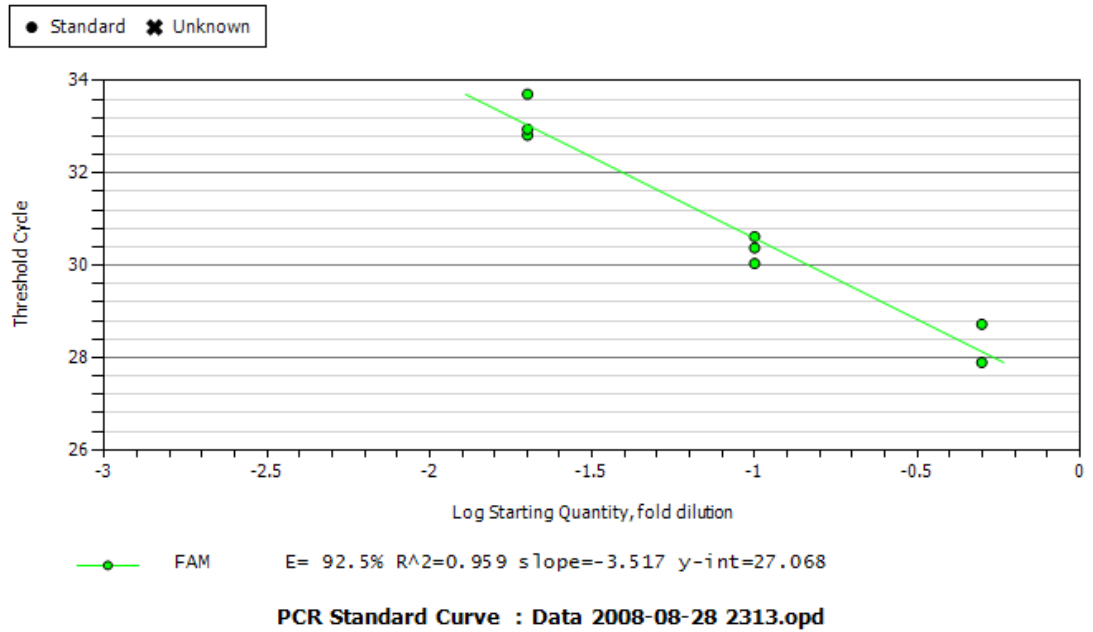
10. PŘÍLOHY



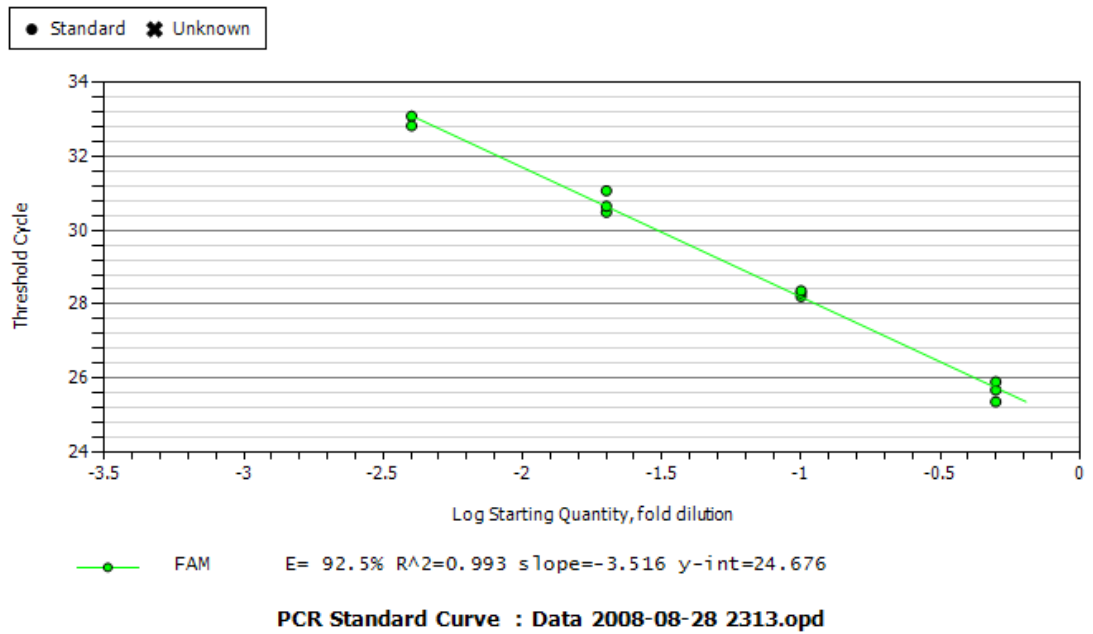
