

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biologických a lékařských věd**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Jaderný faktor kappa B a zánětlivá reakce**

**Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Petr Jílek, CSc.**

**Konzultant: doc. Ing. Bc. Igor Šplíchal, CSc.**

**Hradec Králové, 2014**

**Sáva Klabačková**

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci „Jaderný faktor kappa B a zánětlivá reakce“ vypracovala samostatně. Veškerá literatura a zdroje, které jsem při zpracování použila, jsou uvedené v seznamu literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové, dne 25.4.2014

Podpis:

## PODĚKOVÁNÍ

Mé poděkování patří PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. a doc. Ing. Bc. Igoru Šplíchalovi, CSc. za odborné vedení a cenné rady při zpracování této práce. Dále děkuji za možnost pracovat v laboratoři gnotobiologie AV ČR v.v.i. na Novém Hrádku, kde byla vypracována experimentální část práce, a všem pracovníkům této laboratoře za vřelé přijetí.

Práce byla vypracována v rámci výzkumného záměru Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. RVO:61388971 a grantů Grantové agentury České republiky 524-09-0365, 13-14736S a 13-08803S.

## ABSTRAKT

Sáva Klabačková

Jaderný faktor kappa B a zánětlivá reakce

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Zdravotní laborant

**Cíl práce:** Navržené systémy LNA sond pro členy rodiny NF- $\kappa$ B, jeho inhibitorů a kináz nám umožní porovnat aktivaci imunitního systému mezi skupinami bezmikrobních a konvenčních selat. To zahrnuje izolaci celkové RNA, syntézu cDNA, polymerázovou řetězovou reakci, relativní kvantifikaci genové transkripce NF- $\kappa$ B a statistické vyhodnocení případných rozdílů mezi skupinami selat.

**Metody:** 1) Skupiny bezmikrobních a konvenčních selat, 2) návrh systémů LNA sond pro PCR genů rodiny NF- $\kappa$ B, 3) kolonová metoda izolace celkové RNA z ilea, 4) spektrofotometrické posouzení její koncentrace a čistoty, 5) reverzní transkripce, 6) polymerázová řetězová reakce v reálném čase, 7) potvrzení velikosti amplikonu elektroforézou, 8) stanovení relativní genové exprese za použití referenčních genů.

**Výsledky:** Systémy LNA sond (RelA-85, RelB-1, cRel-63, NF- $\kappa$ B1-63, NF- $\kappa$ B2-21, NF $\kappa$ BIA-27, Bcl3-9, IKK1-7, IKK2-3, NEMO-27) s potvrzením požadované velikosti amplikonu elektroforézou. Mezi skupinami bezmikrobních a konvenčních selat jsme pozorovali rozdíly v aktivaci jednotlivých genů, které však v mnoha případech nebyly statisticky průkazné.

**Závěr:** Navrhli jsme a zavedli systém LNA sond pro stanovení genového přepisu transkripčních faktorů rodiny NF- $\kappa$ B, včetně jeho inhibitorů a aktivátorů. NF- $\kappa$ B se podílí na mechanismech, které hrají ústřední roli v imunitním systému organismu. Regulace je velmi složitá a pro získání odpovídajícího obrazu bude třeba provést další studium na úrovni proteinů.

## ABSTRACT

Sáva Klabačková

Nuclear factor kappa B and inflammatory reaction

Bachelor thesis

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Medical laboratory technician

**Background:** Proposed of LNA probe-based PCR systems for study of NF- $\kappa$ B family-related molecules will make possible a comparison of differences between activation of immune systems of groups of germ-free and conventional piglets. This requires: a purification of total RNA and synthesis of cDNA, PCR, relative quantifications of transcriptions of NF- $\kappa$ B-related molecules and a statistical evaluation of possible differences between piglet groups.

**Methods:** 1) Germfree and conventional piglets, 2) a proposal of PCR systems with LNA probes for genes of NF- $\kappa$ B family and related molecules, 3) a column-based isolation of total RNA from ileum, 4) spectrophotometric evaluation of RNA purity and concentration, 5) a reverse transcription, 6) real-time PCR, 7) an electrophoretic confirmation of amplicons sizes, 8) a relative mRNA expression normalized against reference genes.

**Results:** The LNA probes-based PCR systems for RelA-85, RelB-1, cRel-63, NF- $\kappa$ B1-63, NF- $\kappa$ B2-21, NF $\kappa$ BIA-27, Bcl3-9, IKK1-7, IKK2-3, NEMO-27 of predicted amplicons molecular sizes. Differences in gene transcriptions between germ-free and conventional piglets were found, but they were in some cases non-significant.

**Conclusions:** Several LNA probes-based PCR systems for detection of transcription of NF- $\kappa$ B genes and related molecules were established and evaluated. NF- $\kappa$ B is a key molecule of the activation of the immune system resulted in expressions of signaling and activation molecules as cytokines. The regulation of NF- $\kappa$ B-related molecules is complex system. Its better understanding requires to work also on a protein level that should be the topic of our future work.

# OBSAH

<b>OBSAH</b> .....	<b>5</b>
<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>6</b>
<b>2. LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>7</b>
2.1. IMUNITNÍ SYSTÉM .....	7
2.2. ZÁNĚT .....	7
2.3. JADERNÝ FAKTOR KAPPA B .....	8
2.3.1. <i>Objev NF-<math>\kappa</math>B</i> .....	8
2.3.2. <i>Členové rodiny NF-<math>\kappa</math>B, jejich inhibitory a kinázy</i> .....	9
2.3.3. <i>Struktura NF-<math>\kappa</math>B</i> .....	9
2.3.4. <i>Úloha NF-<math>\kappa</math>B</i> .....	9
2.3.5. <i>Cesty aktivace NF-<math>\kappa</math>B</i> .....	10
2.4. NORMALIZACE GENOVÉHO PŘEPISU .....	11
2.5. IZOLACE RNA .....	12
2.5.1. <i>Měření koncentrace a čistoty RNA</i> .....	13
2.6. REVERZNÍ TRANSKRIPCE .....	14
2.7. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE .....	14
2.7.1. <i>Real-time PCR</i> .....	16
2.7.2. <i>Fluorescence v PCR</i> .....	16
2.8. ELEKTROFORÉZA PCR PRODUKTŮ .....	17
2.9. HOSTITEL A MIKROBIOTA .....	17
<b>3. ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE - CÍL PRÁCE</b> .....	<b>19</b>
<b>4. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>20</b>
4.1. TKÁNĚ .....	20
4.2. NÁVRH LNA SOND A PRIMERŮ .....	20
4.3. IZOLACE CELKOVÉ RNA .....	20
4.4. STANOVENÍ KONCENTRACE A ČISTOTY CELKOVÉ RNA .....	22
4.5. REVERZNÍ TRANSKRIPCE (SYNTÉZA CDNA) .....	22
4.6. POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE V REÁLNÉM ČASE .....	23
4.7. ELEKTROFORÉZA PRODUKTŮ PCR .....	24
4.8. DALŠÍ PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ, LABORATORNÍ POMŮCKY A POUŽITÝ SOFTWARE .....	25
<b>5. VÝSLEDKY</b> .....	<b>26</b>
5.1. NÁVRH LNA SOND A PRIMERŮ .....	26
5.2. ELEKTROFORÉZA PRO OVĚŘENÍ VELIKOSTI AMPLIFIKOVANÉHO ÚSEKU DNA .....	27
5.3. KONCENTRACE A ČISTOTA IZOLOVANÉ RNA .....	27
5.4. STANOVENÍ GENOVÉ EXPRESE .....	28
<b>6. DISKUZE</b> .....	<b>35</b>
<b>7. ZÁVĚR</b> .....	<b>40</b>
<b>8. ZKRATKY A ODBORNÉ TERMÍNY</b> .....	<b>41</b>
<b>9. POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	<b>42</b>
<b>10. PŘÍLOHY</b> .....	<b>47</b>

## 1. ÚVOD

Přibližně před dvaceti pěti lety byly objeveny tři proteiny: klasický NF- $\kappa$ B,  $\nu$ -Rel a Dorsal protein [1-3]. Všechny vykazovaly stejnou vlastnost. Neaktivní formy proteinů se vyskytovaly v cytoplazmě a svojí aktivací byly schopné přejít do jádra. Později se ukázalo, že patří do jedné velké skupiny transkripčních faktorů jaderného faktoru kappa B (NF- $\kappa$ B) [4].

Jaderný faktor kappa B má klíčovou roli v systémech vrozené i získané imunity. Jeho činnost je spojena s různými druhy onemocněními od zánětlivých procesů až po rakovinotvorné bujení. Je zapojen i do mechanismů apoptózy a proliferace. Tento transkripční faktor je schopen aktivovat především prozánětlivé geny a tím spouštět zánětlivou reakci organismu [5].

První studie těchto transkripčních faktorů vedly k překvapivým zjištěním, čímž se zájem o NF- $\kappa$ B jen zvyšoval. Nepřeberné množství článků o jaderném faktoru kappa B v databázi PubMed dokazuje, že dnes patří k nejvíce studovaným genům a proteinům.

V této bakalářské práci se zaměříme na stanovení genové exprese různých členů NF- $\kappa$ B rodiny, jejich inhibitorů a kináz ve tkáních bezmikrobních (GF) a konvenčních (CV) selat. Jako reprezentativní tkáň jsme vybrali terminální ileum. Budeme se zabývat, zda se genový přepis liší ve střevě bez mikrobiální stimulace a střevě osídlené běžnou mikroflórou. Zaměříme se také na to, jestli je nějaký rozdíl mezi různě starými selaty a zda časově delší působení bakterií má nějaký vliv na změnu transkripce NF- $\kappa$ B rodiny. Proto používáme tkáň od jeden den a jeden týden starých zvířat. Naším cílem je zjistit, jestli v normálně osazeném střevě probíhají pochody, které by mohli vést až k rozvoji zánětlivé reakce, na rozdíl u střeva bezmikrobního selete.

Jsme si vědomi, že regulace transkripčních faktorů se děje především na posttranslační úrovni. Přesto jsme se zaměřili na stanovení aktivace genového přepisu. Stanovení genové transkripce se nejčastěji provádí pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR). Jedním z našich cílů je navrhnout systém LNA (locked nucleic acids) sond a příslušných primerů k amplifikaci požadovaných úseků genů NF- $\kappa$ B. Proto se tato práce zabývá i problematikou relativní genové exprese.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1. Imunitní systém

Imunitní systém dokáže v těle rozeznat „cizí“ a „nebezpečné“ jak vnějšího, tak vnitřního původu, a vypořádat se s tím tak, aby nebyl poškozen organismus. Jeho hlavní funkcí je obranyschopnost a udržení homeostázy. Je rozmístěn po celém organismu a místa, kde jsou jednotlivé složky nahromaděny, nazýváme lymfatické tkáně a orgány [6;7].

Orgány, ve kterých buňky imunitního systému vznikají a dozrávají, se nazývají primární lymfatické orgány a patří mezi ně kostní dřeň a thymus. Sekundární orgány jsou místa, kde se imunitní systém setkává s antigenem, a řadíme sem slezinu, apendix, tonzily, Peyerovy pláty, mukózní lymfatickou tkáň a ostatní lymfatické uzliny [6].

### 2.2. Zánět

Organismus na poškození jeho celistvosti reaguje zánětem. Je to soubor fyziologických reakcí, které slouží k jeho obraně, udržení integrity a zhojení poškozené tkáně. Vznik zánětu může mít původ imunologický (mikroorganismy) i neimunologický (chemické a fyzikální vlivy) [6].

Mezi znaky lokálního zánětu patří:

- zčervenání (rubor) - přítomnost většího množství krve v oblasti zánětu,
- bolestivost (dolor) - podráždění nervových zakončení,
- zvýšení teploty (calor) - souvisí s překrvením tkáně,
- zduření (tumor) - zvýšená permeabilita cév, dochází k prostupu tekutin a vzniká otok,
- porušení funkce (functio laesa) - poškození tkáně.

Celkové příznaky zánětu jsou horečka, zvýšený počet leukocytů, zvýšená sedimentace erytrocytů a tachykardie [8].

Podle doby trvání a rozsahu rozeznáváme zánět akutní a chronický. Akutní zánět probíhá několik dní až týdnů, zhojení je úplné a bez následků. Chronický zánět může



trvat měsíce i několik let. Poškozená tkáň je nahrazena vazivem, což snižuje její funkčnost [6].

Vzniku zánětu se účastní mnoho různých látek a buněčných složek odlišného původu. Podílí se na něm systém vrozené i získané imunity, endokrinní, koagulační i autonomní nervový systém [9]. Zánět probíhá ve fázích: alterace, exsudace a proliferace. Regresivní změny probíhající většinou v počátku zánětu nazýváme alterací. Může se jednat pouze o lehké poruchy, ale dokonce i o nekrózu. Z poškozené tkáně se uvolňuje řada látek, které aktivují další procesy. Exsudací rozumíme přestup tekutin, bílkovin a buněk z cév. K tomu dochází díky zvýšené propustnosti cévního endotelu. Dochází k nahromadění leukocytů - neutrofilů, eozinofilů, bazofilů, plazmatických buněk a lymfocytů. Proliferace je projevem reparace tkáně [10].

