

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Molekulárně-fylogenetická charakteristika
izolátu *Hymenolepis diminuta* udržovaného
v laboratorních podmínkách**

Bakalářská práce

Lucie Řežábková

Školitel: MVDr. Kateřina Jirků, PhD.

Školitel-specialista: RNDr. Jan Brabec, Ph.D.

České Budějovice 2017

Řežábková L. (2017). Molekulárně-fylogenetická charakteristika izolátu *Hymenolepis diminuta* udržovaného v laboratorních podmínkách.

[Molecular-fylogenetic characteristic of the isolate *Hymenolepis diminuta* kept under laboratory conditions. Bc. Thesis, in Czech]-30 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The main goal of the present study was to confirm the possibility of cryptic diversity within *Hymenolepis diminuta* group of tapeworms. We used molecular-fylogenetic analyses for characterization of the intraspecific genetic diversity of five isolates of *Hymenolepis diminuta*. Further, we wanted to compare our isolate of *H. diminuta* that is tested for purposes of the helminth therapy with other isolates obtained from collaborative institutions. Our results showed no cryptic diversity within *H. diminuta* clade of the five isolates and confirmed that our isolate is really *H. diminuta* previously characterized only based on its morphology.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Podpis.....

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat především svým školitelům Kateřině Jirků a Janu Brabcovi za odborné vedení, cenné rady, pomoc a trpělivost při zpracovávání této bakalářské práce. Velké díky patří také Milanovi Jirků za praktické rady a vedení, dále Romanovi Kuchtovi za pomoc při zpracování materiálu a v neposlední řadě také celému kolektivu Laboratoře parazitární terapie Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR v.v.i. za přátelskou atmosféru.

Dále bych chtěla poděkovat Ivanu Vokřálovi (Farmaceutická fakulta v Hradci Králové), Minoru Nakao (Asahikawa Medical University, Japonsko), Marc Dellerba (Biome Restoration, Velká Británie), Tim Littlewood a Andrea Waeschenbach (Natural History Museum, Velká Británie), Daniel Młocicki a Ruslan Sałamatin (W. Stefański Institute of Parasitology, Polsko) za poskytnutí materiálu.

Tato práce byla částečně financována z grantového projektu Studentské grantové agentury (SGA) PřF JU.

OBSAH

1	Úvod.....	1
1.1	Taxonomické zařazení a morfologie <i>Hymenolepis diminuta</i>	1
1.2	Morfologie <i>Hymenolepis diminuta</i>	3
1.3	Vývojový cyklus <i>Hymenolepis diminuta</i> a hostitelská specifita	4
1.4	Epidemiologie <i>Hymenolepis diminuta</i>	5
1.4.1	Výskyt	5
1.4.2	Prevalence	5
1.4.3	Vliv na hostitelský organizmus	5
1.5	<i>Hymenolepis diminuta</i> a její využití v helmintoterapii imunitně zprostředkovaných střevních zánětů.....	5
1.5.1	Imunitně zprostředkované střevní záněty	5
1.5.2	„Old Friends“ hypotéza.....	6
1.5.3	Helmintoterapie	7
1.6	Kryptická diverzita.....	9
2	Cíle projektu.....	10
3	Materiál a metody.....	11
3.1	Materiál	11
3.2	Metody	11
3.2.1	Izolace DNA.....	11
3.2.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	12
3.2.3	Elektroforéza	14
3.2.4	Extrakce DNA z gelu	14
3.2.5	Enzymatická PCR purifikace	14
3.2.6	Klonování PCR produktů	15
3.2.7	Příprava vzorku na sekvenační reakci	16
3.2.8	Analýza sekvenačních dat	16
4	Výsledky	18
5	Diskuze.....	21
6	Závěr	25
7	Seznam použité literatury.....	26

1 ÚVOD

Hymenolepis diminuta je tasemnice patřící do řádu Cyclophyllidea a čeledi Hymenolepididae. Jedná se o kosmopolitně rozšířený druh helminta kolonizující střevo svého hostitele. Tato tasemnice má nepřímý vývojový cyklus, přičemž využívá bezobratlé jako mezihostitele a převážně potkany nebo krysy jako definitivního hostitele. Nicméně může infikovat i člověka, u kterého se infekce projevuje ve většině případů asymptomaticky. *Hymenolepis diminuta* je v poslední době testována pro účely helmintoterapie.

Genetická vnitrodruhová variabilita není u druhu *H. diminuta* doposud zcela známa. Existuje zde ale možnost výskytu komplexů kryptických druhů tasemnic, tzn. druhů morfologicky identických, ale geneticky odlišných a je tedy zřejmé, že pouze morfologická diagnostika není pro správné taxonomické zařazení dostačující.

1.1 Taxonomické zařazení a morfologie *Hymenolepis diminuta*

Helminti

Termín helminti se používá jako souhrnné označení pro fylogeneticky různorodé skupiny bilaterálně souměrných protostomních živočichů. Zahrnuje zástupce většiny neodermátních skupin platyhelmintů, tedy Trematoda (motolice), Monogenea a Cestoda (tasemnice). Dále se pod pojem helminti řadí Nematoda (hlístice) a Acanthocephala (vrtejši). Vzhledem k různorodosti všech skupin se zástupci liší nejen způsobem adaptace na hostitele, ale také ontogenetickým vývojem, morfologií a epidemiologií (Volf & Horák, 2007).

Neodermata

Tento taxon, jak již bylo uvedeno výše, zahrnuje skupiny Trematoda, Monogenea a Cestoda. Společným znakem těchto skupin je aciliární syncytium (neodermis, tegument), jehož hlavní funkcí je nejen ochrana parazita před vnějším hostitelským prostředím, ale také trávení a přenos živin vzhledem k absenci střeva. Dalším společným znakem je svalová soustava. Mohutná svalovina se nalézá např. v oblasti přichytných orgánů. Vylučovací soustavu nalezneme u těchto skupin v podobě protonefridií. V přední části těla je uložena nervová soustava zajišťující mimo jiné výraznou inervaci přichycovacích orgánů a hltanu. Platyhelminti jsou převážně hermafroditi, proto jsou samčí i samičí rozmnožovací orgány většinou uloženy u sebe v těsné blízkosti. Jiným typickým znakem neodermat je přítomnost totipotentních buněk zvaných neoblasty, které dávají vznik jednotlivým diferencovaným

buňkám a tkáním a jsou také zodpovědné za vznik reprodukčních orgánů (Roberts et al., 2013).

Třída Cestoda

Třída Cestoda se dále dělí na Gryrocotylidea, Amphilinidea a Eucestoda. Jedná se o parazity všech skupin obratlovců (Volf & Horák, 2007). Obvykle mají dva hostitele (tj. definitivní hostitel a mezihostitel) a přenos z jedince na jedince probíhá perorálně. Místem lokalizace dospělého je z velké většiny střevo obratlovce. Vajíčka tasemnic se proto dostávají do vnějšího prostředí s trusem/exkrementy definitivního hostitele. Ve vajíčku se poté vyvíjí larva, tj. lykofora nebo onkosféra. Tato larva má závěsný aparát, tzv. dekakant anebo hexakant, zvané dle počtu přítomných závěsných háčeků. Následná vývojová stádia mohou ovlivňovat nejen metabolismus mezihostitele, ale také jeho hormonální regulaci, což se může projevit změnou chování hostitele ve prospěch tasemnice, jedná se o tzv. manipulační teorie (Roberts et al., 2013; Volf & Horák, 2007).

Tělo tasemnic je tvořeno skolexem (hlavičkou) a segmentovanou strobilou (tělem). Významným taxonomickým znakem jsou přichycovací orgány umístěné na skolexu. Strobila je segmentovaná do jednotlivých proglotidů (článků), kde každý jednotlivý článek představuje samostatnou reprodukční jednotku, jelikož platyhelmini, jakožto hermafroditi, vytvářejí v každém článku jak samčí, tak samičí pohlavní soustavu. Zvláštností samčí reprodukční soustavy tasemnic může být vysoký počet varlat (Volf & Horák, 2007). Tasemnicím třídy Cestoda se nevyvinul dýchací ani cévní systém (Elder et al., 2005).

Čeď Hymenolepididae

Hymenolepidní tasemnice se taxonomicky řadí do podtřídy Eucestoda a řádu Cyclophyllidea (Volf & Horák, 2007). Vývojový cyklus tasemnic čeledi Hymenolepididae zahrnuje dva hostitele. Mezihostitelem jsou bezobratlí, ve kterých se vytváří larvocysta (tzv. cysticerkoid). K definitivním hostitelům se řadí ptáci a savci, kteří se infikují pozřením mezihostitele obsahujícího larvální stádia (Volf & Horák, 2007).