IL1 α



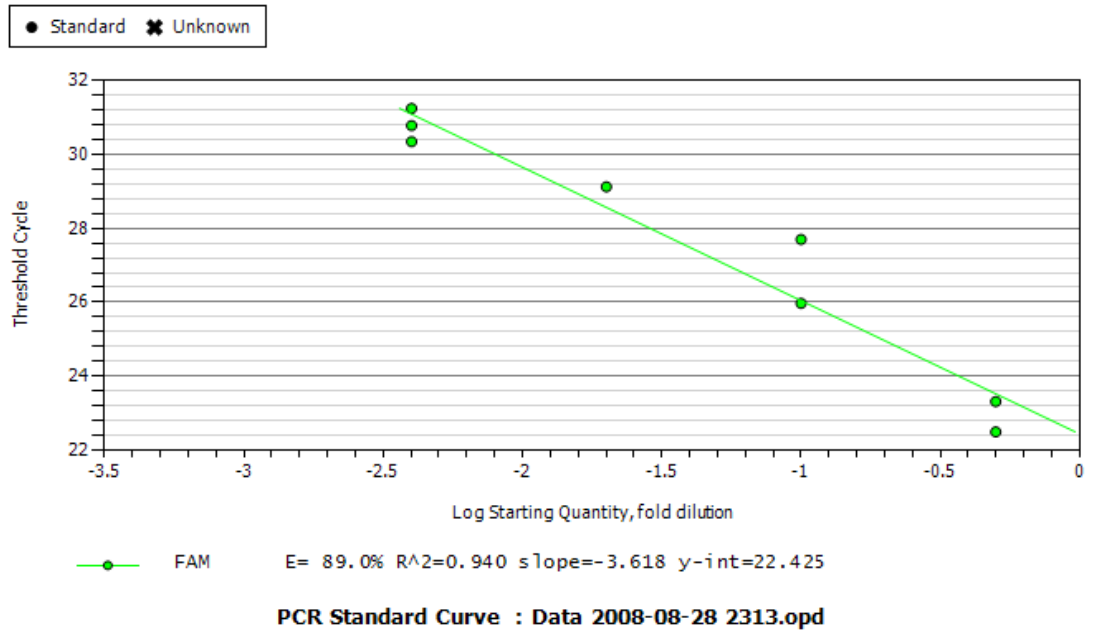
IL-1 β



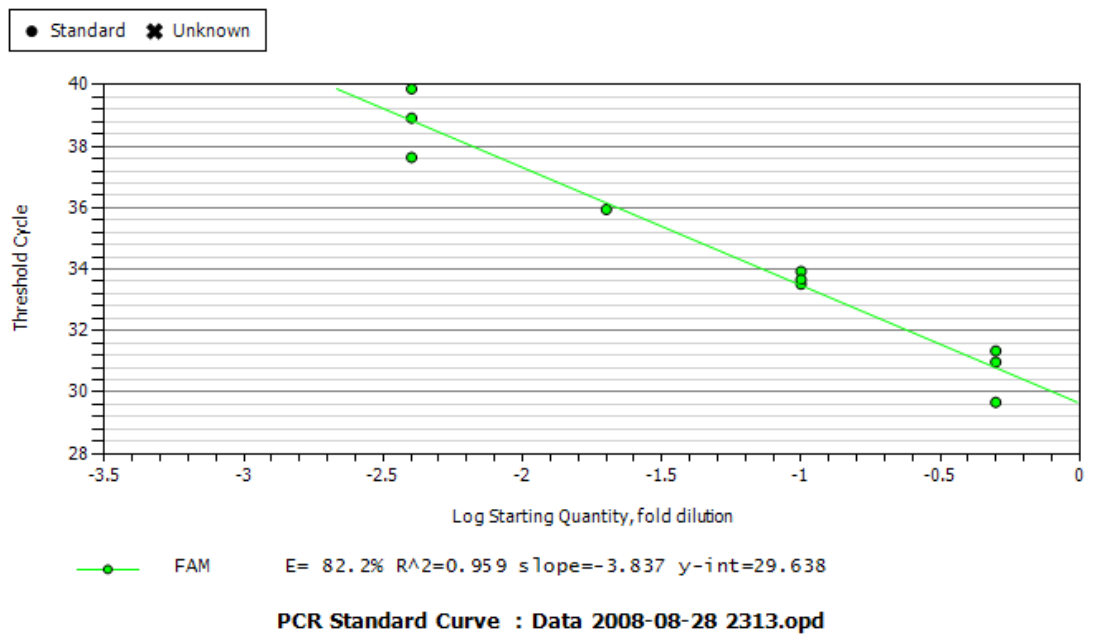