### **2.3. Jaderný faktor kappa B**

Transkripční jaderný faktor kappa B se objevuje už u kmene žahavců, ne-li ještě dříve. Je překvapivé, že z modelových organismů chybí u kvasinek a háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*). V druhém případě se nejspíše jedná o sekundární ztrátu tohoto genu, protože je přítomen ve více primitivním organismu - mořské sasance *Nematostella vectensis* [11].

Jaderný faktor kappa B je velmi široký a obecný pojem. Můžeme jím myslet, jak NF- $\kappa$ B v rámci všech druhů, tak pouze v savčích buňkách, ale i nejznámější a nejčastější heterodimer p50-RelA. V následujícím popisu se budeme zabývat rodinou NF- $\kappa$ B, která je přítomna u savců. Jedná se o skupinu transkripčních faktorů, které mají mnoho různých účinků a funkcí. Je známa jeho přítomnost při aktivaci prozánětlivých a apoptických genů [4].

#### **2.3.1. Objev NF- $\kappa$ B**

Tento transkripční faktor v roce 1986 objevila výzkumná skupina doktora Baltimora. Ovlivňoval transkripci genu kódujícího lehký řetězec  $\kappa$  imunoglobulinů. Odtud vznikl jeho název [12]. Následně se zjistilo, že je vyvolatelný ve většině buněk a tkáních [13].

### **2.3.2. Členové rodiny NF-κB, jejich inhibitory a kinázy**

Transkripční faktor NF-κB se skládá ze dvou skupin - 'NF-κB' proteiny a 'Rel' proteiny. Do skupiny Rel patří c-Rel, RelB a RelA (často označovaný jako p65). Členové 'NF-κB' jsou NF-κB1 (také známý jako p50 a jeho prekurzor p105) a NF-κB2 (známý jako p52 a jeho prekurzor p100). Tyto proteiny jsou syntetizovány nefunkční a až jejich zkrácením částečnou proteolýzou se stávají aktivní [14].

Všechny transkripční faktory kappa B tvoří homodimery nebo heterodimery, kromě RelB, který je schopen tvořit pouze heterodimery. Tato vysoká rozmanitost velkého počtu dimerů umožňuje rozdílnou regulaci transkripce přepisovaných genů. Dimery se váží na 9-10 párů bází DNA, které mohou být velmi rozmanité a variabilní. Je to sekvence 5'-GGGRNWYYCC-3', kdy R je purin (A nebo G), N může být jakýkoliv nukleotid, W je A nebo T, Y je pyrimidin (C nebo T) [4].

### **2.3.3. Struktura NF-κB**

Všechny tyto proteiny obsahují stejnou konzervativní doménu RHD (Rel homology domain), obsahující okolo 300 aminokyselin. Umožňuje tvorbu dimerů, vazbu na DNA a vazbu inhibitorů NF-κB. Tato doména se vyskytuje na N-terminálním konci a při aktivaci je zodpovědná za translokaci do jádra - obsahuje NLS (jaderný lokalizační signál) [15].

Na C-terminálním konci se vyskytuje transaktivační doména (TAD), která se objevuje jen u proteinů s přímou transkripční aktivitou. Jsou to RelA, RelB a cRel. Proteiny, které jsou syntetizovány jako prekurzory (NF-κB1 a NF-κB2), obsahují na svém C-terminálním konci několikanásobné ankyrinové repetice (obvykle 5-7), které slouží k inhibici těchto proteinů a proteinů, se kterými jsou v dimerech [14;16].

### **2.3.4. Úloha NF-κB**

Aktivita transkripčních faktorů NF-κB je vyvolána více než 210 podněty a reguluje minimálně 150 genů jak vrozené, tak získané imunity [17]. Jedná se o cytokiny, adhezivní molekuly, proteiny akutní fáze, inducibilní enzymy, MHC proteiny, antiapoptické proteiny, regulační proliferační proteiny a další [13;18;19].

Tab. 1. Přehled některých látek, které reguluje dráha NF- $\kappa$ B (převzato a upraveno podle Zhang et al., Barkett et al., Ghosh et al. [13;18;19]).

Zkratka	Název	Funkce
<b>IL-1</b>	Interleukin 1	prozánětlivý, endogenní pyrogen, aktivace dalších mediátorů
<b>IL-2</b>	Interleukin 2	prozánětlivý, aktivace lymfocytů a dalších mediátorů
<b>IL-6</b>	Interleukin 6	stimulace B-buněk, reaktant akutní fáze
<b>IL-12</b>	Interleukin 12	buněčná imunita (NK, Th1, makrofágy)
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama	prozánětlivý, protinádorová a protivirová aktivita
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Faktor nádorové nekrózy alfa	endogenní pyrogen, iniciace a regulace imunitních reakcí
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	Faktor nádorové nekrózy beta	mediátor zánětu, cytotoxická aktivita
<b>GM-CSF</b>	Faktor stimulující granulocyto-makrofágové kolonie	růstový faktor pro makrofágy a granulocytární řadu
<b>VCAM</b>	Cévní adhezivní molekula	přítomnost na aktivovaném endotelu, vazba integrinů
<b>iNOS</b>	Inducibilní syntáza oxidu dusnatého	produkce oxidu dusnatého
<b>COX-2</b>	Cyklooxygenáza-2	inducibilní, tvorba prostaglandinů
<b>MHC</b>	Hlavní histokompatibilní komplex	rozpoznání cizorodých antigenů
<b>C-IAP</b>	Buněčný inhibitor apoptózy	endogenní inhibitory apoptózy
<b>Bcl-2</b>	Rodina Bcl-2 proteinů	proapoptický, regulace propustnosti vnější mitochondriální membrány
<b>Bcl-XL</b>	Bcl-XL	antiapoptický člen rodiny Bcl-2
<b>Cyclin D1</b>	Cyklin D1	proliferační protein buněčného cyklu

### 2.3.5. Cesty aktivace NF- $\kappa$ B

Na aktivaci NF- $\kappa$ B se podílí mnoho různých látek a molekul. Nejdůležitější regulátory jsou inhibitory NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) a kinázový komplex I $\kappa$ B (IKK). Existuje několik inhibitorů s různou afinitou k NF- $\kappa$ B. Mezi I $\kappa$ B se řadí I $\kappa$ B $\alpha$  (NF $\kappa$ BIA), I $\kappa$ B $\beta$  (NF $\kappa$ BIB), I $\kappa$ B $\epsilon$  (NF $\kappa$ BIE) a Bcl3 [14]. Umístění neaktivních jednotek NF- $\kappa$ B v cytoplasmě je dáno právě jeho vazbou s I $\kappa$ B a jeho překryvem NLS. Za to je zodpovědná charakteristická struktura obsahující okolo 5-7 ankyrinových repetic (30-33 aminokyselin), které způsobují vazbu k NF- $\kappa$ B [20].

### **2.3.5.1. Kanonická dráha**

Kanonická dráha, nazývána také jako klasická cesta aktivace NF- $\kappa$ B, je prostudována lépe než další známé cesty aktivace NF- $\kappa$ B. Zahrnuje fosforylaci I $\kappa$ B, což umožní dimerům NF- $\kappa$ B přestup do jádra, navázat se na promotory cílových genů a vyvolat jejich transkripci [21]. Fosforylace I $\kappa$ B probíhá díky kinázovému komplexu IKK, který se skládá z katalytických podjednotek (IKK $\alpha$  a IKK $\beta$ ) a regulačního proteinu NEMO - (NF- $\kappa$ B essential modulator) [20]. Aktivaci může spustit mnoho stimulů zahrnující patogeny, stresové signály, prozánětlivé cytokiny, TNF a IL-1 [22]. Mnoho z nich je rozpoznáváno receptory rozeznávající molekulární vzory (pattern recognition receptors - PRRs), nejznámějšími jsou Toll-like receptory (TLRs) [23]. NF- $\kappa$ B je také stimulován aktivací T-buněčného receptoru (T-cell receptor - TCR) [24]. Všechny tyto stimuly vedou ke kaskádě reakcí, které se schází při aktivaci IKK komplexu, který se tím stává schopen fosforylovat dva seriny v I $\kappa$ B. Dochází k ubikvitinaci I $\kappa$ B. Takto označený inhibitor je odbourán v 26S proteazomu a uvolněné dimery NF- $\kappa$ B se transportují do jádra. Avšak vazba jaderného faktoru kappa B na DNA nestačí k aktivaci cílového proteinu, a je nutná spolupráce dalších transkripčních koaktivátorů [25].

### **2.3.5.2. Nekanonická dráha**

Nekanonická dráha je prostudována méně než klasická dráha, nicméně v poslední době se stále zvyšuje zájem o její pochopení. Nezahrnuje fosforylaci a ubikvitinaci I $\kappa$ B. Je závislá pouze na podjednotce IKK $\alpha$  IKK komplexu a je aktivován pouze dimer p52/RelB [26]. IKK $\alpha$  podjednotka je stimulována NIK (NF- $\kappa$ B-inducing kinase), čím se stává schopna fosforylovat p100, který je v proteazomu zkrácen na p52. Takto se odstraní ankyrinové repetice bránící přemístění do jádra a dimer se může vázat na svá cílová místa [27].

## **2.4. Normalizace genového přepisu**

Pro normalizaci relativní genové kvantifikace se používají referenční geny. Jsou přepisovány na relativně konstantní úrovni v různých podmínkách. Tyto geny musí mít co nejstabilnější expresi ve všech studovaných vzorcích. Nejčastěji se jedná o provozní

geny a produkty kódované těmito geny jsou nezbytné pro základní funkce buňky [28;29].

Tab. 2. Nejčastěji používané referenční geny a jejich funkce (převzato a upraveno podle Vandesompele et al. [29]).

<b>Symbol</b>	<b>Originální název</b>	<b>Přeložený název</b>	<b>Funkce</b>
<b>ACTB</b>	Beta actin	Beta aktin	strukturní protein cytoskeletu
<b>B2M</b>	Beta-2-microglobulin	Beta-2-mikroglobulin	součástí histokompatibilních antigenů 1. třídy
<b>GAPD</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza	oxidoreduktáza v glykolýze a glukoneogenezi
<b>HMBS</b>	Hydroxymethyl-bilane synthase	Hydroxymethylbilan syntáza	syntéza hemu a metabolismus porfyrinu
<b>HPRT1</b>	Hypoxanthinephosphoribosyltransferase 1	Hypoxanthin-fosforibosyltransferáza 1	syntéza purinů
<b>RPL13A</b>	Ribosomal protein L13a	Ribozomální protein L13a	strukturní část podjednotky 60S
<b>SDHA</b>	Succinate dehydrogenase complex, subunit A	Sukcinát dehydrogenáza, podjednotka A	přenašeč elektronů v citrátovém cyklu a dýchacím řetězci
<b>TBP</b>	TATA box binding protein	TATA box vazebný protein	transkripční faktor RNA polymerázy II
<b>UBC</b>	Ubiquitin C	Ubikvitin C	degradační protein
<b>YWHAZ</b>	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	Tyrosin-3-monooxygenázový/tryptofan-5-monooxygenázový aktivační protein	přenos signálů molekul fosforylací serinových zbytků

## 2.5. Izolace RNA

K extrakci RNA se používá několik postupů, které využívají odlišné principy. Jsou to metody založené na rozdílné rozpustnosti, centrifugaci v hustotním gradientu a metody adsorpční nejčastěji s použitím kolonek. Pro úspěšnou izolaci je nejdříve nutné rozrušit buňky destrukcí buněčných membrán, aby se vyplavil cytosolový i jaderný obsah. K tomu slouží detergenty (např. Triton X-100) i mechanická lýza buněk v homogenizátoru či v třepačce s kuličkami. Pro odstranění přítomné DNA může být součástí kitu i DNáza I, která způsobí degradaci kontaminující DNA [30].

Mezi nejznámější metody izolace patří fenol-chloroformová extrakce (v současnosti již nepříliš používaná). Jejím principem je precipitace guanidin thiokyanátem s fenolem v nízkém pH [31]. Metoda využívající ultracentrifugaci se provádí v prostředí CsCl s guanidin thiokyanátem [32]. Většina komerčních souprav používá však kolonovou metodu. Je založena na zadržování RNA na silikátovém povrchu kolonky díky přítomnosti chaotropních solí. Na uvolnění RNA z kolonky se používá eluční roztok s vysokou iontovou silou bez obsahu chaotropních solí [33]. Pro přímou izolaci mRNA se kolonka modifikuje přítomností navázaných poly T-řetězců. Obdobný princip je u magnetické separace, kdy mohou být poly T-řetězce navázány na paramagnetické kuličky. Tyto soupravy jsou běžně komerčně dostupné a dají se koupit např. od firmy Stratec Molecular (Berlin, SRN).