Nejvýznamnějšími druhy tasemnic této čeledi schopnými infikovat člověka jsou *Hymenolepis nana* a *Hymenolepis diminuta*. *Hymenolepis nana* je celosvětově rozšířená tasemnice dosahující délky do 8 cm. Disponuje rostelárními háčky na skolexu. Obvykle využívá bezobratlé (např. hmyz) jako mezihostitele a hlodavce nebo člověka jako definitivního hostitele. Tato tasemnice má výjimečný vývojový cyklus, neboť jej dokáže

adaptovat pouze na jednoho hostitele namísto dvou, tzn. že člověk (jako definitivní hostitel) může plnit roli jak mezhospitele, tak definitivního hostitele zároveň. V takovém případě obě fáze vývoje (vývoj larvy v mezhospiteli a vývoj dospělého v definitivním hostiteli) proběhnou v tomtéž střevě (Volf & Horák, 2007).

Hymenolepis diminuta je celosvětově rozšířená tasemnice hlodavců i lidí, jakožto známých definitivních hostitelů (Roberts et al., 2013). Její infekce u lidí probíhají převážně asymptomaticky, a tak jsou její nálezy diagnostikovány náhodně (Garcia, 2006). Tato tasemnice má striktně dvouhostitelský cyklus. V poslední době je testována pro účely možného využití v helmintoterapii (McKay, 2010).

1.2 Morfologie *Hymenolepis diminuta*

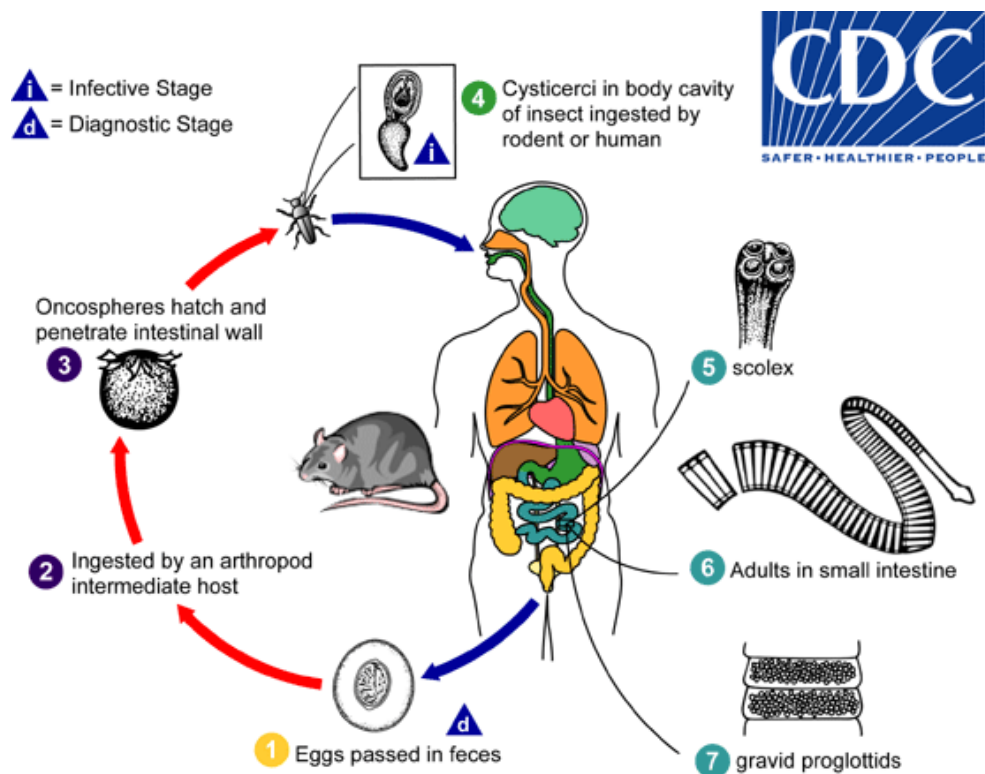
Dospělec *H. diminuta* (Obr. 1) dorůstá do délky asi 60 cm (Volf & Horák, 2007). Na skolexu nalezneme čtyři kruhové přísavky a krátké rostellum bez háčků (Hendrix & Robinson, 2012). Tělo má členěné do článků, každý se třemi varlaty. Vajíčka *H. diminuta* (Obr. 1) jsou kulatého nebo oválného tvaru. Běžně dosahují velikosti asi 70 – 85 μm x 60 – 80 μm . Vajíčka jsou silnostěnná a jejich stěna má dvě vrstvy – vnější příčně pruhovanou a vnitřní hladkou. Prostor mezi vrstvami může být vyplněn granuly. Uvnitř vajíčka se nachází larvální stádium zvané onkosféra se závěsným aparátem, tzv. hexakant [http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=7109]. V mezhospiteli se z onkosféry uvolněné z vajíčka vyvíjí larvocysta neboli cysticerkoid (Obr. 1). Ten je opatřen ocasním přívěskem zvaným cercomer (Chervy, 2002).



Obr. 1: Vývojová stádia tasemnice *Hymenolepis diminuta*: (1) dospělci ve střevě potkana, (2) dospělec o délce cca 50 cm, (3) larvocysty (velikost cca 150-200 μm), (4) vajíčko s onkosférou a hexakantem uvnitř (měřítko je 25 μm).

1.3 Vývojový cyklus *Hymenolepis diminuta* a hostitelská specifita

Hymenolepis diminuta se vyznačuje nepřímým dvouhostitelským vývojovým cyklem znázorněným na obrázku 2 [<http://www.cdc.gov/dpdx/hymenolepiasis>].



Obr. 2: Dvouhostitelský vývojový cyklus *Hymenolepis diminuta*

[zdroj: <http://www.cdc.gov/dpdx/hymenolepiasis>].

Zralá vajíčka *H. diminuta* se dostávají do vnějšího prostředí exkrementy definitivního hostitele. Infekce schopná vajíčka jsou následně pozřena mezihostitelem. Po pozření se z vajíček nejdříve uvolní onkosféra. Ta penetruje střevní stěnu do tělní dutiny mezihostitele, ve které se začnou vyvíjet cysticerkoidi. Tento proces trvá přibližně 10-14 dní (Roberts et al., 2013). K infekci definitivního hostitele dochází požitím mezihostitele s larvocystami v tělní dutině. Ty odolávají působení trávicích šťáv a enzymů definitivního hostitele a dostávají se do jeho tenkého střeva. Tam se přichytí ke střevní stěně pomocí přísavných orgánů a během 16 – 21 dní se vyvíjí v pohlavně zralého dospělého (Roberts et al., 2013).

Častými mezihostiteli *H. diminuta* jsou brouci z čeledi Tenebrionidae. Definitivním hostitelem jsou hlodavci, převážně potkani nebo krysy. Náhodným definitivním hostitelem *H. diminuta* může být v některých případech také člověk, ve velké většině v tropických a subtropických oblastech [<http://www.cdc.gov/dpdx/hymenolepiasis>].

1.4 Epidemiologie *Hymenolepis diminuta*

1.4.1 Výskyt

Hymenolepis diminuta je kosmopolitně vyskytující se tasemnice, jejíž hostitelem bývají převážně hlodavci (Volf & Horák, 2007). V rozvojových zemích se můžeme setkat s touto infekcí také u lidí (Garcia, 2006). Oproti tomu ve vyspělých zemích se s infekcí člověka setkáme jen vzácně [<http://www.cdc.gov/dpdx/hymenolepiasis>]. Z velké většiny je *H. diminuta* diagnostikována u malých dětí, které často nedbají správné hygieny, a to nejčastěji na venkově, kde je snazší přístup k obilným polím a kde se zdržují potencionální mezihostitelé (např. Kołodziej et al., 2014; Marangi et al., 2003; Tiwari et al., 2014; Watwe & Dardi, 2008; Wiwanitkit, 2004;). Většinou se jedná o náhodné nálezy, protože infekce *H. diminuta* u lidí jsou asymptomatické [<http://www.cdc.gov/dpdx/hymenolepiasis>].

1.4.2 Prevalence

Všeobecně se dá konstatovat, že prevalence *H. diminuta* v lidských populacích závisí na různých faktorech, např. na geografické oblasti, hygienických podmínkách, výskytu mezihostitele, stravovacích návycích nebo věku (Roberts et al., 2013). Vzhledem k tomu, že jsou infekce lidí touto tasemnicí asymptomatické a diagnostikovány většinou náhodně, není jednoduché její prevalenci přesně určit. Celosvětově se prevalence *H. diminuta* pohybuje v rozmezí 0,001 % až 5,5 % (Tena et al., 1998).

1.4.3 Vliv na hostitelský organizmus

Jak již bylo zmíněno výše, většina infekcí *H. diminuta* u člověka je asymptomatických. U některých jedinců se mohou ojediněle objevit bolesti břicha, podrážděnost nebo eozinofilie (Marangi et al., 2003; Tena et al., 1998). Infekce jsou snadno řešitelné s použitím léku s účinnou látkou praziquantel (Garcia, 2006).