IL-4



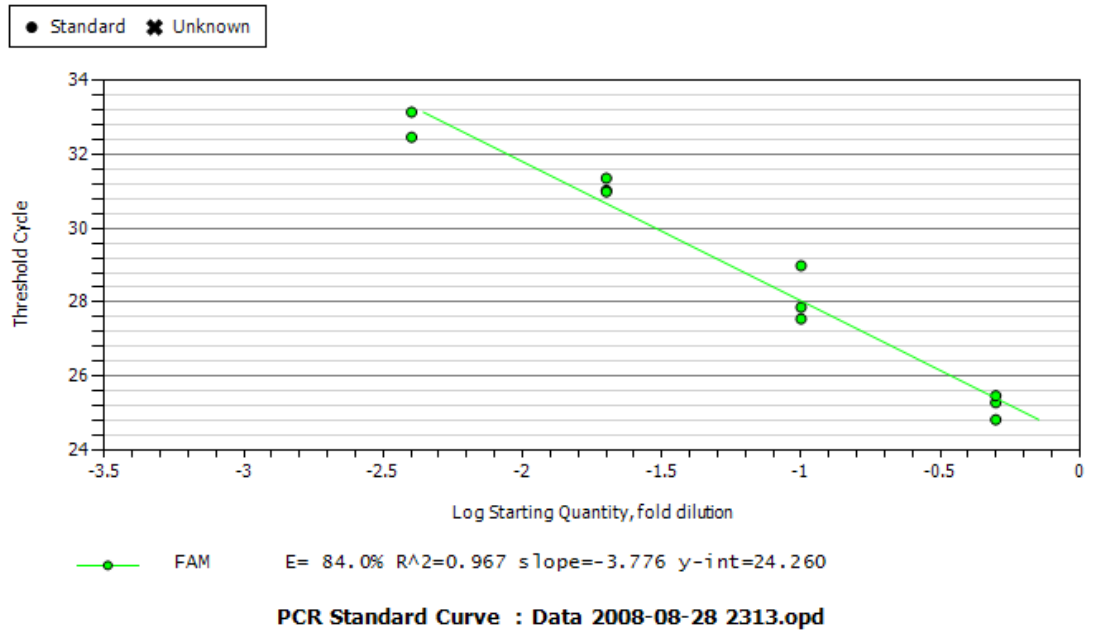
IL-6



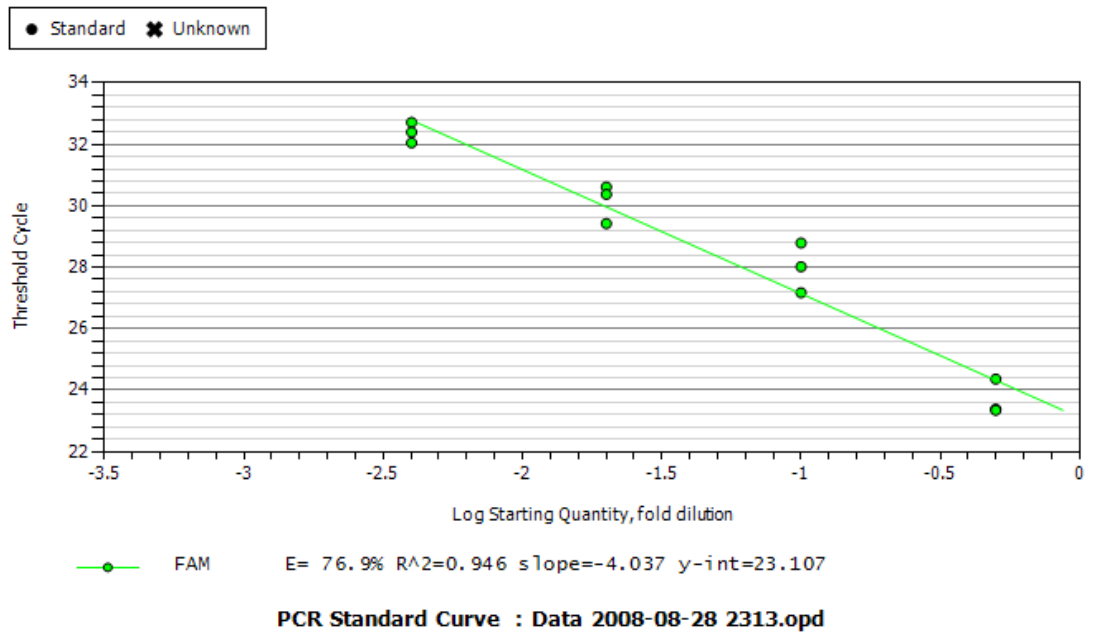