### **2.5.1. Měření koncentrace a čistoty RNA**

Pro další práci s izolovanou RNA je třeba znát její čistotu a koncentraci. Nejběžnější způsob měření koncentrace RNA je použití spektrofotometrického měření v UV světle. Využívá se výpočtu poměru hodnot absorpčních při vlnových délkách 260 nm (absorpční maximum nukleových kyselin) a 280 nm (absorpční maximum bílkovin a aromatických sloučenin). Pro čistou RNA požadujeme poměr okolo 2,0. Nižší hodnota značí znečištění proteiny a je třeba vzorek přečistit. Pro stanovení pozadí se proměřuje absorbance při 320 nm pro možný vliv zakaleného vzorku, pufrů a použité kyvety. Tato hodnota by měla být co nejnižší a blížit se nule. Pro kontrolu čistoty se také používá proměření absorpčních při 230 nm, zvýšená hodnota při této vlnové délce ukazuje na znečištění vzorku. Je to absorpční maximum peptidových vazeb, různých pufrů (Tris, EDTA) a obecně se uvádí jako znečištění guanidin thiokyanátem. Při vlnové délce 260 nm při použití kyvety s optickou dráhou 10 mm roztok s absorpční 1,0 by odpovídal koncentraci 40 µg/ml RNA. Kdyby byly v roztoku přítomny obě nukleové kyseliny, nedala by se koncentrace změřit, protože mají stejné absorpční maximum. Proto je vždy nutné během izolace nežádoucí nukleovou kyselinu odstranit [30;34].

Při znečištěném vzorku nebo při nízké koncentraci volíme měření fluorescence specifickými fluorochromy vázajícími se na RNA (např. Quant-iT™ RiboGreen® RNA reagent firmy Life Technologies) s porovnáním kalibrační řady standardů.

## 2.6. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces katalyzovaný enzymem reverzní transkriptáza, při němž se podle RNA, která slouží jako templát, syntetizuje jednořetězcová DNA - vzniká cDNA (complementary DNA). Jedná se o opak normální transkripce, o zpětný přepis RNA do DNA [35].

Používané enzymy mohou být izolovány pouze z virů, protože v jiných organismech se reverzní transkriptázy nevyskytují. Nejčastěji se používá AMV (Avian Myeloblastosis Virus) z ptačího myeloblastického viru a MLV (Moloney Leukemia Virus) z myšího leukemického viru Moloney [36;37].

Pro začátek transkripce jsou zapotřebí primery. Používá se několik druhů. Bývají to náhodné n-mery, které dosedají náhodně na sekvenci RNA, oligo (dT) primery, které jsou komplementární k polyadenylovému 3'- konci mRNA, a specifické primery komplementární k námi požadované specifické sekvenci [30;38].

## 2.7. Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je od svého objevení jedna z nejpoužívanějších metod molekulární biologie [39]. Jedná se o extrémní namnožení krátkých sekvencí DNA, jehož cílem je detekce hledaných amplifikovaných úseků DNA. Klasické schéma PCR spočívá v cyklickém opakování třech kroků založených na změně teploty.

1. Denaturace - při teplotě okolo 95 °C dochází k rozrušení vodíkových můstků mezi vlákny DNA a tím je umožněno jejich rozvolnění a oddělení od sebe.
2. Annealing primerů - při teplotě okolo 50-60 °C dva primery o známé sekvenci nasedají na vlákno templátové DNA.
3. Elongace (extenze) - okolo teploty 72 °C enzym DNA polymeráza umožní prodlužování řetězce a tím syntézu nového vlákna DNA [34].

Používaná DNA polymeráza musí být tepelně stabilní, a proto se nejčastěji používá DNA polymeráza izolovaná z termofilní bakterie *Thermus Aquaticus* [40]. Před objevením tohoto enzymu se používal Klenowův fragment DNA polymerázy I. Tento enzym není schopen vydržet teploty potřebné pro denuraci vláken, a proto musel být

do reakce v každém cyklu přidáván. To je nevýhodné jak časově, tak je zde zvýšené riziko kontaminace vzorku [39].

Do dnešní doby bylo vyvinuto mnoho modifikací klasické PCR. Jako příklady se dají uvést:

Hot Start PCR - DNA polymeráza se stává aktivní až při první denaturační teplotě a tím se zabrání vzniku a namnožení nespecifických nežádoucích produktů,

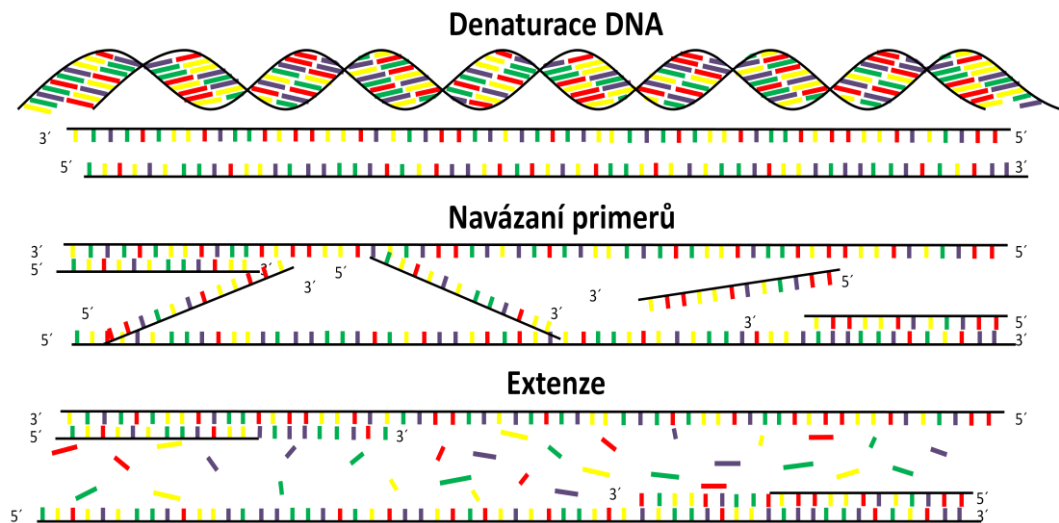
Nested PCR - použití vnitřních a vnějších primerů pro větší citlivost,

Multiplex PCR - použití více párů primerů pro namnožení více genů současně v jediné reakci,

Asymetrická PCR - jeden z primerů je ve velkém nadbytku a proto se tvoří pouze jednovláknová DNA,

Alelově specifická PCR - používá se pro detekci bodových mutací a určení heterozygota/homozygota,

Zpětná (reverzní) PCR - jako templát se používá cDNA, která vzniká reverzní transkripcí z RNA [30].



Obr. 1. Obecný princip PCR (vlastní tvorba, inspirováno podle Vierstraete [41]).



### **2.7.1. Real-time PCR**

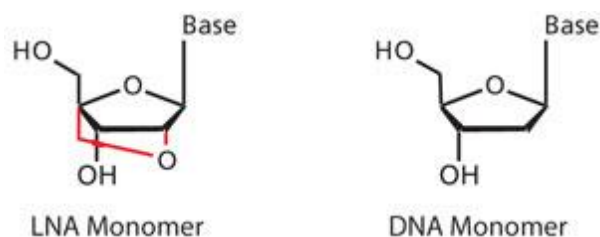
Real-time polymerázová řetězová reakce je v posledním desetiletí nejpoužívanější metodou molekulární biologie. Real-time PCR je založena na principu klasické PCR, umožňuje však průběžně s postupem reakce sledovat vzrůstající množství amplifikované sekvence DNA ve skutečném čase. Tím se liší od běžné PCR, kde se analyzuje až výsledný produkt (amplifikovaná DNA) – „end point“ pomocí elektroforézy v agaróze. Záznam amplifikace je založen na principu fluorescence. Používají se sondy (fluorescenční sondy), které se jsou vázány na amplifikované DNA, a v každém cyklu je změřeno zvýšení fluorescence [42].

### **2.7.2. Fluorescence v PCR**

Používané principy lze zařadit do dvou hlavních skupin. Specifické sondy ve své struktuře mají oligonukleotidový řetězec, kterým se hybridizují k PCR amplikonu. Např. hydrolyzační sondy pracují na principu FRET (fluorescence resonance energy transfer) mezi fluorescenčním barvivem (fluorofor - F nebo R) a zhasěčem (quencher - Q). Při průběhu reakce dochází k rozštěpení sondy polymerázou, a tím se zvýší vzdálenost mezi molekulami R a Q – dochází k nárůstu fluorescenčního záření. Na rozdíl od specifické vazby sond se interkalační „barvičky“ (např. ethidium bromid a SYBR Green) nespecificky vážou na dvouvláknovou DNA [34].

#### **2.7.2.1. LNA sondy**

LNA (locked nucleic acids) sondy jsou specifické hydrolytické sondy, pro které je charakteristické, že ve své stavbě mají pozměněnou strukturu nukleotidů – mezi 2' C a 4' C pentózy je vložen methylenový můstek. Tento můstek zvyšuje teplotní stabilitu monomeru (zvýšení teploty tání až o 8°C na jeden LNA monomer) a snižuje jeho pružnost, což zajišťuje silnější vazbu s komplementární sekvencí. Klasické sondy obsahují okolo 25 až 35 bází, LNA sondy jsou výrazně kratší (8-9 nukleotidů) [43]. O zavedení LNA sond se přičinila firma Exiqon a o jejich rozšíření firma Roche, která tento systém koupila od Exiqonu.



Obr. 2. Struktura LNA a DNA monomeru (upraveno podle Anonym 1 [44]).

## 2.8. Elektroforéza PCR produktů

Při elektroforéze dochází k pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Je to metoda, která využívá různé pohyblivosti molekul k jejich separaci. Umožňuje separaci, analýzu a purifikaci nukleových kyselin (NA) a proteinů. U NA se elektroforéza provádí obvykle po PCR nebo po štěpení restrikčními endonukleázami. Separace probíhá podle velikosti fragmentů. Proteiny se dělí podle molekulární hmotnosti, která je určována markery molekulových hmotností (u DNA počet nukleotidů /nt/ nebo nukleotidových párů /bp/). Fragmenty NA jsou pipetou vloženy do jamek gelu (agarózový nebo polyakrylamidový gel). Po zapojení obvodu je spuštěn elektrický proud a díky němu jsou záporně nabitě NA směřovány k anodě. Doba elektroforézy závisí na velikosti proudu, který gelem prochází. Po proběhnutí elektroforézy jsou látky rozděleny na základě své molekulové hmotnosti [30;34].

## 2.9. Hostitel a mikrobiota

U savců se embrya a plody vyvíjejí ve sterilním prostředí - v děloze matky. Jejich kolonizace mikroorganismy probíhá bezprostředně po narození, kdy jsou osídlovány slizniční povrchy a to hlavně střevo [45]. Velmi důležitý faktor pro vývoj imunitního systému a to především po narození, je jeho stimulace antigenními podněty. Je to z důvodu, že nezrálý organismus může podlehnout vlivům mikroorganismů, které jsou pro nás při běžných podmínkách (dostatečně vyvinutý imunitní systém a osídlení střev) komenzální, ale při jejich přemnožení se mohou stát až život ohrožující [46;47].

Z tohoto důvodu je velmi důležitá strava novorozenců. Nejvhodnější výživa je kolostrum a později mateřské mléko, které obsahuje ochranné protilátky (imunoglobuliny) a růstové faktory důležité pro rozvoj střevní sliznice (např. epiteliální růstový faktor). Nezbytnost příjmu kolostra popřípadě mateřského mléka je dána typem placentace. U člověka s hemochoriální placentou dochází k prenatálnímu přestupu většiny imunoglobulinů třídy G [48]. To je odlišnost od syndesmochoriální (přežvýkavci) a epiteliochoriální (prase, slon, tapír a další) placentace [49]. Novorozená mláďata jsou proto pro své přežití v konvenčním prostředí závislá na včasném přísunu kolostra a dostatečném množství imunoglobulinů, které jsou v něm obsaženy. Odlišná situace nastává v případě, že novorozená mláďata jsou získána asepticky a chována ve sterilním prostředí. V takovém případě pro přežití novorozených mláďat nejsou ochranné imunoglobuliny nezbytné. Toho se využívá pro experimentální účely získáním bezmikrobních a mikrobiálně definovaných (gnotobiotických) zvířat, které můžeme osadit jen námi vybranými mikroorganismy a sledovat jejich účinek na organismus a mezi sebou navzájem, bez výrazného vlivu běžně přítomné mikrobioty [50].

### 3. ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE - CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce je kvantifikace přepisu genů NF- $\kappa$ B rodiny a s nimi souvisejících molekul pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase a zhodnocení možné odlišnosti exprese těchto genů u bezmikrobních a konvenčních selat.

Mezi dílčí cíle patří:

- 1) vyhledání nukleotidových sekvencí genů NF- $\kappa$ B rodiny a s nimi souvisejících molekul v databázi PubMed,
- 2) navržení detekčních systémů s LNA sondami pro vybrané geny NF- $\kappa$ B rodiny a s nimi související molekuly,
- 3) zjištění účinnosti systémů LNA sond a jejich porovnání,
- 4) ověření velikosti amplikonu elektroforézou v polyakrylamidovém gelu,
- 5) izolace celkové RNA z ilea bezmikrobních a konvenčních selat,
- 6) kvantifikace izolované celkové RNA a určení její čistoty,
- 7) přepis izolované RNA reverzní transkripcí do cDNA,
- 8) amplifikace specifických sekvencí a vyhodnocení rozdílů pro bezmikrobní a konvenční organismus.

## **4. MATERIÁL A METODY**

### **4.1. Tkáně**

RNA jsme izolovali z ilea bezmikrobních a konvenčních selat. Bezmikrobní selata byla získána chirurgicky hysterektomií 112. den březosti miniprasnice a chována ve sterilním sklolaminátovém izolátoru a krmena mléčnou dietou [51]. Konvenční selata se narodila spontánním porodem a byla kojena matkou. Vzorky tkání se selatům odebíraly při pitvě a uchovávaly se v RNAlater při -20 °C do dalšího zpracování.