1.5 *Hymenolepis diminuta* a její využití v helmintoterapii imunitně zprostředkovaných střevních zánětů

1.5.1 Imunitně zprostředkované střevní záněty

Imunitně zprostředkovaná onemocnění (IMD – immune-mediated diseases) zahrnují autoimunitní onemocnění (např. idiopatické střevní záněty, roztroušená skleróza, diabetes 1. typu) a různé alergie. Označení IBD (převzato z anglického Inflammatory Bowel Diseases)

je souhrnný termín pro skupinu idiopatických střevních zánětů převážně autoimunitní povahy. Nejčastěji se jedná o ulcerózní kolitidu a Crohnovu chorobu (Sartor & Mazmanian, 2012). Tato onemocnění mohou postihovat sliznici celého gastrointestinálního aparátu člověka (Kaser et al., 2010). Předpokládá se, že etiologie těchto onemocnění je multifaktoriální, tzn. je zapříčiněna interakcemi více faktorů, mezi něž se řadí genetická predispozice, environmentální složka, diverzita střevní mikroflóry či nepřiměřená reakce imunitního systému (Kaser et al., 2010). V poslední době se velký podíl na klinické manifestaci IBD přisuzuje především nevyvážené diverzitě střevního mikrobiomu, jehož prostřednictvím je intenzivně ovlivňován imunitní systém člověka. Právě nepřiměřená reakce imunitního systému, který začne produkovat protilátky proti antigenům střeva, může za rozvinutí se těchto zánětlivých onemocnění (Kaser et al., 2010; Zhang & Li, 2014). Prevalence i incidence jak Crohnovy choroby tak ulcerózní kolitidy se rapidně zvyšují ve vyspělých zemích (Burisch et al., 2013; Molodecky et al., 2012; Lerner et al., 2015). Vysoký nárůst IBD byl zaznamenán především během posledních desetiletí a je pravděpodobně zapříčiněn přijetím moderního životního stylu (Elliott & Weinstock, 2009; Rook, 2012).

1.5.2 „Old Friends“ hypotéza

Za hlavní příčinu zvyšující se prevalence IMD onemocnění je považován moderní životní styl, jehož počátek je datován k průmyslové revoluci, tzv. druhé epidemiologické transmisi, a následnému průmyslovému rozvoji během 20. století (Rook, 2012). Současné pojetí moderního způsobu života s sebou nese mimo jiné razantní změny v postoji k hygienickým návykům, což vede k přehnané hygieně, k užívání dezinfikované vody, k nízké diverzitě stravy a k nadměrnému užívání antibiotik a antiparazitik (Rook, 2012; Rook et al., 2014).

V tomto období došlo v důsledku razantní změny životního stylu k eliminaci až eradikaci různých environmentálních či střevních mikroorganismů a dalších, zvaných „Old friends“. Tato situace má za následek snížení kontaktu člověka s environmentálními mikroby a antigeny již od dětství, a tak dochází k nedostatečnému vývoji imunitního systému a imunoregulaci jako takové (Rook, 2012). A právě tento fakt má za následek zvyšující se prevalenci i incidenci autoimunitních chorob (Weinstock, 2012). Na základě tohoto bylo vyslovena tzv. „Old Friends“ hypotéza (Rook, 2012; Rook et al., 2014). Nemělo by se ale jednat o výsledek pouze genetických změn, neboť je tento jev pozorován v relativně krátkém časovém období (Fumagalli et al., 2009; Kaser et al., 2010).

„Old Friends“ hypotézu poprvé formuloval Graham Rook (2012), jež vycházel z hygienické hypotézy. Tuto navrhl a publikoval David P. Strachan (1989), který si tak vysvětloval zvýšené riziko vzniku senné rýmy a ekzému u dětí žijících v méně početné rodině. Nižší hygiena mezi sourozenci měla za následek stimulaci jejich imunitního systému (Rook, 2012; Strachan et al., 1989).

Přibližně před dvaceti lety se začalo uvažovat, že jedním z hlavních faktorů, které mohou přispívat k nevyváženému rozvoji imunitního systému a imunoregulaci, může být absence helmintů v lidských populacích vyspělých zemí (Weinstock, 2012). Helminti jsou silní modulátoři imunitního systému, a navíc mohou lidský organismus ovlivňovat i skrze ovlivnění diverzity střevní mikrobioty (Girgis et al., 2013; Rook et al., 2014; Weinstock, 2012). V průběhu posledního desetiletí již proběhl intenzivní výzkum, který částečně prokázal, že helminti mohou ovlivňovat imunitní systém tak, že zmírňují průběh různých imunitně zprostředkovaných onemocnění (Pritchard, 2011).

1.5.3 Helmintoterapie

Během koevoluce helmintů s lidmi v průběhu milionů let byli helminté nuceni přizpůsobovat se imunitnímu systému člověka, aby tak zajistili své vlastní přežití. Stali se tak silnými imunomodulátory, že dokázali obejít imunitní systém hostitele (Girgis et al., 2013). Vyvinuli si různé imunomodulační mechanismy, kterými mimo jiné přispívali k vyváženému rozvoji imunitního systému a následně k potřebné imunoregulaci v organismu hostitele, čímž zmírňovali rozvoj zánětlivých reakcí vznikajících v těle hostitele (Helmbly, 2015). Těchto poznatků využívá helmintoterapie jakožto strategie biologické léčby IMD [<https://quizlet.com/154193752/helminths-as-biological-therapy-for-autoimmune-diseases-flash-cards>].

Doposud byly na lidech klinicky testovány dva druhy helmintů – hlísti Tenkohlavec prasečí (*Trichuris suis*) a Měchovec americký (*Necator americanus*). Přírodním hostitelem *Trichuris suis* je prase, nicméně člověk může být jeho náhodným hostitelem (Beer, 1976; Volf & Horák, 2007). Životní cyklus *T. suis* zahrnuje pět larválních stádií, které se vyvíjí v tlustém střevě hostitele až do preadultního stádia. Hostitel se nakazí infekce schopným vajíčkem s L1 larvou, která se uvolňuje v kolonu a zavrtává se do sliznice tlustého střeva, kde prodělává další vývoj až do stádia L5. To se uvolňuje do lumen kolonu a dospívá. Dospělci se poté opět zavrtávají do střevní stěny ztenčenou přední částí. Vajíčka *T. suis* odchází z těla hostitele spolu s jeho trusem do vnějšího prostředí (Roberts et al., 2013). Tenkohlavec byl testován

v klinických studiích na pacientech s Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou jako jeden z možných způsobů terapie (Summers et al., 2005a; Summers et al., 2005b).

Necator americanus je helmint typicky infikující člověka. K infekci hostitele dochází infekce schopnými larvami L3 vyskytujícími se ve vnějším prostředí. Ty penetrují kůží a migrují po těle cévami do srdce a plic. Tam prochází dalším vývojem až do preadultního stádia L5, které je vykašláno a spolknuto. Tato stádia se dostávají do tenkého střeva, kde dospívají a uchycují se ústními kapsulami na klky sliznice tenkého střeva (Roberts et al., 2013). *Necator* byl použit při léčbě celiakie, což ovšem nevedlo k významnějšímu zlepšení příznaků (Davieson et al., 2011). Jiné testy zaměřené na léčbu Crohnovy choroby už byly úspěšnější (Croese et al., 2006).

Jako další možný kandidát vhodný pro helmintoterapii je *H. diminuta* nebo *Schistosoma mansoni*, přičemž se stále hledají další (Cooke et al., 1999; Hernandez et al., 2013). Výběr vhodného kandidáta pro testování v helmintoterapii spočívá v jeho vytipování na základě několika definovaných kritérií (např. Lukeš et al., 2014):

- žádná nebo mírná patogenita;
- vývojový cyklus může zahrnovat jen minimální somatickou nebo viscerální migraci;
- místem lokalizace dospělce by měl být ideálně trávicí trakt hostitele;
- infekční stádia se nesmí šířit do prostředí;
- potřeba možnosti získávání sterilních infekce schopných stádií;
- potřeba dobré znalosti biologie helminta, jeho epidemiologie, vývojového cyklu, hostitelské spektrum, patogenity a výsledky předešlých klinických výzkumů, pokud byly provedeny;

Právě *H. diminuta* splňuje všechna tato kritéria. Není invazivní a nemigruje po těle hostitele. Tráví celý život v lumen tenkého střeva a v jejím vývojovém cyklu není žádné somatické migrace skrz organizmus hostitele. Není autoinfekční a bez mezihostitele není schopna se reprodukovat. Získat sterilní stádia lze z kultury nebo z inbredních zvířat (McKay, 2010). Proto byla *H. diminuta* vytipována jako vhodný kandidát pro testování jako biologické léčby pro pacienty s IBD v laboratorních podmínkách.

1.6 Kryptická diverzita

Některé druhy živočichů mohou nést identické morfologické znaky, přestože geneticky se odlišují, tzv. kryptické (skryté) druhy. Takovéto kryptické druhy proto bývají chybně identifikovány a taxonomicky klasifikovány. Genetické rozdíly těchto kryptických druhů jsou následně odhaleny až molekulárně-fylogenetickými analýzami (Bickford et al., 2007).

