

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**Studium patogeneze klíšťové encefalitidy  
u hostitelů s odlišnou genetickou  
a imunologickou výbavou**

**Bakalářská práce**

Martin Palus

Vedoucí práce: RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

Konzultant: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer, CSc.

České Budějovice  
2009

**Palus M., 2009:** Studium patogeneze klíšťové encefalitidy u hostitelů s odlišnou genetickou a imunologickou výbavou. [Study of the pathogenesis of tick-borne encephalitis in hosts with different genetic and immunological background]. BSc. Thesis, in Czech. 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Tato práce byla financována granty:

Grantová Agentura České republiky: 524/08/1509

Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy České republiky: MSM 6007665801, LC 06009

**Annotation:**

We examined the influence of host genetic and immunological background on pathogenesis of tick-borne encephalitis. We determined virus titer in organs and serum in different time intervals post-infection. In addition, we also stated mean survival times in different strains of mice with different genetic background following virus inoculation.

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, Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích,

.....

Martin Palus

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli RNDr. Danielu Růžkovi, Ph.D. za příjemné uvedení do světa virů, za čas, který mi věnoval při dlouhých konverzacích, ale hlavně za jeho přátelký přístup a umění člověka motivovat a nadchnout ve svém vědeckém snažení. Můj velký dík a především morální úcta patří mému školiteli-specialistovi Prof. RNDr. Liborovi Grubhofferovi, CSc. za poskytnutí zázemí a za možnost pracovat v Laboratoři molekulární biologie vektorů a parazitů.

Bylo mi skutečně ctí, že jsem měl tu možnost vypracovat svou bakalářskou práci v přátelském kolektivu lidí, kteří byli ochotni pomoci a poradit, kdykoli bylo třeba.

Mé díky ovšem patří i mé rodině a přítelkyni, kteří mě s láskou podporovali v mém snažení.

## Obsah:

<b>1.Úvod</b> .....	1
<b>1.1 <u>Virus klíšťové encefalidity (VKE)</u></b> .....	1
Molekulárně-biologické charakteristiky VKE.....	1
Ekologické a epidemiologické charakteristiky VKE.....	3
Přenos na člověka a klinické projevy.....	5
<b>1.2 <u>Faktory rezistence hostitele vůči infekci flaviviry</u></b> .....	8
<b>1.2.1 <u>Genetická rezistence vůči infekci flaviviry</u></b> .....	8
Počáteční objevy.....	9
Původ genu <i>Flv</i> .....	9
Virová specifita fenotypu alely <i>Flv<sup>r</sup></i> .....	12
Charakteristika <i>Flv<sup>r</sup></i> fenotypu.....	12
Imunitní odpověď a fenotypový projev <i>Flv<sup>r</sup></i> .....	13
Studie flavivirové rezistence na rezistentních a vnímavých buněčných kulturách.....	13
Mapování <i>Flv</i> genu na chromosomu 5.....	14
Klonování genu <i>Flv</i> a identifikace <i>Flv</i> jako <i>Oas1b</i> .....	14
Je genetická flavivirová rezistence interferon dependentní?.....	17
<b>1.2.2 <u>Imunitní odpověď a flavivirová rezistence</u></b> .....	18
<b>Vrozená imunitní odpověď</b> .....	18
Interferony.....	18
Makrofágy.....	19
NK(„natural killer“) buňky.....	19
Komplement.....	20
<b>Získaná imunita</b> .....	20
Protilátková imunita B-lymfocyty.....	20
Buněčná imunita T-lymfocyty.....	21
<b>1.2.3 <u>Ostatní faktory</u></b> .....	23

<b>2.Cíle práce.....</b>	<b>25</b>
<b>3.Materiál a metody.....</b>	<b>26</b>
Myši.....	26
Virus.....	27
Buněčná linie.....	27
Plaková titrace.....	27
Infekce.....	28
Odběr a příprava vzorků.....	28
Stanovení střední doby přežití.....	28
Vyhodnocení výsledků.....	29
<b>4.Výsledky.....</b>	<b>30</b>
Dynamika množení viru u myší s rozdílnou imunologickou výbavou....	30
Dynamika množení viru u myší s rozdílnou genetickou výbavou.....	32
Střední doba přežití myší s rozdílnou genetickou výbavou.....	35
<b>5.Diskuze.....</b>	<b>38</b>
Patogeneze VKE u hostitelů s odlišnou genetickou výbavou.....	38
Patogeneze VKE u hostitelů s odlišnou imunologickou výbavou.....	40
<b>6.Závěr.....</b>	<b>43</b>
<b>7.Literatura.....</b>	<b>44</b>
<b>8.Přílohy.....</b>	<b>58</b>