Vzorky pocházejí od 21 selat, která byla rozdělena do 4 skupin – 1) jednodenní bezmikrobní selata, 2) týdenní bezmikrobní selata, 3) jednodenní konvenční selata a 4) týdenní konvenční selata.

### **4.2. Návrh LNA sond a primerů**

LNA sondy a primery jsme navrhli pomocí několika online databází a softwarů.

Sekvence vybraných genů NF- $\kappa$ B jsme vyhledali v databázi Pubmed dostupné na [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com) (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda, USA). Pro zjištění, zda gen neobsahuje sekvence, které jsou příliš časté a neopakují-li se ve více genech (nejsou tedy specifické pro námi hledaný gen), jsme použili software Repeat Masker (Institute for Systems Biology, Seattle, USA) dostupný na [www.repeatmasker.org](http://www.repeatmasker.org). Pro návrh vhodných sond jsme využili software ProbeFinder firmy Roche Diagnostic (Manheim, SRN) dostupný na [www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com).

Od každého genu jsme vybrali dva systémy a objednali k nim náležící primery od firmy Generi-Biotech (Hradec Králové, ČR).

### **4.3. Izolace celkové RNA**

K izolaci celkové RNA jsme použili kit InviTrap Spin Tissue RNA Mini Kit (Stratec Molecular, Berlín, SRN). Veškerou práci jsme prováděli v rukavicích a v

laminárním boxu (CleanAir Technik, Woerden, Nizozemsko) při pokojové teplotě, kdy teplota nesmí klesnout pod 20 °C a to ani při centrifugaci. Postup byl následující:

1. Do 2 ml eppendorfek (RNase/DNase free) dát zirkonové kuličky v poměru asi 1:3.
2. Přidat 600 µl Lysis Solution TR (před použitím lehce protřepat kvůli sedimentujícím částicím pro vazbu DNA). Těsně před použitím přidat do Lysis Solution TR 1/100 objemu 1 M dithiotreitolu (DTT).
3. Kousek tkáně o velikosti přibližně 2×2 mm z RNAlater (při použití čerstvé tkáně 3×3 mm) vložit do eppendrofky s Lysis Solution TR a zirkonovými kuličky.
4. Homogenizace v TissueLyseru LT 5 minut při 50 Hz.
5. Centrifugace v centrifuze Hettich Micro R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, SRN) po 2 minuty při 15 000 × g.
6. 450 µl supernatantu přenést do 2 ml Receiver Tube a přidat 300 µl 96-100 % etanolu a promíchat pipetováním.
7. Celý objem přemístit do RTA Spin Filter Set kolonky, inkubace 1 minutu a centrifugovat 1 minutu při 10 000 × g. Vylít to, co prošlo kolonkou.
8. Přidat 500 µl Wash Buffer R1 (před prvním použitím přidat odpovídající množství absolutního etanolu) do Spin Filter Set kolonky a centrifugovat 30 vteřin při 10 000 × g. Vylít, to co prošlo kolonkou.
9. Přidat 700 µl Wash Buffer R2 (nutno přidat před prvním použitím předepsané množství absolutního etanolu), centrifugace 30 vteřin při 10 000 × g a vylít to, co prošlo kolonou. Opakovat tento krok.
10. Centrifugace 5 minut při 13 500 × g. Vyhodit Receiver Tube.
11. Přendat Spin Filter set kolonku do Rnase-free Elution Tube a přidat 40 µl Elution Buffer přímo na membránu.
12. Inkubace 2 minuty a centrifugace 1 minutu při 10 000 × g.
13. Vyhodit Spin Filter Set kolonku, eluovanou RNA přenést do nových sterilních eppendorfek.

#### 4.4. Stanovení koncentrace a čistoty celkové RNA

Pro měření koncentrace vyizolované RNA jsme použili UV/VIS spektrofotometr (Pharmacia LKB, Upsala, Švédsko). Měřili jsme absorbanci vzorku při 230 nm, 260 nm, 280 nm a 320 nm. Používali jsme kyvetu z křemenného skla o šířce 1 cm. Příprava vzorku na měření absorbance:

1. Napipetovat 200  $\mu$ l blanku (Tris-HCl, pH 7,5) do kyvety a změřit.
2. K 20  $\mu$ l vyizolované RNA přidat 180  $\mu$ l Tris-HCl, pufru o pH 7,5 (naředit 10  $\times$ ).
3. Změřit absorbance vzorků při všech vlnových délkách (230, 260, 280 a 320 nm) a provést výpočet koncentrace a čistoty.

$$\text{Koncentrace} = (A_{260} - A_{320}) \times 40 \times \text{ředicí faktor} \text{ } [\mu\text{g/ml}]$$

$$\text{Čistota} = (A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$$

#### 4.5. Reverzní transkripce (syntéza cDNA)

Pro syntézu cDNA jsme použili kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, SRN) a využili cykler iCycler (Bio-Rad, Hercules, USA). Syntéza cDNA probíhala ve dvou krocích. Postup byl následující:

1. Přidat potřebné reagensie do 200  $\mu$ l tenkostěnné zkumavky pro PCR podle následující tabulky:

Reagensie	Objem ( $\mu$ l)
gDNA Wipeout Buffer 7x	2
PCR voda	2
RNA templát	10
Celkový objem	14

2. Zkumavku lehce zamíchat a krátce centrifugovat.
3. Inkubace v termocykleru při 42  $^{\circ}$ C po dobu 2 minut.
4. Zkumavku přendat na led a přidat reagensie podle následující tabulky:

Reagencie	Objem (μl)
Quantisript RT	1
Quantisript RT Buffer 5x	4
RT Primer Mix	1
<b>Celkový objem</b>	<b>6</b>

5. Zkumavku lehce zamíchat a krátce centrifugovat.
6. Inkubace v termocykleru 20 minut při 42 °C.
7. Inaktivace reverzní transkriptázy 3 minuty při 95 °C.
8. Inkubace 5 minut při 4 °C.
9. Pro použití cDNA jako templát do PCR přidat 180 μl PCR vody.
10. Pro přípravu cDNA pro zjištění účinnosti systémů LNA sond připravit ředící řadu, kdy každý další vzorek bude 10 × naředěn.

#### **4.6. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase**

K PCR jsme používali komerční master mix FastSart TaqMan Probe Master (Roche Applied Science, Penzberg, SRN). Postup byl následující:

1. Příprava primerů: lyofilizované primery zcentrifugovat a přidat předepsané množství PCR vody, promíchat a centrifugovat.
2. Podle tabulky připravíme reakční směs:

Reagencie	Objem (μl)
FastStart Universal Probe Master 2x	10
PCR voda	7,6
Směs primerů	0,2
LNA sonda	0,2
<b>Celkový objem</b>	<b>18</b>

3. Reakční směs protřepat a zcentrifugovat.
4. Směs rozpipetovat po 18 μl do 96-jamkové destičky pro PCR.



5. Přidat 2  $\mu$ l cDNA do každé jamky.
6. Destičku přelepit folií, zcentrifugovat, protřepat a znovu centrifugovat.
7. Uložit destičku do termocykleru iQ5 a nastavit následující teplotní režim:

krok 1	95 °C	10 minut	1 ×
krok 2	95 °C	15 vteřin	50 ×
	60 °C	60 vteřin	
krok 3	4 °C	$\infty$	1 ×

8. PCR vyhodnotit pomocí softwaru iQ5 Optical System Software (Bio-Rad).

#### 4.7. Elektroforéza produktů PCR

Pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu jsme použili elektroforetickou jednotku X-Cell Sure Lock (Life Technologies, Carlsbad, USA). Postup byl následující:

1. Příprava markeru DNA Marker Ultra Low marker (Fermentas, Vilnius, Litva): Smíchat 2,5  $\mu$ l DNA ladderu, 1  $\mu$ l pufru TBE Sample 5X a 1,5  $\mu$ l vody.
2. Příprava vzorků:: smíchat 3  $\mu$ l produktu PCR, 2  $\mu$ l pufru TBE Sample 5X a 5  $\mu$ l PCR vody.
3. TBE Running Buffer 5x naředit k použití (100 ml pufru na 400 ml vody).
4. Polyakrylamidový gel (Life Technologies) opláchnout deionizovanou vodou.
5. Gel vložit do elektroforetické jednotky a nalít TBE Running Buffer.
6. Jamky propláchnout TBE Running Buffer.
7. Do jamek pipetovat 5  $\mu$ l markeru a 10 $\mu$ l vzorku.
8. Spustit elektroforézu po dobu 30 minut při 200 V.
9. Gel obarvit pomocí Midori Green (Nippon Genetics Europe, Düren, SRN). Barvicí roztok připravit smícháním 2  $\mu$ l Midori Green v 12 ml TBE Running pufru. Barvit 10 minut. Dvakrát opláchnout deionizovanou vodou.
10. Obarvený gel pozorovat iluminátorem Fast Gene LED Illuminator (Nippon Genetics Europe).

#### **4.8. Další přístrojové vybavení, laboratorní pomůcky a použitý software**

Dále jsme používali jednokanálové pipety Finpipette Digital a poloautomatickou pipetu Bio Control (Thermo Fischer, Helsinky, Finsko), třepačka a stolní minicentrifugu (Labnet, Edison, USA).

Seznam citací jsme vytvořili v programu Reference Manager 12.0.3. (Thomson Reuters Carlsbad, USA), tvorba tabulek v Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, USA), psaní textu v Microsoft Word 2007 (Microsoft Corporation), tvorba grafů v GraphPadPrism 6.04 (GraphPad Software, San Diego, USA), statistické vyhodnocení dat v GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software).

## 5. VÝSLEDKY

### 5.1. Návrh LNA sond a primerů

V následující tabulce jsou zobrazeny vybrané geny NF- $\kappa$  B rodiny, jeho inhibitorů, kináz a referenčních genů a jejich navržený systém LNA sond a primerů. Pro každý gen jsme navrhli dva systémy – celý seznam navržených systému je v přílohách.

Tab. 7. Použité systémy LNA sond a primerů.

Gen	Sonda	Forward primer (5'-3')	Velikost ampliconu (nt)	Účinnost (%)
		Reverse primer (5'-3')		
<b>RelA</b>	85	ACCTGGGGATCCAGTGTGTA	79	103,1
		AAGGGGTTGTTGTTGGTCTG		
<b>RelB</b>	1	TCTTCCCAGGCACTGTATCC	72	96,5
		CAAAACCATCGTCCAGGAG		
<b>cRel</b>	63	TGTCGTGTAATAAGAACTGTGGAA	93	92,8
		CCGAACTTCTATGTCATCTTTCTGT		
<b>NF-<math>\kappa</math>B1</b>	63	GGATGAGGTGCATCTGACG	71	96,3
		GAAAGAGGTTATCCTGGAACCTG		
<b>NF-<math>\kappa</math>B2</b>	21	CTCCTGGAGCCTCAAACCT	96	103,2
		GCACCTTGTCACAAAGCAGA		
<b>NF<math>\kappa</math>BIA</b>	27	GCACCTTGTCACAAAGCAGA	65	99,2
		CTGAGTCAGGACTCCCACACT		
<b>NEMO</b>	27	AAGCCAACCATGCTCCAC	89	101,0
		GCATCTCGGAGCTCTTGATT		
<b>IKK1</b>	7	TCCAAAGTGTATATTTGCATGTGA	72	94,2
		TTTGGTTGAGGTAAATGGCTACT		
<b>IKK2</b>	3	TTTGGTTGAGGTAAATGGCTACT	115	99
		TCCAGGTCAATCTGGATGCT		
<b>Bcl3</b>	9	AGCTCCAACGGTCTTCTGTC	77	100,3
		GAGAATCCAGGGGTGTCCTT		
<b>BACT</b>	9	TCCCTGGAGAAGAGCTACGA	83	107,2
		AAGAGCGCCTCTGGACAC		
<b>CYKLO</b>	48	CCTGAAGCATAACGGGTCCT	121	93,4
		AAAGACCACATGTTTGCCATC		

## 5.2. Elektroforéza pro ověření velikosti amplifikovaného úseku DNA

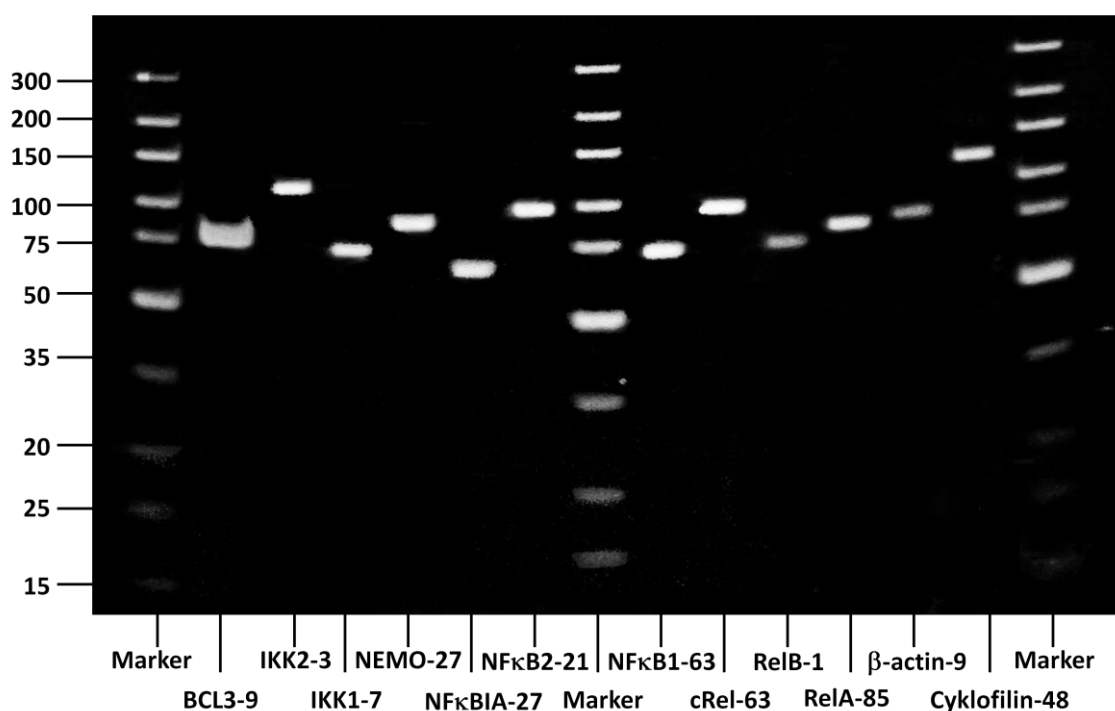
V tabulce jsou uvedeny požadované velikosti úseků DNA.