V rámci hymenolepidních tasemnic bylo provedeno několik studií ve snaze odhalit kryptickou diverzitu. Nejčastěji je tato skrytá diverzita diskutována u druhu *Hymenolepis nana*. Autoři studie Macnish (2002) porovnávali odlišnosti *H. nana* izolovaných ze dvou hostitelů – myši a člověka. Sekvenování mitochondriálního genu COX1 (Cytochrom c oxidáza podjednotka 1) odhalilo 5% odlišnost myších izolátů *H. nana* v porovnání s izoláty z člověka. Možnost výskytu komplexu kryptického druhu byla objevena také u *H. diminuta*. Okamoto et al. (1997) ve své studii uvádí, že úroveň variability COX1 genu dvou izolátů z Japonska a USA se pohybuje v rozmezí $6\pm 4\%$.

2 CÍLE PROJEKTU

Pro účely projektu byly vytyčeny následující tři cíle:

- molekulárně-fylogeneticky charakterizovat izolát *Hymenolepis diminuta* používaný v naší laboratoři;
- získat izoláty *H. diminuta*, zejména ty, které byly nebo jsou použity pro výzkum terapie helminty;
- charakterizovat molekulární variabilitu všech získaných izolátů *H. diminuta* na základě vybraných genových markerů;

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

Pro účely této studie bylo použito sedm izolátů tasemnice *Hymenolepis diminuta* získaných z následujících spolupracujících institucí uvedených v tabulce 1.

Tab. 1: Přehled studovaných izolátů *Hymenolepis diminuta*.

IZOLÁT	DONOR – INSTITUTE	STÁT	FIXACE IZOLÁTU	HOSTITEL
1	Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzita Karlova	Česká republika	udržovaný v kultuře	potkan
2	Department of Parasitology, Asahikawa Medical University, Asahikawa	Japonsko	fixováno v ethanolu	potkan
3	Biome Restoration, Lancaster	Spojené království Velké Británie a Severního Irsku	larvocysty fixované v ethanolu	potkan
4	W. Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, Varšava	Polsko	fixováno v ethanolu	potkan
5	W. Stefański Institute of Parasitology, Polish Academy of Sciences, Varšava	Polsko	fixováno v ethanolu	člověk
6	Natural History Museum, Londýn; původ Korea	Spojené království Velké Británie a Severního Irsku	fixováno ve formaldehydu	potkan
7	Natural History Museum, Londýn; původ Dánsko	Spojené království Velké Británie a Severního Irsku	fixováno ve formaldehydu	potkan

3.2 Metody

3.2.1 Izolace DNA

Celková DNA z izolátů *H. diminuta* byla izolována dvěma způsoby a to (i) za použití komerčního kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche s.r.o., Praha, ČR) dle návodu dodaného výrobcem nebo (ii) pomocí suspenze chelexu (polystyren-divinylbenzen iminodiacetát) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Oba postupy jsou popsány níže. U izolátu č. 3 (larvocysty *H. diminuta*) byla před izolací DNA manuálně narušena stěna larvocyst pomocí preparačních jehliček pod lupou. Izoláty č. 2, 4 a 5 musely být nejdříve

zbaveny zbytků etanolu několikerým promytím v destilované vodě. Z izolátu č. 1 z naší kultury byl odstřižen malý kousek tkáně. Všechny vzorky byly následně zpracovávány v 1,5ml mikrozkuhavce (Eppendorf, Hamburk, Německo).

Izolace DNA pomocí High Pure PCR Template Preparation Kit: Tkáň tasemnice byla rozdrcena a homogenizována plastovým homogenizátorem v 1,5 ml epp v objemu 200 μ l roztoku Tissue-lysis Buffer, poté inkubována s 40 μ l proteinázy K při teplotě 55 °C s občasným protřepáváním po dobu jedné hodiny v AccuBlock™ (Labnet International, Inc., Edison, New Jersey, USA). Po uplynutí této doby bylo přidáno 200 μ l Binding Buffer a poté byla směs 10 min inkubována při teplotě 70 °C. Dalším krokem bylo přidání 100 μ l isopropanolu, promíchání, přenesení celé směsi do separační kolonky a odstředění při 8000 rpm/1 min. Následovalo promytí kolony přidáním 500 μ l promývacího roztoku Inhibitor Removal Buffer a 8000 rpm/1 min. Poté následovalo promytí kolony přidáním 500 μ l promývacího roztoku Wash Buffer a odstředěno za stejných podmínek. Tento krok byl proveden dvakrát. Pro odstranění zbytkového pufru byla kolona dodatečně odstředěna 10 s při maximální rychlosti. Vymývání DNA z kolony přidáním 200 μ l roztoku Elution Buffer a následné odstředění při 8000 rpm/1 min. Stanovení koncentrace izolované DNA bylo provedeno pomocí přístroje NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA). DNA byla potom uskladněna při teplotě -20 °C.

Izolace DNA pomocí chelexu: DNA z rozdrcených larvocyst (tj. larválních stádií *H. diminuta*) byla izolována za použití chelexu. Ke vzorku biologického materiálu bylo přidáno cca 200 μ l suspenze chelexu. Směs byla poté inkubována při teplotě 60 °C po dobu 45 minut a pokračovala při 90 °C po dobu 20 minut. Po ochlazení na ledu a odstředění byla DNA uskladněna při teplotě 4 °C.

3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro účely této práce jsme vybrali tři genové markery na základě jejich vhodnosti pro studium genetické variability *H. diminuta* a jejich dostupnosti v databázi GenBank: (i) mitochondriální cytochrom c oxidázu podjednotku 1 (COX1), (ii) velkou podjednotku ribozomální RNA (LSU) a (iii) mezerník „internal transcribed spacer 2“ ITS2.

Gen kódující COX1 byl amplifikován pomocí PCR za použití primerů dle studie Nkouawa et al. (2015), délka 747 bp:

- Hym-cox1F [5'-GTTACTAATCATGGTATTATTATG-3']
- Hym-cox1R [5'-CCAAAATAATGCATAGGAAAA-3']

Gen pro LSU byl amplifikován pomocí primerů dle níže uvedených studií, délka 1711bp:

- XZ-1 forward [5'-ACCCGCTGAATTTAAGCATAT-3'] (Waeschenbach et al., 2007), kde T nahradilo Y z původního ZX-1 [5'-ACCCGCTGAAYTTAAGCATAT-3'] (van der Auwera et al., 1994)
- 1500R reverse [5'-GCTATCCTGAGGGAAACTTCG-3'] (Littlewood et al., 2008)

Pro mezerník ITS2 byly použity primery dle Okamoto et al. (1997), délka 786-791 bp:

- 3S forward [5'-CGGTGGATCACTCGGCTCGTG-3']
- A28 reverse [5'-CCTGGTTAGTTTCTTTTCCTCCGC-3']

Vlastní PCR reakce probíhala v celkovém objemu 20 μ l. K 2x koncentrovanému MasterMixu (GeneAll, Seoul, Korea) byly připipetovány následující složky: pracovní roztoky forward a reverse primerů (o koncentraci 25 nmol, každý po 1 μ l), 1 μ g templátové DNA a destilovaná voda (pro doplnění do požadovaného objemu 20 μ l). Paralelně byly připravovány negativní PCR reakce (destilovaná voda nahrazovala templátovou DNA).

V případě negativních výsledků u výše popsané PCR byl zvolen alternativní postup. Reakční směs o výsledném objemu 25 μ l byla připravována do 0,5 ml mikrozkušavek. Na jednu reakci bylo potřeba smíchat: 5 μ l 5x PCR pufru (New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts, USA), 0,5 μ l nukleotidů (10 mM), 1,25 μ l forward primeru a 1,25 μ l reverse primeru (o koncentraci 25 nmol), 1U polymerázy Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs Inc.), 1,5 μ l 50nM MgCl₂, 0,75 μ l 3% DMSO, 1 μ g templátové DNA a doplněno vodou na požadovaný objem. Tyto vzorky byly po kontrole na agarózovém gelu čištěny enzymaticky.

Amplifikace probíhala v T100™ Thermal Cycleru (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornie, USA) za následujících podmínek: počáteční denaturace při 95 °C/5 min; následovalo 30 cyklů 92 °C/1 min, 52 °C/1 min, 72 °C/1 min; závěrečná elongace při 72 °C/10 min.