IL-8



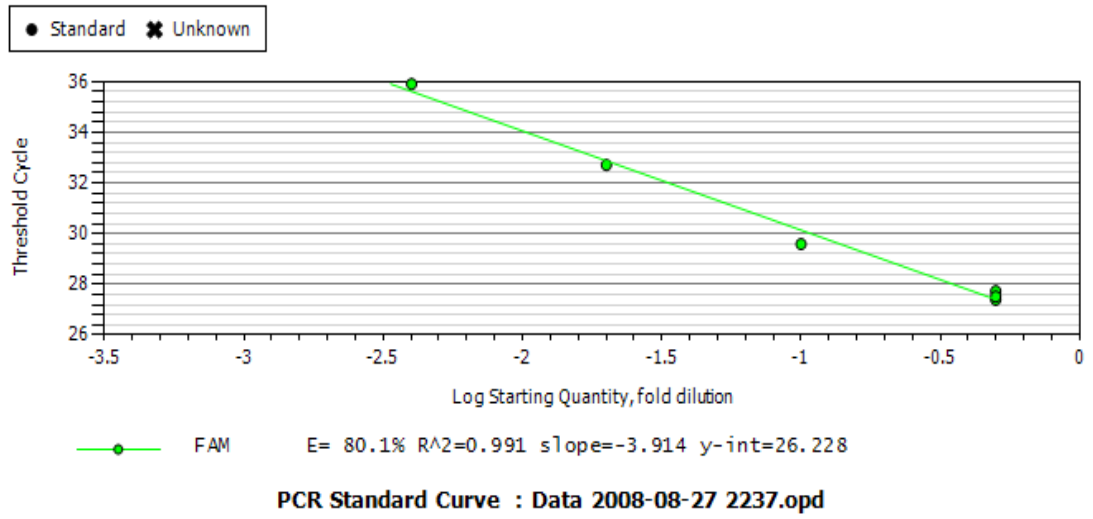
IL-10



IL-12



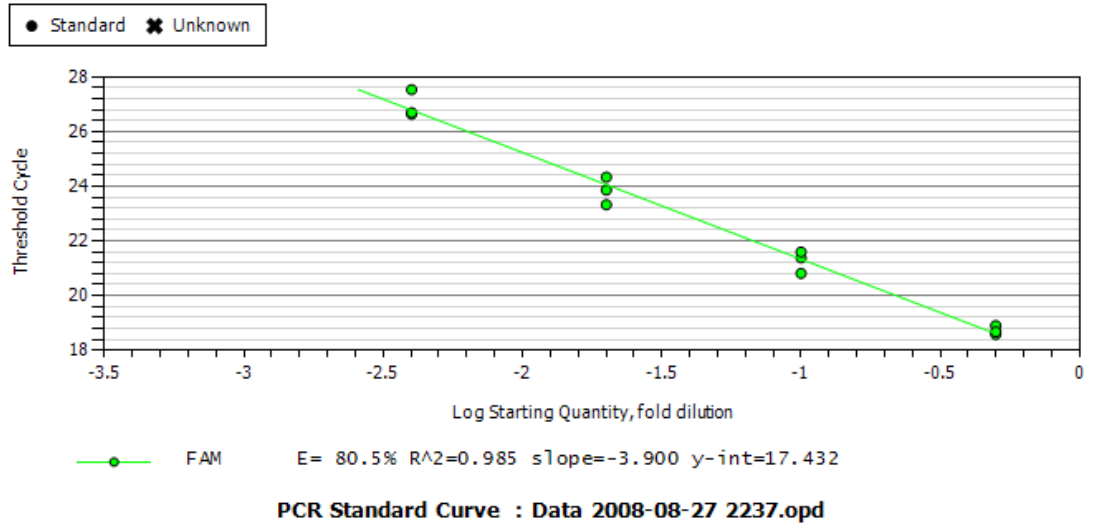