Tab. 8. Požadované velikosti ampliconů.

Název genu	Cyklofilin-48	$\beta$ -aktin-9	RelA-85	RelB-1	cRel-63	NF- $\kappa$ B1-63
Velikost ampliconu (nt)	121	83	79	72	93	71

Název genu	NF- $\kappa$ B2-21	NF $\kappa$ BIA-27	NEMO-27	IKK1-7	IKK2-3	Bcl3-9
Velikost ampliconu (nt)	96	65	89	72	115	77



Obr. 3. Elektroforéza PCR produktů v polyakrylamidovém gelu.

## 5.3. Koncentrace a čistota izolované RNA

Následující tabulka ukazuje naměřené hodnoty absorbance při vlnových délkách 230 nm, 260 nm, 280 nm a 320 nm. Pro posouzení čistoty nám slouží vypočítaný poměr hodnot 260/230 a 260/280. Dále je v tabulce zobrazena vypočítaná hodnota potřebného objemu RNA a vody pro syntézu cDNA.

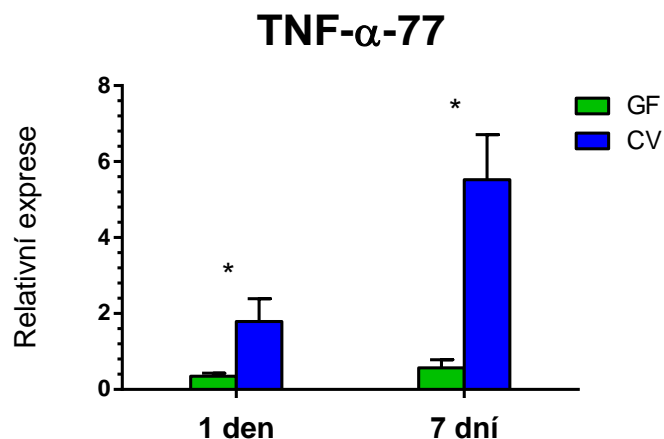
Tab. 9. Koncentrace a čistota RNA.

Sele	Syntéza cDNA		Izolace celkové RNA			Absorbance			
	H <sub>2</sub> O	0,5µg RNA	Konc.	Poměry		230	260	280	320
	[µL]	[µL]	[µg/µL]	260/280	260/230				
859/3 GF 1 IL	<b>8,0</b>	<b>2,0</b>	0,248	2,12	2,02	0,311	0,624	0,297	0,004
859/4 GF 1 IL	<b>9,2</b>	<b>0,8</b>	0,626	2,11	2,26	0,705	1,576	0,751	0,011
859/5 GF 1 IL	<b>6,2</b>	<b>3,8</b>	0,130	2,11	2,03	0,164	0,329	0,158	0,004
860/5 GF 1 IL	<b>7,6</b>	<b>2,4</b>	0,208	2,10	1,92	0,273	0,522	0,250	0,003
860/6 GF 1 IL	<b>6,5</b>	<b>3,5</b>	0,142	2,10	1,10	0,326	0,357	0,171	0,002
CV1 1 IL	<b>-1,7</b>	<b>11,7</b>	0,043	2,23	2,10	0,054	0,110	0,051	0,003
CV2 1 IL	<b>7,7</b>	<b>2,3</b>	0,215	2,13	2,34	0,238	0,546	0,261	0,009
CV3 1 IL	<b>7,4</b>	<b>2,6</b>	0,196	2,13	1,54	0,328	0,500	0,240	0,010
CV4 1 IL	<b>9,1</b>	<b>0,9</b>	0,537	2,14	2,20	0,622	1,354	0,640	0,012
860/0 GF 7 IL	<b>8,5</b>	<b>1,5</b>	0,327	2,12	1,96	0,422	0,822	0,390	0,004
860/2 GF 7 IL	<b>8,6</b>	<b>1,4</b>	0,364	2,12	1,67	0,553	0,919	0,439	0,009
837/2 GF 7 IL	<b>8,0</b>	<b>2,0</b>	0,256	2,11	1,43	0,452	0,644	0,308	0,004
837/4 GF 7 IL	<b>5,4</b>	<b>4,6</b>	0,108	2,00	0,40	0,673	0,270	0,135	0,011
837/7 GF 7 IL	<b>5,9</b>	<b>4,1</b>	0,121	2,11	1,00	0,304	0,303	0,144	0,001
837/9 GF 7 IL	<b>1,2</b>	<b>8,8</b>	0,057	2,09	0,72	0,198	0,144	0,070	0,002
CV1 7 IL	<b>9,3</b>	<b>0,7</b>	0,670	2,14	2,30	0,736	1,682	0,790	0,008
CV2 7 IL	<b>9,3</b>	<b>0,7</b>	0,764	2,14	2,16	0,873	1,918	0,918	0,008
CV3 7 IL	<b>9,5</b>	<b>0,5</b>	0,971	2,12	2,29	1,140	2,446	1,152	0,018
CV4 7 IL	<b>9,0</b>	<b>1,0</b>	0,506	2,13	2,27	0,562	1,275	0,607	0,011
CV5 7 IL	<b>9,1</b>	<b>0,9</b>	0,553	2,06	2,23	0,617	1,392	0,658	0,009
CV6 7 IL	<b>9,5</b>	<b>0,5</b>	1,094	2,10	1,44	1,239	2,748	1,341	0,014

#### 5.4. Stanovení genové exprese

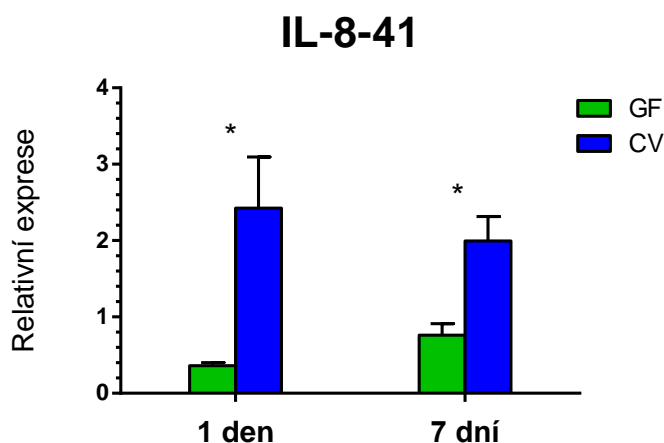
Aktivace jednotlivých genů byla vztahována (normalizována) k referenčním genům cyklofilinu A a β-aktinu a relativizována k průměrné hodnotě všech případů. Statistické vyhodnocení dat bylo provedeno nepárovým t-testem. V grafech jsou zobrazeny střední chyby průměru a hladiny významnosti (\* -  $\alpha \leq 0,05$ , \*\* -  $\alpha \leq 0,01$ , \*\*\* -  $\alpha \leq 0,001$ ).

Pro vyhodnocení exprese NF-κB a s ním souvisejících molekul, jsme provedli i stanovení TNF-α a IL-8.



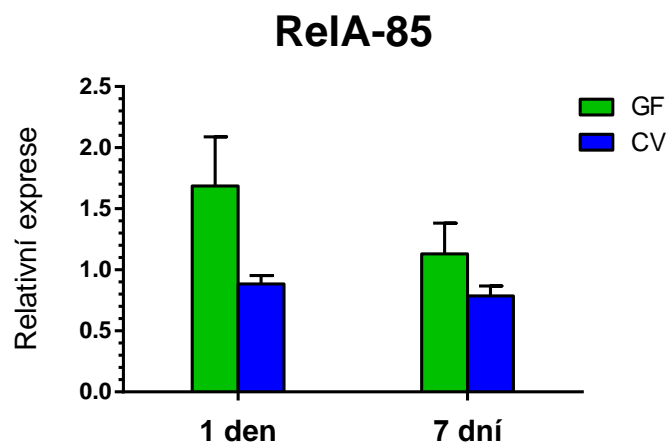
Obr. 4. Graf aktivace transkripce TNF- $\alpha$ .

Aktivace přepisu TNF- $\alpha$  (obr. 4.) byla výrazně vyšší u ilea konvenčních selat, u bezmikrobních byl přepis velmi nízký. Nejvýraznější exprese byla u 7-denních konvenčních selat, nižší u 1-denních konvenčních selat. Výsledky u obou skupin jsou statisticky významné.



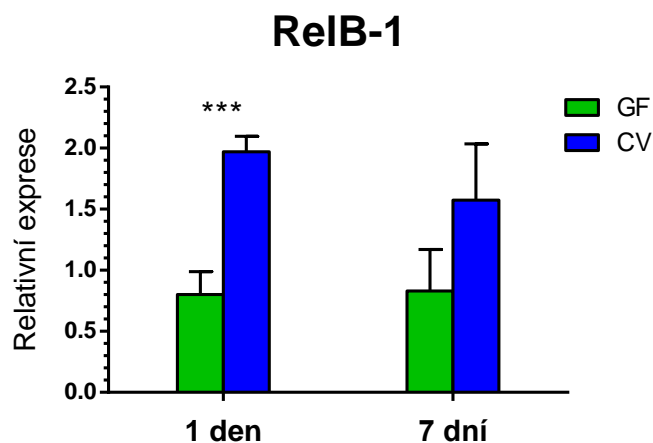
Obr. 5. Graf aktivace transkripce IL-8.

Gen IL-8 (obr. 5.) byl přepisován nejvíce u konvenčních selat, nejvýrazněji u 1-denních. Exprese u bezmikrobních selat byla nižší. Výsledky jsou u obou skupin statisticky významné.



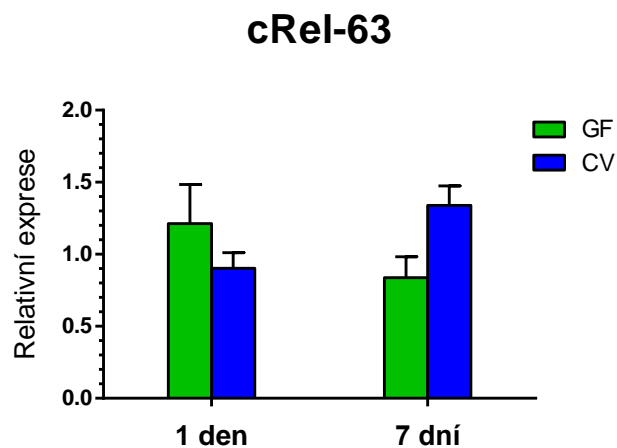
Obr. 6. Graf aktivace transkripce RelA.

Přepis genu RelA (obr. 6.) byl vyšší u bezmikrobních selat. Nejvyšší aktivace je u skupiny 1-denních bezmikrobních selat. Přepis u obou skupin konvenčních selat je vyrovnaný. Výsledky u obou skupin nejsou statisticky významné.



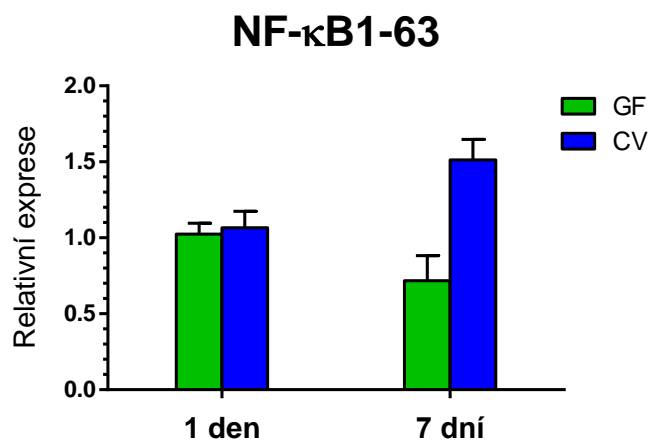
Obr. 7. Graf aktivace transkripce RelB.