3.2.3 Elektroforéza

Agarózová elektroforéza byla použita pro zviditelnění PCR produktů a pro kontrolu úspěšnosti amplifikace a velikosti fragmentů. Na přípravu 1,5% agarózového gelu bylo smícháno 0,75 g agarózy (Serva, Heidelberg, Germany) a 50 ml 1x TAE pufru (tris, kyselina octová, EDTA; Sigma-Aldrich, Inc.). Po smíchání složek v Erlenmeyerově baňce se agaróza rozpustila zahříváním v mikrovlnné troubě, následně byl roztok opatrně ochlazen na asi 50 °C, kdy byl přidán 1 µl ethidium bromidu (10 mg/ml) a vše bylo promícháno. Roztok byl nalit do předem připravené vaničky s hřebínky a ponechal se ztuhnout při pokojové teplotě cca 20 min. Po ztuhnutí gelu byla do jamek nanесena reakční směs (20 µl) každého vzorku a do jedné jamky také 6 µl E-Gel® 1 Kb Plus DNA marker (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornie, USA). Vzorky byly děleny na elektroforéze (Thermo Fisher Scientific, Inc.) při napětí 95 V po dobu cca 30 minut a vizualizovány pomocí UV transiluminátoru (Ultra-Lum, Inc., Claremont, California, USA). Velikost fragmentů byla porovnávána s DNA markerem. Fragmenty, které velikostně odpovídaly očekávanému výsledku, byly z gelu vyříznuty, aby z nich byla následně izolována DNA.

Z PCR produktů určených k enzymatickému čištění byly odebrány 2 µl, k tomu přidáno 1 µl Loading Dye. Tato směs byla nanášena na agarózový gel za stejných podmínek, jako v předchozím postupu. Pokud fragment odpovídal požadované velikosti, byl zbylý objem PCR produktu enzymaticky přečištěn a poté připraven na sekvenování.

3.2.4 Extrakce DNA z gelu

Extrakce DNA z gelu byla provedena kitem Gene Elute Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, Inc.) podle návodu dodaného výrobcem. Takto připravené vzorky byly použity na vlastní sekvenování.

3.2.5 Enzymatická PCR purifikace

Při enzymatickém čištění bylo k 23 µl PCR produktu přidáno 1,5 U FastAP alkalické fosfatázy (Thermo Fisher Scientific, Inc.) a 6,75 U enzymu Exonukleáza I (Thermo Fisher Scientific, Inc.) podle protokolu publikovaném ve studii Werle et al. (1994). Tato směs byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 40 minut a poté při 80 °C 20 minut byly enzymy inaktivovány. Následně byly tyto vzorky přímo použity na sekvenování.

3.2.6 Klonování PCR produktů

PCR produkty izolované z gelu byly klonovány pomocí kitu TOPO TA Cloning Kit – PCR 2.1 TOPO vector (Invitrogen) dle návodu.

Ligace: PCR produkty byly zaklonovány do plazmidových vektorů. Směs obsahovala 2,5 μ l DNA z přečištěné PCR reakce a 0,2 μ l PCR vektoru, byla inkubována pět minut při pokojové teplotě a následně umístěna na ledu.

Transformace kompetentních buněk: Po vychladnutí směsi bylo přidáno 45 μ l rozmražených kompetentních buněk (*E. coli* DH5 α) a potom byla tato směs inkubována 10-15 minut na ledu. Následně byl proveden tzv. „heat shock“ - zkumavka se směsí byla vložena do termobloku AccuBlock™ (Labnet International, Inc.) a zahřáta na 42 °C po dobu 35 s a ihned poté uložena na led na 2 min. Po tomto teplotním šoku bylo ke směsi přidáno 75 μ l SOC (trypton, kvasničný extrakt, NaCl, glukóza) media zahřátého na pokojovou teplotu. Zkumavka se dala třepat v horizontální poloze na 45 min při teplotě 37°C.

Kultivace: Po 45-minutové inkubaci byl obsah nanesen na předem připravené Petriho misky s bakteriální agarovou půdou s obsahem ampicilinu (25 mg/ml). Před vlastním výsevem bylo na každou misku naneseo a hokejkou rovnoměrně rozetřeno 35 μ l zásobního roztoku 2% w/v X-galu (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) (Green & Sambrook, 2012) a následně 5 μ l zásobního roztoku IPTG 20% w/v (isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) (Green & Sambrook, 2012). Misky byly potom inkubovány při teplotě 37 °C přes noc (cca 12 hodin).

Namnožení plazmidu: Po inkubaci byly z každého vzorku na Petriho misce vybrány bílé kolonie buněk a ty poté sterilní špičkou přeneseny do předem připravené zkumavky (4 ml) s tekutým LB médiem (trypton, kvasničný extrakt, NaCl) s obsahem ampicilinu v poměru 4 μ l zásobního roztoku AMP (25 mg/ml) na 1 ml media. Tato směs byla opět inkubována 12 hod ve třepačce při 37°C. Narostlý obsah zkumavek byl následně odstředěn v 1,5ml mikrozskumavkách při maximální rychlosti.

Izolace plazmidové DNA: Izolace plazmidové DNA byla provedena pomocí kitu High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche s.r.o.). Postupovalo se dle přiloženého protokolu. Vyizolovaná DNA byla uskladněna při teplotě -20 °C.

Restrikční reakce: Přítomnost a velikost DNA fragmentu v plazmidu byla ověřena pomocí restrikční endonukleázy *EcoRI* (New England BioLabs Inc.). Reakční směs obsahovala 1 µl odpovídajícího pufru (10x konc.) 2 jednotek enzymu *EcoRI*, 5,5 µl destilované vody a 3,5 µl plazmidové DNA. Směs byla inkubována 30 min při 37 °C. Velikost vyštípnutého fragmentu byla elektroforeticky ověřena na 1% agarózovém gelu.

3.2.7 Příprava vzorku na sekvenační reakci

Vzorky DNA byly připravené do celkového objemu 10 µl, v celkovém obsahu DNA 100 až 500 ng. Pro sekvenční reakce byly použity primery Hym-cox1F/Hym-cox1R, XZ-1/1500R a 3S/A28 nebo plazmidové primery M13 Forward (-20): 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' a M13 Reverse: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' v závislosti na předchozím zpracování PCR produktu. Z každého vzorku bylo přeneseno 5 µl přečištěného PCR produktu/plazmidové DNA, dále byl přidán 1 µl specifického primeru a 4 µl destilované vody. Sekvenování bylo prováděno u firmy GATC BioTech (Konstanz, Německo).

3.2.8 Analýza sekvenačních dat

Konsenzuální sekvence byly vytvořeny pomocí programu Geneious 8.1.8 (Biomatters), který byl zároveň použit jako editor sekvencí. Identita sekvencí byla ověřena algoritmem BLAST na webovém rozhraní National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) a nejvíce podobné sekvence zástupců tasemnic rodu *Hymenolepis* byly staženy pro následné porovnání (Tab. 2). Multiple sequence alignment celkem 21 dostupných sekvencí COX1 byl vytvořen algoritmem G-INS-i programu MAFFT (Kato & Standley, 2013) implementovaném v programu Geneious. Fylogenetická analýza byla provedena metodou maximum likelihood (ML) v programu PHYML implementovaným v prostředí programu Geneious. Jako substituční model byl zvolen model Jukes-Cantor 69 (JC69). Grafická vizualizace stromu byl provedena v programu FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>), strom byl zakořeněn izolátem *Hymenolepis* sp., který tvořil sesterskou skupinu druhu *H. diminuta* v předchozích fylogenetických pracích (Nkouawa et al., 2015).

Tab. 2: Přehled použitých sekvencí COX1 genu *Hymenolepis diminuta* získaných z databáze GenBank™.