IL18



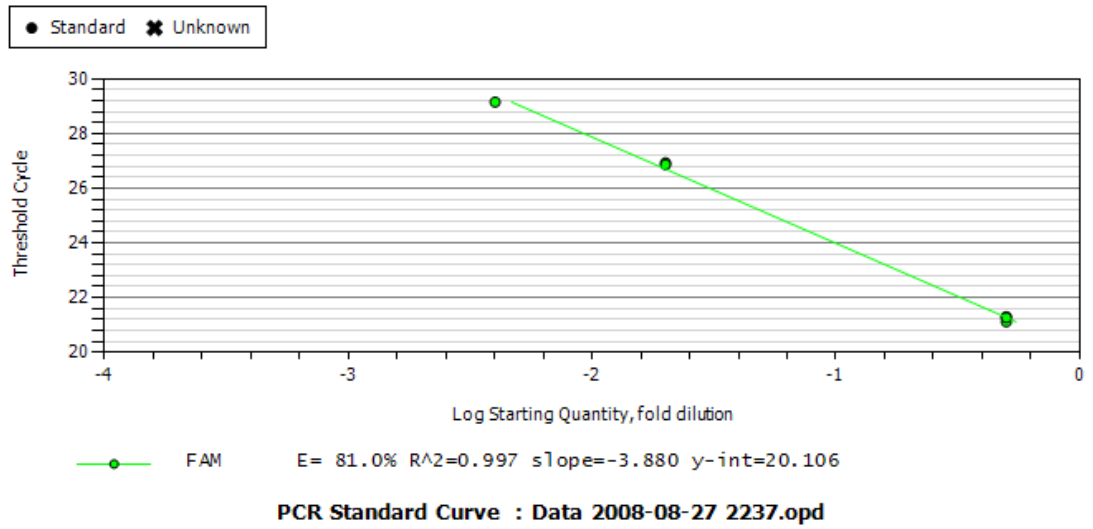
INF- γ



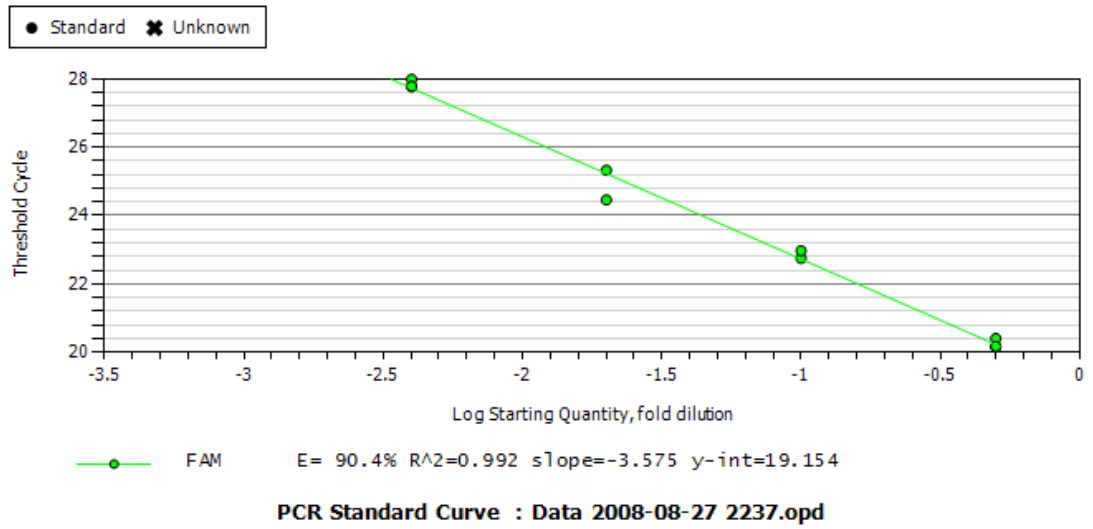