Gen RelB (obr. 7.) byl nejvíce přepisován u konvenčních selat, nejvýrazněji u 1-denních. Aktivace u 1- i 7-denních selat byla vyrovnaná. Výsledky 1-denních selat jsou extrémně významné, u 7-denních selat nevýznamné.



Obr. 8. Graf aktivace transkripce cRel.

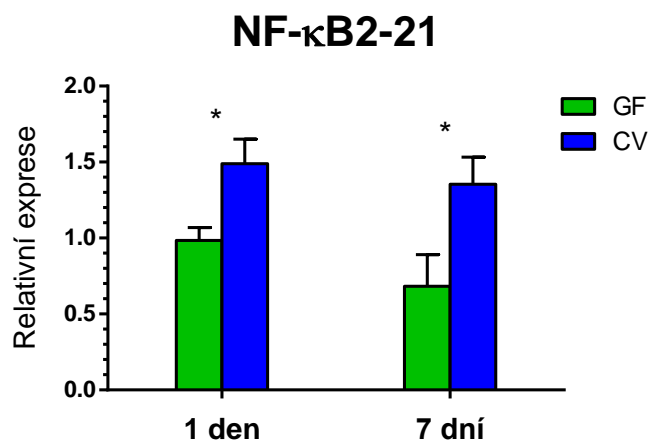
Expresa genu cRel (obr. 8.) byla u skupiny 1-denních selat vyšší u bezmikrobních selat. U skupiny 7-denních selat byl trend opačný. Výsledky u obou skupin nejsou statisticky významné.



Obr. 9. Graf aktivace transkripce NF- $\kappa$ B1.

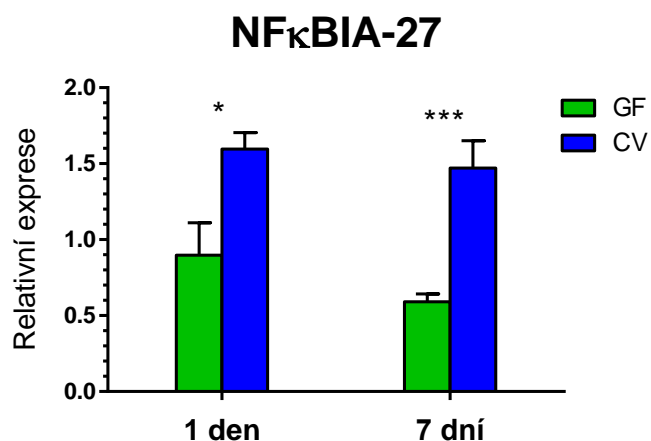
Gen NF- $\kappa$ B1 (obr. 9.) byl u skupiny 1-denních selat přepisován vyrovnaně u bezmikrobních i konvenčních selat. U 7-denních selat byla transkripce vyšší u konvenčních selat. Výsledky jsou statisticky nevýznamné u obou skupin.





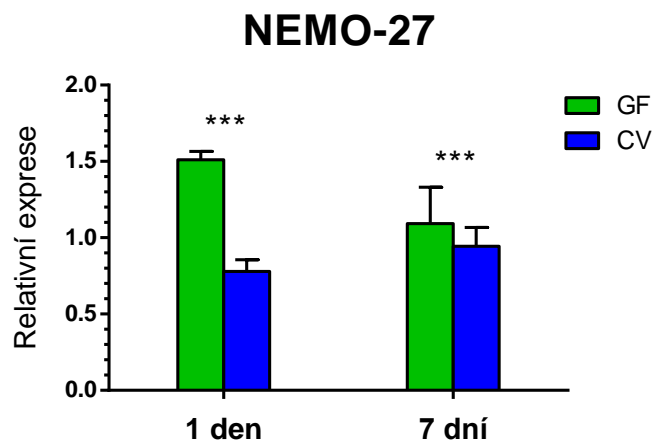
Obr. 10. Graf aktivace transkripce NF-κB2.

Přepis genu NF-κB2 (obr. 10.) byl vyšší u konvenčních selat a to jak 1-denních, tak 7-denních. Nejnižší aktivace je u 7-denních bezmikrobních selat. Výsledky jsou statisticky významné.



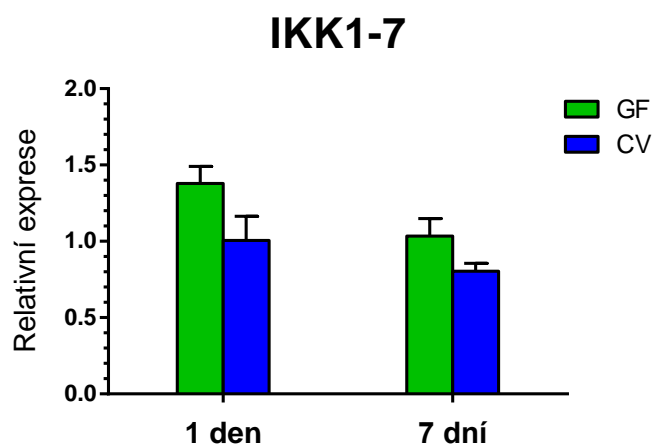
Obr. 11. Graf aktivace transkripce NFκBIA.

Aktivace genu NFκBIA (obr. 11.) byla vyšší u skupiny 1-denních i 7-denních konvenčních selat. Nejnižší přepis byl u skupiny 7-denních bezmikrobních selat. U skupiny 1-denních selat jsou výsledky statisticky významné a u skupiny 7-denních selat extrémně statisticky významné.



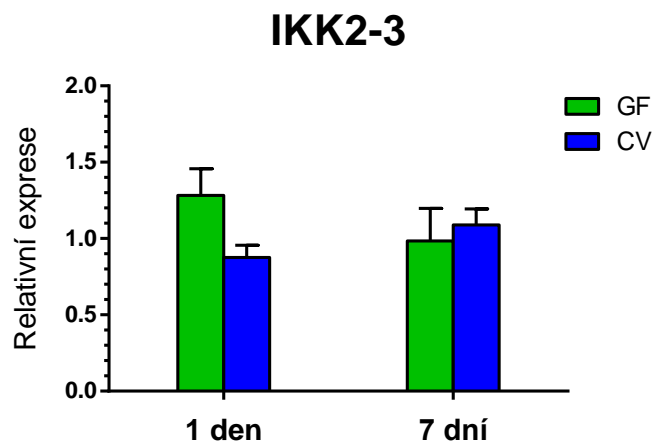
Obr. 12. Graf aktivace transkripce NEMO.

Přepis genu NEMO (obr. 12.) byl vyšší u bezmikrobních selat. Nejvýraznější aktivita se projevila u 1-denních bezmikrobních selat. Přepis u konvenčních selat byl podobný u 1-denních i 7-denních selat. U obou skupin jsou výsledky extrémně statisticky významné.



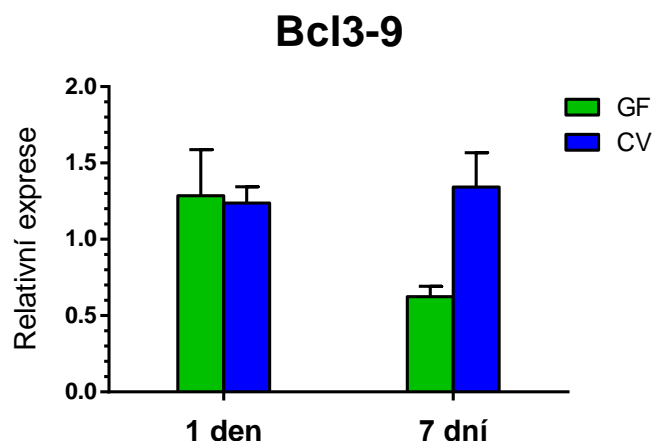
Obr. 13. Graf aktivace transkripce IKK1.

Gen IKK1 (obr. 13.) byl více přepisován u bezmikrobních selat. Nejvyšší transkripce byla u 1-denních bezmikrobních selat. Nejnižší u 7-denních konvenčních selat. Výsledky jsou u všech skupin statisticky nevýznamné.



Obr. 14. Graf aktivace transkripce IKK2.

Gen IKK2 (obr. 14.) měl nejvyšší transkripci u skupiny 1-denních bezmikrobních selat, u konvenčních byla nejnižší. U skupiny 7 denních selat byly hodnoty podobné u bezmikrobních i konvenčních selat. Výsledky jsou u obou skupin statisticky nevýznamné.



Obr. 15. Graf aktivace transkripce Bcl3.

Přepis genu Bcl3 (obr. 15.) byl nejnižší u 7-denních bezmikrobních selat, u konvenčních byl vyšší. Skupina 1-denních selat měla transkripci vyrovnanou. Výsledky nejsou statisticky významné.

## 6. DISKUZE

Prase je pro svou anatomickou, fyziologickou a genetickou podobnost čím dál více vyhledávaným modelem v biomedicínském výzkumu [50]. Jeho oblíbenost jako modelu infekční imunologie je dána epiteliochoriálním typem placenty - oběh matky a plodu je oddělen a nedochází k pasivní imunizaci plodu mateřskými protilátkami [49].

Za předpokladu, že je sele získáno asepticky, tedy hysterektomií nebo hysterotomií, a je chováno ve sterilních podmínkách, není pro jeho přežití nutný příjem ochranných imunoglobulinů v kolostru [52]. Bezmikrobní sele je možné kolonizovat různými mikroorganismy a díky tomu lze studovat interakce mezi hostitelem a mikroorganismy a mezi mikroorganismy navzájem [53;54]. V naší práci jsme pracovali se dvěma „extrémními stavy“ osídlení. A to se selaty, která jsou prostá mikrobiální složky (bezmikrobní) a selaty, která byla chována v běžných podmínkách zemědělského chovu a mají tedy obvyklou mikrobiotu (konvenční selata). Cílem bylo posoudit vliv přítomnosti/absence mikrobiální složky organismu na aktivaci ústřední molekuly zánětlivé reakce – jaderného faktoru kappa B.

Jako vhodnou tkáň pro izolaci RNA jsme vybrali koncovou část ilea (terminální ileum), která je imunologicky velmi významným orgánem. V ileu se vyskytují Peyerovy pláty (nahromaděná lymfatická tkáň), takže zde dochází k antigenní stimulaci. Zároveň je ileum i místem časté bakteriální translokace (M buňky). Jedná se tedy z hlediska imunitního systému o výrazně stimulovanou tkáň, ve které by se měly jednoznačně projevit rozdíly v přítomnosti či absenci mikroorganismů [55].

Pro izolaci RNA, která snadno podléhá degradaci, je třeba zachovávat určité pracovní postupy a pravidla. Je nutno pracovat pouze se špičkami s filtrem a pipetami bez přítomnosti RNáz, které se v laboratoři používají pouze na izolaci RNA, a to právě kvůli kontaminaci RNázami. Z důvodu vyloučení práce s toxickými látkami jako jsou fenol a chloroform jsme nepoužili „klasickou“ a v některých laboratořích stále preferovanou fenol-chloroformovou izolaci podle Sachciho a Chomczynského [31], ale použili jsme modernější metodu založenou na kolonové izolaci, jejímž principem je zadržení RNA na koloně v přítomnosti chaotropních solí a její následná eluce roztokem s velkou iontovou silou [33]. Pro redukci disulfidických můstků při izolaci používáme dithiotreitol, který lze nahradit  $\beta$ -merkaptethanolem, tomu se ale snažíme vyhnout

kvůli jeho vyšším toxickým účinkům ve srovnání s dithiotreitem. Existují námitky proti používání kolonových metod založené na výhradách typu, že dochází k „přestřihávání“ dlouhého vlákna RNA. V tomto případě možnost těchto teoreticky negativních vlivů snižujeme např. při syntéze cDNA, kde pracujeme s kitem kombinujícím oligo (dT) a náhodné hexamery. Zatímco použitím oligo (dT) by bylo tímto teoretickým nastřiháním výrazně ovlivněno, v případě náhodných hexamerů se dá předpokládat nevýrazný negativní dopad.

V prvním kroku syntézy cDNA dochází k případnému odstranění kontaminující genomové DNA a druhý krok je vlastní reverzní transkripce. Protože izolace RNA nebyla u jednoho vzorku dostatečně účinná a vzorek měl nízkou koncentraci RNA, provedli jsme změnu v poměru reagensů. Je velmi důležité, aby do dalších reakcí bylo dáváno stejné množství RNA, a dosažené výsledky se daly hodnotit a porovnávat. Běžně se do reakce přidávají 2  $\mu$ l PCR vody. Tuto vodu jsme nahradili roztokem RNA a množství RNA, které vkládáme do reakce, tak zůstalo zachováno.

Účinnost polymerázové řetězové reakce může být ovlivněna přítomností interferujících látek ve vzorku. Jsou-li ve vzorku obsaženy, dochází k falešně nízkým hodnotám, či dokonce k falešně negativním výsledkům. Mezi známé interferující látky patří hemoglobin, bilirubin, guanidin, dextransulfát sodný, triglyceridy, glukóza a další. Při podezření na jejich vliv na účinnost polymerázové reakce se do vzorku přidává interní standart, který slouží ke kontrole. Jestliže nedojde k jeho amplifikaci, usuzujeme, že vzorek obsahuje inhibiční interferenční látky [30]. Pro eliminaci těchto vlivů, nasyntetizovanou cDNA před použitím ředíme desetkrát, čímž zabraňuje inhibičnímu vlivu, protože interferenty by byly v příliš nízké koncentraci, aby se projevil jejich negativní účinek.