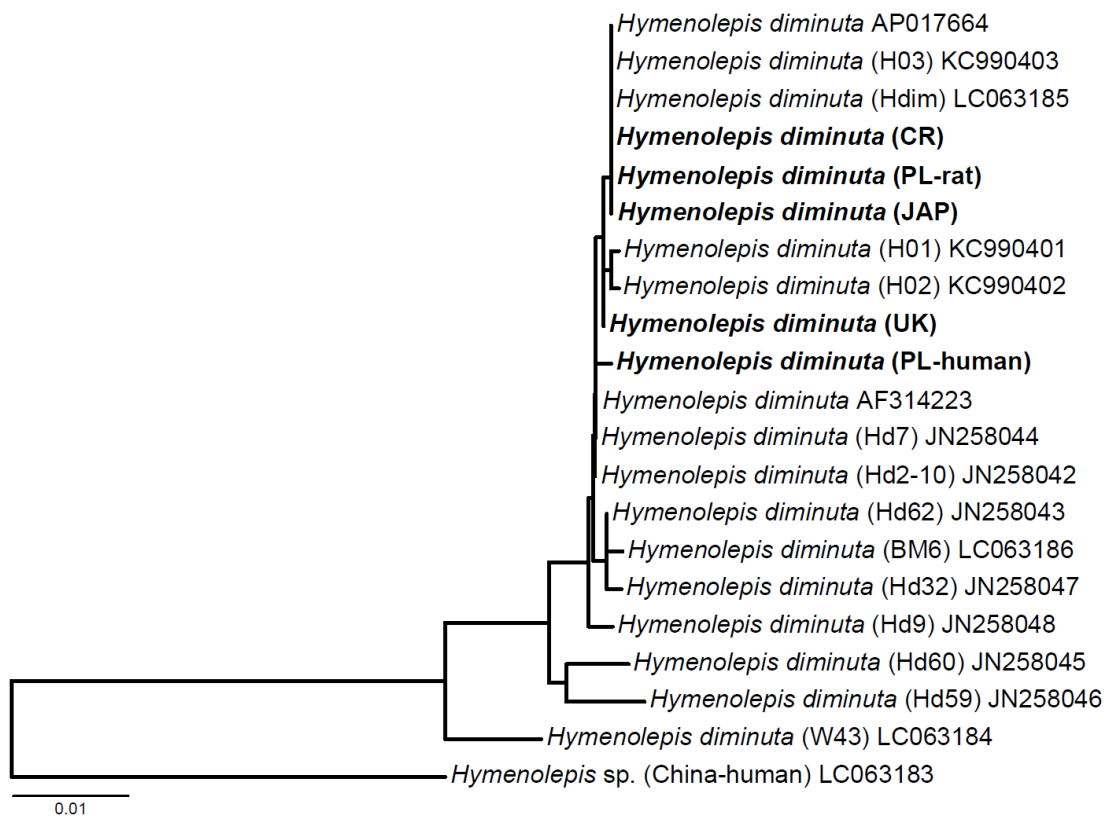
NÁZEV IZOLÁTU NEBO SEKVENCE	OZNAČENÍ V GENBANK
<i>Hymenolepis diminuta</i>	AF314223
<i>Hymenolepis diminuta</i>	AP017664
<i>Hymenolepis diminuta</i> (H01)	KC990401
<i>Hymenolepis diminuta</i> (H02)	KC990402
<i>Hymenolepis diminuta</i> (H03)	KC990403
<i>Hymenolepis diminuta</i> (W43)	LC063184
<i>Hymenolepis diminuta</i> (Hdim)	LC063185
<i>Hymenolepis diminuta</i> (BM6)	LC063186
<i>Hymenolepis diminuta</i> (Hd2-10)	JN258042
<i>Hymenolepis diminuta</i> (Hd62)	JN258043
<i>Hymenolepis diminuta</i> (Hd7)	JN258044
<i>Hymenolepis diminuta</i> (Hd60)	JN258045
<i>Hymenolepis diminuta</i> (Hd59)	JN258046
<i>Hymenolepis diminuta</i> (Hd32)	JN258047
<i>Hymenolepis diminuta</i> (Hd9)	JN258048
<i>Hymenolepis</i> sp. (China-human)	LC063183

4 VÝSLEDKY

V rámci této bakalářské práce bylo získáno celkem 15 sekvencí tří genových markerů, které byly použity k molekulárně-fylogenetické charakterizaci celkem pěti izolátů *Hymenolepis diminuta*, COX1 o celkové délce 747 bp, LSU o délce 1711 bp a délka ITS2 sekvencí se pohybovala v rozmezí 786 až 791 bp.

Na základě fylogenetických analýz sekvencí u všech tří zvolených molekulárních markerů se ukázal jako jediný využitelný být mitochondriální gen COX1, jehož sekvence byly při porovnání v rámci druhu jako jediné variabilní. Sekvence LSU a ITS2 se na této taxonomické úrovni ukázaly příliš konzervované, při vzájemném porovnání nových izolátů byly zcela identické. Porovnání více klonů markeru ITS2 navíc poukázalo na přítomnost více sekvencně odlišných kopií tohoto lokusu v rámci jednoho genomu a byl by tedy velmi obtížně využitelný pro studium příbuzenských vztahů. Dataset sekvencí COX1 genu všech našich pěti izolátů *H. diminuta* byl doplněn celkem 16 sekvencemi *H. diminuta* dostupnými v databázi NCBI (Tab. 2). Genetické vzdálenosti vyjádřené jako celkový počet rozdílných nukleotidů mezi jednotlivými izoláty *H. diminuta* jsou shrnuty v tabulce 3. Z celkové délky alignmentu COX1 747 bp je 621 znaků konstantních, 126 variabilních a pouze 17 tzv. parsimony-informativních. Sekvence českého izolátu (č. 1) byly stejné v porovnání s izolátem č. 2 z Japonska a potkaním izolátem č. 4 z Polska, také se shodovaly se sekvencemi v tabulce 2 označenými Hdim, H03 a Hd AP017664 dostupnými v databázi NCBI. Izolát č. 3 z Velké Británie a lidský izolát č. 5 z Polska se lišily od českého pouze o dva nukleotidy.

Multiple sequence alignment sekvencí COX1 byl použit pro konstrukci fylogenetického stromu metodou maximum likelihood (Obr. 3). Jako outgroup byla použita sekvence hymenolepidní tasemnice (*Hymenolepis* sp., LC063183), která je z předchozí fylogenetické práce (Nkouawa et al., 2015) známá jako blízce příbuzná *Hymenolepis hibernia*.



Obr. 3: Maximum likelihood fylogenetický strom zkonstruovaný na základě nukleotidových sekvencí mitochondriálního COX1 genu tasemnic *Hymenolepis diminuta*. (značení izolátů pro účely této práce: CR – izolát č. 1; JAP – izolát č. 2; UK – izolát č. 3; PL-rat – izolát č. 4; PL-human – izolát č. 5).

Tab. 3: Genetické vzdálenosti mezi dostupnými jedinci *Hymenolepis diminuta* vyjádřené jako celkový počet rozdílných nukleotidů COX1 genu.

	JAP	UK	PL-rat	Hd2	Hd62	Hd32	Hd7	Hd9	Hd60	Hd59	CR	Hdim	BM6	W43	PL-human	Hd AF314223	Hd AP017664	H01	H02	H03	
UK	2																				
PL-rat	0	2																			
Hd2	3	4	3																		
Hd62	4	5	4	1																	
Hd32	5	6	5	2	1																
Hd7	3	4	3	0	1	2															
Hd9	5	6	5	2	3	4	2														
Hd60	11	12	11	8	9	10	8	10													
Hd59	12	13	12	9	10	11	9	11	9												
CR	0	2	0	3	4	5	3	5	11	12											
Hdim	0	2	0	3	4	5	3	5	11	12	0										
BM6	3	4	3	4	3	4	4	6	12	13	3	3									
W43	17	18	17	17	18	17	17	19	20	21	17	17	18								
PL-human	2	3	2	3	4	5	3	5	11	12	2	2	3	17							
Hd AF314223	2	3	2	3	4	5	3	5	11	12	2	2	3	17	2						
Hd AP017664	0	2	0	3	4	5	3	5	11	12	0	0	3	17	2	2					
H01	2	2	2	3	4	5	3	5	11	12	2	2	3	17	2	2	2				
H02	1	2	1	4	5	6	4	6	12	13	1	1	4	18	3	3	1	1			
H03	0	2	0	3	4	5	3	5	11	12	0	0	3	17	2	2	0	2	1		
<i>Hymenolepis</i> sp.	111	112	111	111	112	112	111	111	113	114	111	111	112	107	111	110	111	111	112	111	

Pozn. CR – izolát č. 1; JAP – izolát č. 2; UK – izolát č. 3; PL-rat – izolát č. 4; PL-human – izolát č. 5.

5 DISKUZE

V naší laboratoři byla tasemnice *Hymenolepis diminuta* vytipována jako vhodný kandidát helminta pro testování pro účely helmintoterapie na základě nedávno revidovaných a publikovaných kritérií ve studii Lukeš et al. (2014). Genetická vnitrodruhová variabilita *H. diminuta* není doposud zcela známa, proto byl izolát *Hymenolepis* kultivačně udržovaný a experimentálně používaný v naší laboratoři doposud charakterizován pouze na základě morfologických znaků dospělého získaného z potkanů v laboratorních podmínkách a vajíček [<http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=7109>]. Nicméně nedávno bylo u hymenolepidních tasemnic prokázáno, že pouze morfologická charakteristika je pro jejich taxonomické zařazení nedostatečná.

Nedávné molekulárně-fylogenetické studie provedené na *H. diminuta* a *Hymenolepis nana* ukazují na možnost výskytu komplexů kryptických druhů tasemnic, tzn. druhů morfologicky identických, ale geneticky odlišných (Haukisalmi et al., 2010; Macnish et al., 2002). Kryptická diverzita byla prokázána dosud pouze u druhu *Hymenolepis nana* (Macnish et al., 2002). V případě *H. diminuta* byl molekulárně-fylogeneticky odhalen zřejmě nový druh tasemnice příbuzný s *Hymenolepis hibernia*, jehož vajíčka a proglotidy byly morfologicky neodlišitelné od *H. diminuta*. Studie Macnish et al. (2002) dále poukazuje na rozdílnost v sekvencích COX1 genu izolátů *H. nana* odebraných z člověka v porovnání se sekvencemi izolátů z hlodavce. Také další studie Okamoto et al. (1997) odhalila variabilitu sekvencí COX1 genu u dvou izolátů *H. diminuta*.