TNF- α



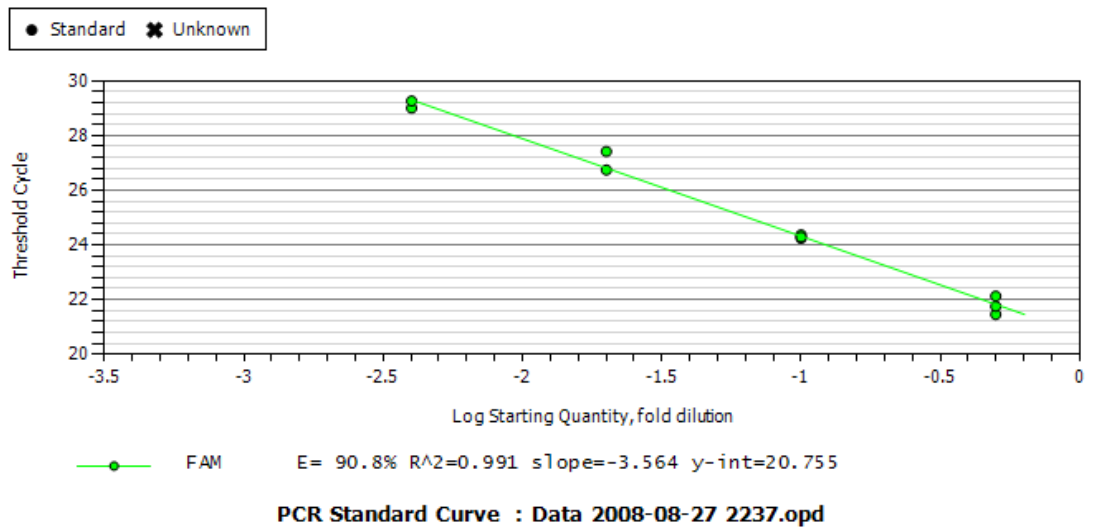
GAPDH



β-actin



Cyklofilin



Kaspáza 1