Pro kontrolu velikost amplifikačních produktů PCR jsme použili elektroforézu v polyakrylamidovém gelu. K detekci DNA v gelu se nejčastěji používá fluorescenční barvivo ethidium bromid, který se váže na dvouvláknovou DNA vmezeřením mezi báze [56]. Pro jeho karcinogenní efekt je však nebezpečný jak pracovníkům laboratoře, tak životnímu prostředí. Proto jsme ho nahradili fluorescenční barvičkou Midori Green, která se vyznačuje stejnou citlivostí jako ethidium bromid, ale nevykazuje škodlivé účinky a na rozdíl od nutné dekontaminace ethidium bromidu výrobce uvádí, že je možné vylít použitou barvicí lázeň do vodovodního odpadu.

Podle poznatků, které máme o NF- $\kappa$ B a jeho účasti v mechanismu vzniku zánětlivé odpovědi bychom předpokládali, že jeho exprese bude vyšší u ilea konvenčních selat, u kterých dochází k antigenní stimulaci mikrobiotou, která by mohla vést až k zánětlivé odpovědi. Naopak v tkáni bezmikrobních selat bychom čekali přepis velmi malý, protože k žádné výrazné antigenní stimulaci nedochází. Je třeba si ale uvědomit, že aktivace jaderného faktoru kappa B je velice složitý proces. Je závislý na přítomnosti různých faktorů, které fungují jako inhibitory/aktivátory aktivační kaskády (např. I $\kappa$ B a IKK) a je zde složitý mechanismus posttranslačních úprav, které zahrnují fosforylaci a acetylaci jednotek NF- $\kappa$ B. Podle jeho modifikací je určena síla vazby NF- $\kappa$ B k DNA a jeho časové působení a tím i délka trvání probíhající transkripce cílových genů [5;19].

Pro potvrzení aktivace rodiny NF- $\kappa$ B, jeho inhibitorů a kináz jsme vyhodnocovali také přepis u genů, u kterých je jejich aktivace podstatně méně složitá a jednoznačná a u kterých zároveň známe jejich působení a víme, jaká je exprese ve tkáni bezmikrobních a konvenčních selat. Jedná se o geny chemokinu IL-8 a prozánětlivého cytokinu TNF- $\alpha$ . U těchto genů je nám známo jako obecný princip potvrzený v našich předešlých studiích, že jejich exprese je několikanásobně vyšší při antigenní stimulaci mikrobů u konvenčních selat na rozdíl od selat bezmikrobních [54]. Vyhodnocení rozdílů mezi skupinami jsme provedli nepárovým t-testem a určili statistickou významnost těchto rozdílů. Některé výsledky byly vyhodnoceny jako statisticky nevýznamné a to především proto, že jednotlivé skupiny obsahovaly nízký počet vzorků. S nízkým počtem vzorků pracujeme z několika různých důvodů: 1) pracnost a cena odchovu gnotobiotických zvířat, 2) cena reagentů a za 3) v posledních letech se velice zvyšuje legislativní tlak na ochranu zvířat a uplatňuje se princip 3R (replacement - nahrazení, refinement - zmírňování, reduction - snižování) [57]. V některých odborných časopisech začínají být proto odmítány práce s námitkou, že počet zvířat byl vyšší, než byl nezbytně nutný, i když je požadavek na počet případů (zvířat) v rozporu s požadavky statistického vyhodnocení.

Novorozená mláďata s vícevrstevnou placentou ihned po narození neodpovídají na imunizaci v normální míře. Jedním z důvodů může být fylogenetické přizpůsobení, aby nedocházelo k náhle kolonizaci a tím k „cytokinové bouři“ (literatuře označované jako cytokine storm), která by mohla vést až k sepsi s letálními důsledky [58]. Tím si vysvětlujeme, že transkripce u různě starých selat se výrazně nelišila a hodnoty jsou podobné nebo aspoň relativně ve stejném poměru.

Rozdíly exprese se ale projeví u bezmikrobních a konvenčních selat, což bylo naším hlavním záměrem. U bezmikrobních selat byla daleko vyšší transkripce jednotky RelA na rozdíl od selat konvenčních. Podjednotka RelA tvoří nejběžněji heterodimer s podjednotkou p50 a toto uskupení je nejvíce zastoupený dimer NF- $\kappa$ B v tkáních. Tento dimer je typický při aktivaci kanonické dráhy NF- $\kappa$ B [26]. To ukazuje na to, že přestože u bezmikrobních selat neexistuje stimulace mikrobiotou, klasická cesta NF- $\kappa$ B je aktivována. Když se podíváme na relativní expresi podjednotky p50, hodnota je zvýšena pouze u konvenčních 7-denních selat. Tato hodnota ale není moc vypovídající, protože protein se může vyskytovat jak v aktivní formě (p50), tak neaktivní formě (p105). Stejně nejasnosti máme i u exprese NF- $\kappa$ B2, protože i tato jednotka je transkribována jako neaktivní (p100) a stává se aktivní až posttranslačními úpravami (p52). Tyto rozdíly ale bohužel podle transkripce genu nepoznáme [14]. Další úskalím těchto proteinů je to, že při tvorbě homodimerů mají inhibiční účinek a pouze při dimerizaci s „Rel“ proteiny jsou schopny tvořit dimery s transkripční aktivitou [4]. Přepis RelB byl naopak zvýšen u konvenčních selat. RelB tvoří heterodimer s p52 a je hlavním dimer nekanonické cesty aktivace NF- $\kappa$ B. To naznačuje, že ve tkáních konvenčních selat převažuje aktivita nekanonické dráhy [26]. Co se týká inhibitorů NF- $\kappa$ B, tak u NF- $\kappa$ BIA byla exprese zvýšena u konvenčních selat. Exprese Bcl3 byla poměrně nevyrovnaná. Bcl3 se vyskytuje nejčastěji ve spojení s homodimery či heterodimery p50 a 52 a ačkoliv patří do skupiny inhibitorů je schopen spustit expresi [59]. Aktivace kinázového komplexu byla zvýšena u skupiny bezmikrobních selat, což naznačuje vyšší aktivitu těchto jednotek a je zvýšená možnost že fosforylují I $\kappa$ B a NF- $\kappa$ B se může translokovat do jádra a vázat se na cílové geny a navozovat jejich transkripci.

Je nám jasné, že hlavní regulace se odehrává na proteinové úrovni a přičítáme ji postranslačním modifikacím (např. fosforylace, acetylace). V publikacích se často uvádí jednoznačné závěry, co se týká aktivace transkripčního faktoru kappa B. Přitom jen málo autorů rozlišuje, o který faktor z rozvětvené rodiny transkripčních jaderných faktorů se vlastně jedná. Domníváme se, že to je často způsobeno dostupností či křížovou reaktivitou protilátek, tj. že toto je hlavním selekčním kritériem pro výběr studovaného transkripčního faktoru. Přesto, že považujeme náš „monitoring“ na genové úrovni za omezeně vypovídající, považujeme ho důležitý. Jedná se o základní úroveň

našeho předpokládaného budoucího zájmu o složitou problematiku aktivace produkce zánětlivých mediátorů.

Naším cílem tedy je, nejen popsat expresi proteinu určité jednotky z rodiny transkripčních faktorů, ale poznat celou dráhu jeho aktivace, včetně transkripce jeho inhibitorů a aktivátorů. Tyto naše plánované záměry mohou zdánlivě popisovat popsané, ale není tomu tak. Ačkoliv od objevení transkripčních jaderných faktorů uplynulo již více než čtvrt století, právě jeho objevitelé patří mezi nejaktivnější badatele v této oblasti, protože si dobře uvědomují, že stále ještě zůstává mnoho nejasností v aktivaci a regulaci této mimořádně složité kaskády vedoucí k efektorovým molekulám imunitního systému.



## 7. ZÁVĚR

Jaderný faktor kappa B v dnešní době patří mezi nejvíc studované geny a proteiny a to hlavně kvůli jeho ústřední roli v imunitním systému. Má se za to, že pochopení jeho cest aktivace, regulačních mechanismů a účinků na cílové geny, kterých je obrovské množství, nám pomůže vyvinout prostředky, které by umožnily léčbu různých onemocnění, které jsou spojovány s aktivací nebo naopak inhibicí NF- $\kappa$ B na genové nebo proteinové úrovni, ať už se jedná o zánětlivá onemocnění nebo rakovinotvorné bujení. V této práci jsme se zaměřili na pochopení transkripce genů NF- $\kappa$ B, jakož i jeho inhibitorů a kináz pro jeho širší porozumění.

Naším úkolem bylo vyvinout systém LNA sond a primerů pro amplifikaci částí genů NF- $\kappa$ B a s ním spojených molekul pomocí PCR. Amplifikovali jsme části genů, které jsme získali izolací RNA a jejím následným přepisem do cDNA. Získané výsledky jsme zpracovali a vyhodnotili. Tyto cíle se nám podařilo splnit.

Aktivace transkripce byla stanovována v ileu bezmikrobních a konvenčních selat různého stáří. Stáří selat nehrálo v transkripci genů velkou roli a výsledky byly většinou srovnatelné. Dále jsme zjistili, že u bezmikrobních selat je aktivována klasická dráha aktivace NF- $\kappa$ B, což je dáno zvýšenou expresí hlavním dimerem kanonické dráhy RelA/p50 a naopak u konvenčních selat se aktivuje nekanonická cesta aktivace - dáno přepisem dimeru RelB/p52. Pro plné pochopení, proč tomu tak je, bude potřeba další prozkoumání jaderných faktorů kappa B a s ním souvisejících molekul také na úrovni proteinů.

## 8. ZKRATKY A ODBORNÉ TERMÍNY

AMV	„ <b>A</b> vian <b>M</b> yeloblastosis <b>V</b> irus“ - ptačí myeloblastický vir
AV ČR	<b>A</b> kademie věd <b>Č</b> eské republiky
cDNA	„ <b>c</b> omplementary <b>D</b> N $\mathbf{A}$ “ - DNA vzniklá reverzní transkripcí z RNA
CV	„ <b>c</b> onventional“ - konvenční selata
DNA	„ <b>D</b> eoxyribonucleic <b>a</b> cid“ - deoxyribonukleová kyselina
FRET	„ <b>F</b> luorescence resonance energy transfer“ sonda
GF	„ <b>g</b> erm free“ - bezmikrobní selata
I $\kappa$ B	„ <b>I</b> nhibitors of <b>NF-<math>\kappa</math>B</b> “ - inhibitory NF- $\kappa$ B
IKK	„ <b>I</b> $\kappa$ <b>B</b> kinase“ - kinázový komplex I $\kappa$ B
IL	<b>I</b> leum
IL-1	<b>I</b> nterleukin- <b>1</b>
IL-8	<b>I</b> nterleukin- <b>8</b>
LNA	„ <b>L</b> ocked nucleic acids“ sondy
MLV	„ <b>M</b> oloney <b>L</b> eukemia <b>V</b> irus“ - myší leukemický vir Moloney.
mRNA	„ <b>m</b> essenger“ <b>R</b> N $\mathbf{A}$ - mediátorová RNA
NA	„ <b>N</b> ucleic acids“ - nukleové kyseliny
NEMO	„ <b>NF-<math>\kappa</math>B</b> essential <b>m</b> odulator“
NF- $\kappa$ B	„ <b>N</b> uclear factor <b>k</b> appa <b>B</b> “ - jaderný faktor kappa B
NIK	„ <b>NF-<math>\kappa</math>B</b> -inducing <b>k</b> inase“
NLS	„ <b>N</b> uclear localization sequence“ - jaderný lokalizační signál
PCR	„ <b>P</b> olymerase chain reaction“ - polymerázová řetězová reakce
PRRs	„ <b>P</b> attern recognition receptors - receptory rozeznávající molekulární vzory
RHD	„ <b>R</b> el homology <b>d</b> omain“
RNA	„ <b>R</b> ibonucleic acid“ - ribonukleová kyselina
TAD	„ <b>T</b> ranscription activation <b>d</b> omain“ - transaktivační doména
TCR	„ <b>T</b> -cell receptor“ - T-buněčný receptor
TLRs	„ <b>T</b> oll-like receptors“ - Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	„ <b>T</b> umor <b>n</b> ecrosis factor <b><math>\alpha</math></b> “ - faktor nádorové nekrózy $\alpha$

## 9. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Gilmore TD, Temin HM: Different localization of the product of the v-rel oncogene in chicken fibroblasts and spleen cells correlates with transformation by REV-T. *Cell* 14-3-1986;44:791-800.
- [2] Sen R, Baltimore D: Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* 26-12-1986;47:921-928.
- [3] Steward R, Zusman SB, Huang LH, Schedl P: The dorsal protein is distributed in a gradient in early *Drosophila* embryos. *Cell* 4-11-1988;55:487-495.
- [4] Gilmore TD: Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 30-10-2006;25:6680-6684.
- [5] Hayden MS, Ghosh S: Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 8-2-2008;132:344-362.
- [6] Hořejší V, Bartůňková J: *Základy imunologie*. 4. vydání, Praha, Triton, 316 s. ISBN: 978-80-7387-280-9, 2009.
- [7] Šterzl I: *Základy imunologie pro zubní a všeobecné lékařství*. 1. vydání, Praha, Karolinum, 208 s. ISBN-10: 80-246-0972-X, 2005.
- [8] Mačák J, Mačáková J, Dvořáková J: *Patologie*. 2. dopl. vydání, Praha, Grada, 348 s. ISBN-13: 978-80-247-3530-6, 2012.
- [9] Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA: Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2008;8:776-787.
- [10] Měřejovský P, Bednář B: *Obecná patologie*. 1. vydání, Praha, Karolinum, 84 s. ISBN: 80-7066-950-0, 1994.
- [11] Sullivan JC, Kalaitzidis D, Gilmore TD, Finnerty JR: Rel homology domain-containing transcription factors in the cnidarian *Nematostella vectensis*. *Dev Genes Evol* 2007;217:63-72.
- [12] Sen R, Baltimore D: Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 29-8-1986;46:705-716.
- [13] Zhang G, Ghosh S: Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. *J Clin Invest* 2001;107:13-19.