Na základě výše popsaných faktů je zřejmé, že k přesnému druhovému určení hymenolepidních tasemnic infikujících člověka je pouze jejich morfologická diagnostika nedostačující. V případě *H. diminuta* je nezbytné doplnit údaje o molekulárně-fylogenetické analýzy v souvislosti s jejím testováním pro helmintoterapii. V případě kryptické diverzity v rámci komplexu *H. diminuta* by mohlo docházet k rozdílnému imunologickému působení na organizmus hostitele a výsledky různých týmů zabývajících se helmintoterapií by tudíž nebyly srovnatelné.

V rámci předložené studie byl pro molekulárně-fylogenetické analýzy využit dospělec *H. diminuta* udržovaný v kultuře naší laboratoře (izolát č. 1) a dále pak izoláty získané z několika spolupracujících pracovišť Laboratoře helmintologie Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd České republiky, a to izoláty č. 2-7. Většina vzorků byla fixována v etanolu, pouze izoláty č. 6 a 7 byly uchovávány ve formaldehydu. Z izolátů fixovaných ve formaldehydu se nepodařilo pomocí PCR amplifikovat žádný ze studovaných

molekulárních markerů, což může být vysvětleno známými negativními účinky formaldehydu při izolaci intaktní DNA z této jinak široce používané fixáže (Gilbert et al., 2007).

Pro potvrzení, zda námi používaný izolát je skutečně *H. diminuta*, byla provedena molekulárně-fylogenetická analýza pomocí tří genetických markerů a to LSU, ITS2, a COX1. Tyto molekulární markery byly vybrány na základě dvou faktů a to (i) dostupnosti jejich sekvencí u několika izolátů *H. diminuta* a také blízce příbuzných druhů rodu *Hymenolepis* v databázi GenBank a (ii) jejich předchozího využití v molekulárně-fylogenetických studiích (Littlewood et al., 2008; Nkouawa et al., 2015; Okamoto et al., 1997; Waeschenbach et al., 2007). Všechny ze tří uvedených markerů patří mezi dlouhodobě a bezkonkurenčně nejčastěji využívané molekulární markery mezi tasemnicemi, a to jak na vyšších taxonomických úrovních, např. studium příbuzenských vztahů v rámci celé skupiny Cestoda, tak na úrovni populací vybraných druhů tasemnic (Waeschenbach et al., 2012).

Důležitým krokem bakalářské práce bylo mimo jiné nalezení optimálního způsobu přečištění amplifikované DNA z PCR produktů pro dosažení vysoké kvality výsledných sekvencí. Celkem byly využity dvě rozdílné metody pro čištění PCR produktů. Primárně byla použita metoda extrakce DNA z gelu za pomoci komerčního kitu a jako alternativní postup byla zvolena metoda purifikace DNA za použití enzymů alkalické fosfatázy a exonukleázy I. Metoda enzymatické purifikace se ukázala jako efektivnější jak z hlediska dosažení vyšší kvality, tak i délky sekvencí všech studovaných genů. Tento výsledek lze vysvětlit tím, že v průběhu přečištění nemůže dojít ke ztrátě DNA na kolonce a je eliminována možnost kontaminace sekvenační reakce solemi z pufrů používaných při purifikaci na kolonce.

Abychom ověřili teorii možnosti výskytu kryptické diverzity tasemnic v rámci druhu *H. diminuta*, byly všechny získané vzorky, kromě izolátů č. 6 a 7, zpracovány identickým způsobem jako náš domácí izolát a připraveny na sekvenování za použití stejných párů primerů. Z každého vzorku se podařilo získat sekvence všech tří zvolených genů. Ze získaných sekvencí ITS2 je patrné, že genomová DNA jednotlivých izolátů *H. diminuta* obsahuje více navzájem neidentických sekvencí ITS2 oblasti, které se navzájem liší počtem opakování krátkých, tandemově se opakujících úseků o délce 2-4 nukleotidů. Z tohoto důvodu nebylo možné ITS2 osekvenovat metodou přímé sekvenace PCR produktů a bylo nutné využít klonování. Vzhledem k tomu, že ITS2 je nekódující oblastí DNA a jednotlivé kopie ITS2 jsou přítomny v různém poměru, je mezi jednotlivými variantami tohoto regionu nemožné rozeznat kopie sdílející společnou evoluční historii napříč porovnávanými zástupci *H. diminuta*. Získané sekvence nebyly tudíž použity pro následné fylogenetické zpracování. Naopak

sekvence genu LSU bývají konzervativní, v našem případě byly sekvenčně zcela identické a nebyly tudíž pro naši studii využitelné. Proto byl jako jediný gen využitelný pro fylogenetickou analýzu zvolen mitochondriální COX1.

Gen COX1 je často používán při studiu diverzity různých organismů včetně tasemnic na nízkých taxonomických úrovních (např. Macnish et al., 2002; Nkouawa et al., 2015; Okamoto et al., 1997). V případě hymenolepidních tasemnic, byl COX1 využit v několika studiích. Autoři studie Okamoto et al. (1997) využili ve své studii kromě ITS2 také sekvenci COX1 genu pro porovnání izolátů *H. nana* odebraných z laboratorních myší z Japonska a laboratorních křečků zlatých z Uruguaye a pro porovnání s jinými hymenolepidními tasemnicemi, a to s *H. diminuta* a *H. microstoma*. Autoři další studie Macnish et al. (2002) použili sekvence COX1 genu pro zjištění diverzity u druhu *H. nana* mezi devíti izoláty z hlodavce a šesti lidskými izoláty. Autoři studie Nkouawa et al. (2015) zvolili COX1 gen společně s 28S rDNA za účelem identifikace lidského izolátu hymenolepidní tasemnice objeveného při rutinním epidemiologickém průzkumu v Číně. V rámci naší studie se ukázal gen COX1 jako jediný použitelný, jelikož jeho sekvence byly při porovnání v rámci druhu jediné variabilní.

Získané sekvence COX1 genu byly porovnávány se všemi dostupnými sekvencemi *H. diminuta* dostupnými v GenBank (uvedené v tabulce 2). Toto porovnávání odhalilo velice nízkou hladinu sekvenční variability mezi jednotlivými zástupci, když z celkové délky alignmentu COX1 o délce 747 bp bylo 621 znaků konstantních, 126 variabilních a pouze 17 tzv. parsimony-informativních. Na základě takto nízké variability všech můžeme konstatovat, že jedinci tohoto druhu jsou si blízce příbuzní a je pravděpodobné, že se bude jednat o jeden druh. Toto tvrzení podpořil i následně zkonstruovaný ML fylogenetický strom (Obr. 3).

Teorie možnosti výskytu komplexů kryptických tasemnic u druhu *H. diminuta* tedy nebyla potvrzena. Předpoklad existence těchto komplexů byl založený na výsledcích uvedených ve studii Okamoto et al. (1997) a na již dříve odhalené diverzitě u jiné hymenolepidní tasemnice, konkrétně *H. nana* diskutované ve studii Macnish et al. (2002). Také autoři studie Haukisalmi et al. (2010) uvádějí, že v rámci výzkumu *H. diminuta* objevili více či méně kryptické druhy. Odkazují ale na nepublikovaná data a není tudíž možné tyto výsledky adekvátně porovnat a zhodnotit.

Jedním z cílů bylo také získat izoláty *H. diminuta*, které jsou již používány pro studium helmintoterapie, a zjistit, zda jsou či nejsou fylogeneticky odlišné. Pro účely této studie se podařilo získat dva izoláty, a to český (č. 1) a z Velké Británie (č. 3).

Závěrem lze konstatovat, že při případném zjištění odlišného působení různých izolátů *H. diminuta* na hostitelský organizmus by genetická diverzita neměla hrát roli. Dále lze ze získaných dat odvodit, že ani výběr hostitele (člověk a hlodavec), ani geografická oblast, kde byly *H. diminuta* izolovány, se nevztahují ke genetické variabilitě COX1 genu.

6 ZÁVĚR

Prvním cílem bylo molekulárně-fylogeneticky charakterizovat izolát *Hymenolepis diminuta* používaný v naší laboratoři. Metodou molekulárně-fylogenetické analýzy byl potvrzen předpoklad založený na morfologické identifikaci, že izolát používaný v naší laboratoři je skutečně *H. diminuta*.

Dalším cílem bylo získat izoláty *H. diminuta*, které jsou již používány pro studium helmintoterapie. Pro účely této práce se podařilo získat a zpracovat dva izoláty, a to český (č. 1) a z Velké Británie (č. 3). Kromě těchto izolátů byly také získány a analyzovány dva vzorky z Polska (č. 4 a 5) a jeden z Japonska (č. 2). Všechny vzorky byly posléze fylogeneticky analyzovány, abychom zjistili, zda jsou či nejsou geneticky odlišné.

Molekulárně-fylogenetické analýzy všech zpracovávaných izolátů nepotvrdily předpokládanou genetickou variabilitu, a tedy ani možnost výskytu komplexu kryptických druhů tasemnic v rámci *H. diminuta*. Závěrem lze konstatovat, že při případném zjištění odlišného působení různých izolátů *H. diminuta* na hostitelský organismus by genetická diverzita neměla hrát roli.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Beer R. J. (1976). The relationship between *Trichuris trichiura* (Linnaeus 1758) of man and *Trichuris suis* (Schrank 1788) of the pig. *Research in Veterinary Science*, 20:47–54.