- [14] Ghosh S, Hayden MS: New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:837-848.
- [15] Kopp EB, Ghosh S: NF-kappa B and rel proteins in innate immunity. *Adv Immunol* 1995;58:1-27.
- [16] Beinke S, Ley SC: Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J* 1-9-2004;382:393-409.
- [17] Pahl HL: Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 22-11-1999;18:6853-6866.
- [18] Barkett M, Gilmore TD: Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 22-11-1999;18:6910-6924.
- [19] Ghosh S, May MJ, Kopp EB: NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-260.
- [20] Karin M: The beginning of the end: IkappaB kinase (IKK) and NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 24-9-1999;274:27339-27342.
- [21] Rothwarf DM, Karin M: The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE* 26-10-1999;1999:RE1.
- [22] Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P: The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity* 1998;8:297-303.
- [23] Carmody RJ, Chen YH: Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol* 2007;4:31-41.
- [24] Arendt CW, Albrecht B, Soos TJ, Littman DR: Protein kinase C-theta:: signaling from the center of the T-cell synapse. *Curr Opin Immunol* 2002;14:323-330.
- [25] Sheppard KA, Rose DW, Haque ZK, Kurokawa R, McInerney E, Westin S, Thanos D, Rosenfeld MG, Glass CK, Collins T: Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Mol Cell Biol* 1999;19:6367-6378.
- [26] Bonizzi G, Karin M: The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* 2004;25:280-288.
- [27] Yin L, Wu L, Wesche H, Arthur CD, White JM, Goeddel DV, Schreiber RD: Defective lymphotoxin-beta receptor-induced NF-kappaB transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science* 16-3-2001;291:2162-2165.

- [28] Uddin MJ, Cinar MU, Tesfaye D, Looft C, Tholen E, Schellander K: Age-related changes in relative expression stability of commonly used housekeeping genes in selected porcine tissues. *BMC Res Notes* 2011;4:441.
- [29] Vandesompele J, De PK, Pattyn F, Poppe B, Van RN, De PA, Speleman F: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 18-6-2002;3:RESEARCH0034.
- [30] Průša R: *Základy analytických metod v klinické molekulární biologii*. 1. vydání, Praha, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, 45 s. ISBN: 80-238-0940-7, 1997.
- [31] Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
- [32] Kingston RE, Chomczynski P, Sacchi N: Guanidine methods for total RNA preparation. *Curr Protoc Mol Biol* 2001;Chapter 4:Unit4.
- [33] Zolfaghari R, Chen X, Fisher EA: Simple method for extracting RNA from cultured cells and tissue with guanidine salts. *Clin Chem* 1993;39:1408-1411.
- [34] Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J: *Metody molekulární biologie*. 1. vydání, Brno, Masarykova univerzita, 194 s. ISBN: 80-210-3841-1, 2005.
- [35] Taylor JM, Keller GH, Shapiro D, Burr H, Scholes J: Synthesis and applications of complementary DNA. *Adv Pathobiol* 1977;235-257.
- [36] Chen JH, Moscovici MG, Moscovici C: Isolation of complementary DNA unique to the genome of avian myeloblastosis virus (AMV). *Virology* 1980;103:112-122.
- [37] Gerard GF, Fox DK, Nathan M, D'Alessio JM: Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Mol Biotechnol* 1997;8:61-77.
- [38] Berchtold MW: A simple method for direct cloning and sequencing cDNA by the use of a single specific oligonucleotide and oligo(dT) in a polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids Res* 11-1-1989;17:453.
- [39] 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 1:263-273.
- [40] Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA: DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:9436-9440.

- [41] Vierstraete A: Princip PCR. <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> 08.11.1999 (cit. 21.4.2014).
- [42] Wilhelm J, Pingoud A: Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 7-11-2003;4:1120-1128.
- [43] Kumar R, Singh SK, Koshkin AA, Rajwanshi VK, Meldgaard M, Wengel J: The first analogues of LNA (locked nucleic acids): phosphorothioate-LNA and 2'-thio-LNA. *Bioorg Med Chem Lett* 18-8-1998;8:2219-2222.
- [44] Anonym 1: Struktura LNA a DNA monomeru. [www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/dna-probes/product-lines/locked-nucleic-acids-faq.html](http://www.sigmaaldrich.com/life-science/custom-oligos/dna-probes/product-lines/locked-nucleic-acids-faq.html) 2014 (cit. 21.4.2014).
- [45] Levy O: Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol* 2007;7:379-390.
- [46] Laycock G, Sait L, Inman C, Lewis M, Smidt H, van DP, Jorgensen F, Stevens M, Bailey M: A defined intestinal colonization microbiota for gnotobiotic pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 15-10-2012;149:216-224.
- [47] Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerdtts V: The pig: a model for human infectious diseases. *Trends Microbiol* 2012;20:50-57.
- [48] Miller I, Cerna J, Travnicek J, Rejnek J, Kruml J: The role of immune pig colostrum, serum and immunoglobulins IgG, IgM, and IgA, in local intestinal immunity against enterotoxic strain in *Escherichia coli* O55 in germfree piglets. *Folia Microbiol (Praha)* 1975;20:433-438.
- [49] Sterzl J, Silverstein AM: Developmental aspects of immunity. *Adv Immunol* 1967;6:337-459.
- [50] Lunney JK: Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci* 2007;3:179-184.
- [51] Mandel L, Travnicek J: The minipig as a model in gnotobiology. *Nahrung* 1987;31:613-618.
- [52] Miniats OP, Jol D: Gnotobiotic pigs-derivation and rearing. *Can J Comp Med* 1978;42:428-437.
- [53] Splichal I, Fagerhol MK, Trebichavsky I, Splichalova A, Schulze J: The effect of intestinal colonization of germ-free pigs with *Escherichia coli* on calprotectin levels in plasma, intestinal and bronchoalveolar lavages. *Immunobiology* 2005;209:681-687.
- [54] Splichal I, Splichalova A, Trebichavsky I: Cytokine response to *Escherichia coli* in gnotobiotic pigs. *Folia Microbiol (Praha)* 2008;53:161-164.

- [55] Corr SC, Gahan CC, Hill C: M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52:2-12.
- [56] Jenkins FJ: Basic methods for the detection of PCR products. *PCR Methods Appl* 1994;3:S77-S82.
- [57] Russell WMS, Burch RL: The principles of humane experimental technique. Methuen, London, ISBN: 0900 767-782, 1959.
- [58] Butler JE, Weber P, Sinkora M, Baker D, Schoenherr A, Mayer B, Francis D: Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VIII. Colonization is required for newborn piglets to make serum antibodies to T-dependent and type 2 T-independent antigens. *J Immunol* 15-12-2002;169:6822-6830.
- [59] Brasier AR: The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovasc Toxicol* 2006;6:111-130.

## 10. PŘÍLOHY

Tab. 10. Seznam navržených systémů LNA sond a primerů.

Název genu	Levý primer a sonda	Sekvence levého primeru (5'-3')	Pravý primer a sonda	Sekvence pravého primeru (5'-3')
	Sekvence amplifikovaného úseku DNA (5'-3')			
RelA	pRelA-L-40	tctgcttcaggtgacagtg	pRelA-R-40	gatggggtgagagaggacag
	tctgcttcaggtgacagtgcgggaccagcagcagccctccgctgccgctgtcctctcacccatc			
RelA	pRelA-L-85	acctggggatccagtgtgta	pRelA-R-85	aaggggtgtgtgtgtctg
	acctggggatccagtgtgtaagaagcgggacctggaacagccatcaatcagcgcacccagaccaacaacaaccctt			
RelB	pRelB-L-10	tgggactctaagagcacctgtc	pRelB-R-10	gccagtcctccacacca
	tgggactctaagagcacctgtcttctgcagctccgggactgtggagggctgcccgggaggtggaggtgactgcgtgcctggtgtggaaggactggc			
RelB	pRelB-L-1	tcttccaggcactgtatcc	pRelB-R-1	caaaaccatcgtccaggag
	tcttccaggcactgtatccctccctggcctggagccccccggcgggcccgatctcctggacgatggtttg			
cRel	pcREL-L-63	tgctgtgtaataagaactgtggaa	pcREL-R-63	ccgaactctatgtcatctttctgt
	tgctgtgtaataagaactgtggaagtgtcagaggaggatgaaatatttactctgtgacaaagtacagaaagatgacatagaagtccg			
cRel	pcREL-L-40	cagaggggaatgcgttttag	pcREL-R-40	tatgttcggctgctgtctgt
	cagaggggaatgcgttttagatacaaatgtgaaggc gatcagcagcagcattccaggggagcacagcacagacagcagccgaacata			
NF-κB1	pNFkB1-L-63	ggatgaggtgcatctgacg	pNFkB1-R-63	gaaagaggttatcctggaacctg
	ggatgaggtgcatctgacgtattcagtaggagtaaggaggagaattacaggttccaggataaccttttc			
NF-κB1	pNFkB1-L-85	cctggtggagaactttgagc	pNFkB1-R-85	ttcatcctccatcctcgt-
	cctggtggagaactttgagcctctgtatgacctggatgactcgtgggacgaggatggagaggatgaa			
NF-κB2	pNFkB2-L-21	ctcctggagcctcaaacct	pNFkB2-R-21	gcacctgtcacaagcaga
	ctcctggagcctcaaacctgaagatttctcgaatggacaagacagctggctctgtcggggtggagatgaggtttatctgctttgtgacaaggtgc			
NF-κB2	pNFkB2-L-7	agcggaaacggaggaaag	pNFkB2-R-7	cagagcctccacctgt
	agcggaaacggaggaaagccttcccaccttctccagcctttgggggtggctcccacatgggtggaggctctg			



NFκBIA	pNFκBIA-L-20	aacctgcagcagactccact	pNFκBIA-R-20	ctcaggatcacagccagctt
	aacctgcagcagactccactccacttggcggatgacaccaaccagccagaaatcgctgaggcacttctggaagctggctgtgatcctgag			
NFκBIA	pNFκBIA-L-27	gaaatacccctctacaccttgc	pNFκBIA-R-27	ctgagtcaggactcccacact
	gaaatacccctctacaccttgcctgtgagcagggctgcctggccagtgtgggagcctgactcag			
NEMO	pNEMO-L- 27	aagccaacctatgctccac	pNEMO-R- 27	gcatctcggagctcttgatt
	aagccaacctatgctccactgccttcggagcagggctgcctgagacctccagcgcctgctggaggagaatcaagagctccgagatgc			
NEMO	pNEMO-L- 63	aacaggaagtgatcgacaagc	pNEMO-R- 63	ggaaccgtctccatcacaat
	aacaggaagtgatcgacaagctgaaggaggaggccgagcagcacaagattgtgatggagacggttcc			
IKK1	pIKK1-L-7	tccaaagtgtatattgcatgtga	pIKK1-R-7	tttggtgaggtaaatggctact
	tccaaagtgtatattgcatgtgaagagatgacgggagaagtgcatttagtagccattacctcaacaaa			
IKK1	pIKK1-L-101	aacctatggaaaactggcta	pIKK1-R-101	ttggctgctcaaagtgaga
	aacctatggaaaactggctacagttgatgctgaactgggacctcagcagagaggaggacctattgatctcacttgaagcagccaa			
IKK2	pIKK2-L-3	atctgcttcggaacaacagc	pIKK2-R-3	tccaggtcaatctggatgct
	atctgcttcggaacaacagctgctgtccaagatgaagaactccatggcctccatgtcccagcagctcaaggccaagcttgatttctcaaaaccagcatccagattgacctgga			
IKK2	pIKK2-L-49	tcatgaggaggctgaacca	pIKK2-R-49	gcagtactccatggccaga
	tcatgaggaggctgaaccacccaatgtggggccgccgggatgtccctgaggggatgcagaacctggctcccaacgacttgcccttctggccatggagtactgc			
Bcl3	pBCL3-L-77	ctgaggggggaaggctacac	pBCL3-R-77	cgacagaagaccgttgag
	ctgaggggggaaggctacacggcctgctcctgcatcccagccggagcctccccgaccggagcgcaccacctccccctgagagcggcagccgcctgagctccaacggctctctgtcg			
Bcl3	pBCL3-L-9	agctccaacggctctctgtc	pBCL3-R-9	gagaatccaggggtgtcctt
	agctccaacggctctctgtcggcatcaccacctctcgcctcccagctcccccaaggacacctggattctc			