Bickford D., Lohman D. J., Sodhi N. S., Ng P. K., Meier R., Winker K., Ingram K. K. & Das I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22:148-55.

Burisch J., Jess T., Martinato M. & Lakatos P. L. (2013). The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *Journal of Crohn's and Colitis*, 7:322–337.

Cooke A., Tonks P., Jones F. M., O'Shea H., Hutchings P., Fulford A. J. & Dunne D. W. (1999). Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunology*, 21:169–76.

Croese J., O'neil J., Masson J., Cooke S., Melrose W., Pritchard D. & Speare R. (2006). A proof of concept study establishing *Necator americanus* in Crohn's patients and reservoir donors. *Gut* 55:136–7.

Daveson A. J., Jones D. M., Gaze S., McSorley H., Clouston A., Pascoe A., Cooke S., Speare R., Macdonald G. A., Anderson R., McCarthy J. S., Loukas A. & Croese J. (2011). Effect of hookworm infection on wheat challenge in celiac disease – a randomised double-blinded placebo controlled trial. *PLoS One*. 6:e17366.

Elliott D. E. & Weinstock J. V. (2009). Inflammatory bowel disease and the hygiene hypothesis: an argument for the role of helminths. In: Rook G. A. W. *The Hygiene Hypothesis and Darwinian Medicine*, Springer Science & Business Media, Basel, Birkhauser pp. 149–178. ISBN 978-3-7643-8903-1.

Elder K., Baker D. J., & Ribes J. A. (2005). Parasitology, In: *Infections, infertility and assisted reproduction*. Cambridge University Press, New York, pp 131-173. ISBN 978-05-2181-910-7.

Fumagalli M., Pozzoli U., Cagliani R., Comi G. P., Riva S., Clerici M., Bresolin N. & Sironi M. (2009). Parasites represent a major selective force for interleukin genes and shape the genetic predisposition to autoimmune conditions. *Journal of Experimental Medicine* 206:1395-1408.

Garcia L. S. (2006). Intestinal cestodes, In: Diagnostic medical parasitology, 5th ed., ASM Press, Washington D. C., pp. 357-380. ISBN 978-15-5581-380-2.

Gilbert M., Thomas P., Haselkorn T., Bunce M., Sanchez J. J., Lucas S. B., Jewell L. D., Van Marck E. & Worobey M. (2007). The Isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues—which methods are useful when? *PLoS One*, 2:e537

Girgis N. M., Gundra U. M. & Loke, P. (2013). Immune Regulation during Helminth Infections. *PLoS Pathogens*, 9:e1003250.

Haukisalmi, V., Hardman, L.M., Foronda, P., Feliu, C., Laakkonen, J., Niemimaa J., Lehtonen J. T. & Lehtonen H. (2010). Systematic relationships of hymenolepidid cestodes of rodents and shrews inferred from sequences of 28S ribosomal RNA. *Zoologica Scripta*, 39:631–641.

Helmby H. (2015). Human helminth therapy to treat inflammatory disorders – where do we stand? *BMC Immunology*, 16:12.

Hendrix C. M. & Robinson E. (2012). Tapeworms that parasitize domestic animals and humans, In: Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians, 4th ed., Elsevier Health Sciences, St. Louis, pp. 94-122.

Hernandez J. R., Leung G. & McKay D. M. (2013). Cestode regulation of inflammation and inflammatory diseases. *International Journal for Parasitology*, 43:233–243.

Chervy L. (2002). The terminology of larval cestodes or metacestodes. *Systematic Parasitology*, 52:1–33.

Kaser A., Zeissig S. & Blumberg R. S. (2010). Inflammatory Bowel Disease. *Annual Review of Immunology*, 28:573–621.

Katoh K. & Standley D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30:772–780.

Kołodziej P., Rzymowska J., Stępień-Rukasz H., Lorencowicz R., Lucińska M. & Dzióbek M. (2014). Analysis of a child infected with *Hymenolepis diminuta* in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 21: 510–511.

Lerner A., Jeremias P. & Matthias T. (2015). The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. *International Journal of Celiac Disease*, 3:151-155.

- Littlewood D. T. J., Waeschenbach A. & Nikolov P. N. (2008).** In search of mitochondrial markers for resolving the phylogeny of cyclophyllidean tapeworms (Platyhelminthes, Cestoda) – a test study with Davaineidae. *Acta Parasitologica*, 53:133–144.
- Lukeš J., Kuchta R., Scholz T. & Pomajbíková K. (2014).** (Self-) infections with parasites: re-interpretations for the present. *Trends in parasitology* 30:377-385.
- Macnish M. G., Morgan-Ryan U. M., Monis P. T., Behnke J. M. & Thompson R. C. A. (2002).** A molecular phylogeny of nuclear and mitochondrial sequences in *Hymenolepis nana* (Cestoda) supports the existence of a cryptic species. *Parasitology* 125:567–575.
- Marangi M., Zechini B., Fileti A., Quaranta G. & Aceti A. (2003).** *Hymenolepis diminuta* infection in a child living in the urban area of Rome, Italy. *Journal of Clinical Microbiology* 41:3994-5.
- McKay D. M. (2010).** The immune response to and immunomodulation by *Hymenolepis diminuta*. *Parasitology*, 137:385–394.
- Molodecky N. A., Soon I. S., Rabi D. M., Ghali W. A., Ferris M., Chernoff G., Benchimol E. I., Panaccione R., Ghosh S., Barkema H. W. & Kaplan G. G. (2012).** Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142:46-54.
- Nkouawa A., Haukisalmi V., Li T., Nakao M., Lavikainen A., Chen X., Henttonen H. & Ito A. (2015).** Cryptic diversity in hymenolepidid tapeworms infecting humans. *Parasitology International*, 65:83-6
- Okamoto M., Agatsuma T., Kurosawa T. & Ito A. (1997).** Phylogenetic relationships of three hymenolepidid species inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Parasitology*, 115:661-666.
- Pritchard D. (2011).** Worm therapy: for or against? *Journal of Helminthology*, 85:225-7.
- Roberts L. S., Janovy J. & Nadler S. (2013).** Tapeworms, In: Foundations of Parasitology, 9th ed., McGraw-Hill Higher Education, New York, pp. 670. ISBN 978-007-132641-4
- Rook G. A. W. (2012).** Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 42:5-15.

- Rook G. A. W., Raison C. L. & Lowry C. A. (2014).** Microbial 'old friends', immunoregulation and socioeconomic status. *Clinical and Experimental Immunology*, 177:1–12.
- Green M. R. & Sambrook J. (2012).** Molecular cloning: a laboratory manual. 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 34.
- Sartor R. B. & Mazmanian S. K. (2012).** Intestinal microbes in inflammatory bowel diseases. *The American Journal of Gastroenterology Supplements*, 1:15–21.
- Strachan D. P. (1989).** Hay fever, hygiene, and household size. *British Medical Journal*, 299:1259–60.
- Summers R. W., Elliott D. E., Urban J. F., Thompson R. A. & Weinstock, J. V. (2005a).** *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut*, 54:87–90.
- Summers R. W., Elliott D. E., Urban J. F., Thompson R. A. & Weinstock J. V. (2005b).** *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: A randomized controlled trial. *Gastroenterology*, 128:825–832.
- Tena D., Simon M. P., Gimeno C., Pomata M. T. P., Illescas S., Amondarain I., Gonzalez A., Dominguez J. & Bisquert J. (1998).** Human infection with *Hymenolepis diminuta*: Case report from Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 36:2375–2376.
- Tiwari S., Karuna T. & Rautaraya B. (2014).** *Hymenolepis diminuta* infection in a child from a rural area: A rare case report. *Journal of Laboratory Physicians*, 6:58–59.
- Volf P. & Horák P. (2007).** Paraziti a jejich biologie. 1. vyd., Triton, Praha, 318 p. ISBN: 978-80-7437-162-2.
- Waeschenbach A., Webster B. L., Bray R. A. & Littlewood D. T. J. (2007).** Added resolution among ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with complete small and large subunit nuclear ribosomal RNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45:311–325.
- Waeschenbach A., Webster B. L. & Littlewood D. T. (2012).** Adding resolution to ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with large fragments of mtDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63:834–847.
- Watwe S. & Dardi C. (2008).** *Hymenolepis diminuta* in a child from rural area. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 51:149-150.

Weinstock J. V. (2012). The worm returns. *Nature*, 491:183–185.

Werle E., Schneider C., Renner M., Völker M., Fiehn W. (1994). Convenient singlestep, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Research*, 22:4354–4355.

Wiwanitkit V. (2004). Overview of *Hymenolepis diminuta* infection among Thai patients. *Medscape General Medicine* 6:7.

Zhang Y.-Z. & Li Y.-Y. (2014). Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World Journal of Gastroenterology*, 20:91–99.