# 1. Úvod

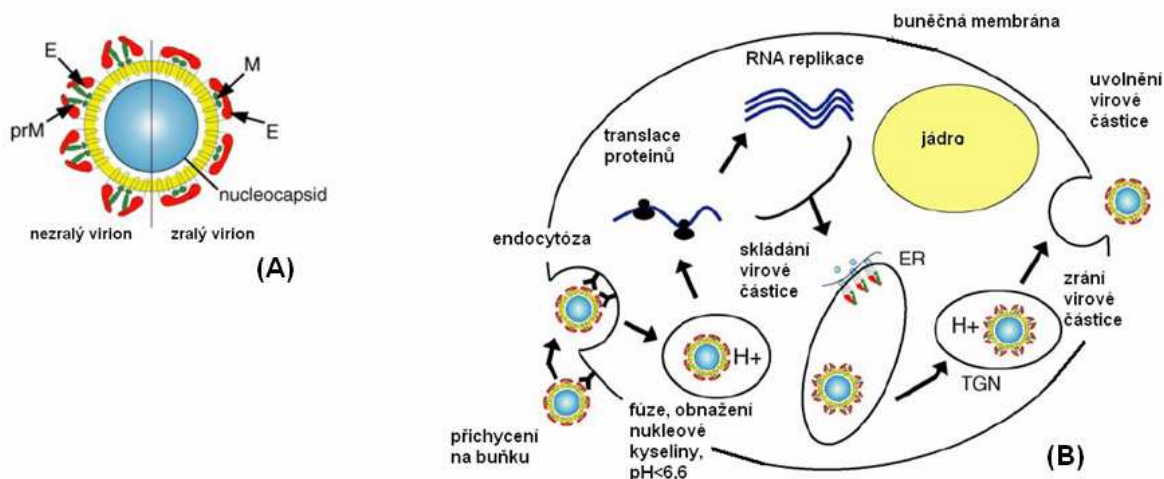
## 1.1 Virus klíšťové encefalitidy

Virus klíšťové encefalitidy (VKE) patří do rodu *Flavivirus*, čeledi *Flaviviridae*. Je původcem klíšťové encefalitidy, jedné z nejnebezpečnějších chorob v Evropě a Asii postihujících centrální nervový systém (Heinz *et al.*, 2000). Celosvětově se roční incidence výskytu choroby odhaduje na 10-12 tisíc případů (Süss, 2003). Proti infekci VKE dosud neexistuje žádný specifický lék a nejúčinnějším způsobem ochrany před infekcí VKE je preventivní očkování (Demicheli *et al.*, 2000).

VKE zahrnuje tři subtypy – evropský, sibiřský a dálnovýchodní. Blíže příbuznými viry z téže skupiny jsou virus vrtivky (Louping ill virus), virus Langat a virus Powassan, které také způsobují encefalitidy u lidí, ale jen zřídka na epidemické úrovni. Další tři příbuzné viry ze stejné skupiny – virus Omské hemoragické horečky, virus horečky Kyasanurského lesa a virus Alkhurma – způsobují častěji než encefalitidy ještě mnohem nebezpečnější hemoragické horečky (Charrel *et al.*, 2001). Mimo tyto klíšťaty přenášené viry je vhodné zmínit také pár dalších významných zástupců z rodu *Flavivirus* přenášených komáry, jako je virus horečky dengue, virus žluté zimnice, virus japonské encefalitidy a virus západního Nilu (Calisher *et al.*, 1989). Tito zástupci dnes patří mezi nejdůležitější znovu se objevující původce onemocnění přenášené krevsajícími členovci.

### **Molekulárně-biologické charakteristiky VKE**

Viriony klíšťové encefalitidy mají průměr kolem 50 nm a skládají se z elektrodenzního jádra, obklopeného lipidovou dvojvrstvou, která obsahuje dva glykoproteiny – protein E (envelope) a protein M (membrane) (Obr. 1.1A). Intracelulární (dosud nezralé) viriony obsahují prekurzor prM protein (Obr. 1.1A), z něhož se M protein vyštěpuje při průchodu virionu ven z buňky (Murphy, 1980). Jádro je tvořeno kapsidovým proteinem C (Obr. 1.1A „nucleocapsid“) a jednořetězcovou RNA o pozitivní polaritě o celkové délce 11 kb. E protein je hlavním povrchovým proteinem virové částice. Interaguje s buněčnými receptory a zprostředkovává fúzi viru s buněčnou membránou. V savčích buňkách také indukuje tvorbu virus-neutralizujících protilátek, které hrají důležitou roli v ustavení ochranné imunitní odpovědi (Heinz, 1986).



**Obr. 1.1** Schématický obrázek strukturní organizace virionu (A) a replikačního cyklu (B) VKE (upraveno dle: Mandl, 2005). U nezralých virionů tvoří protein prM s proteinem E heterodimery, u zralých virionů pak protein E s proteinem M tvoří homodiméry. ER (endoplasmatické retikulum); TGN („trans-Golgi network”).

Genomová RNA obsahuje jeden otevřený čtecí rámeček a kóduje polyprotein tvořený 3400 aminokyselinami, který je štěpen buněčnými a virovými proteázami na tři strukturní proteiny (C, M a E) a sedm nestrukturních proteinů (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B a NS5) (Rice *et al.*, 1985).

		<u>Protein</u>	<u>Velikost [kDa]</u>	<u>Funkce proteinu</u>
5' UTR	STRUKTURNÍ	<b>C</b>	11	hlavní protein kapsidy
		<b>M (prM)</b>	26 z toho M 8	povrchový protein; ochrana E proteinu před proteázami; chaperon-like aktivita
		<b>E</b>	50	virový hemaglutinin, slouží k přichycení na buňce a fúzi membrán, hlavní antigen
	NESTRUKTURNÍ	<b>NS1</b>	46	glykoprotein, vyvolává silnou protilátkovou odpověď; hexamer nezbytný pro RNA replikaci
		<b>NS2A</b>	22	koordinace mezi zabalením RNA a RNA replikací
		<b>NS2B</b>	14	kofaktor NS3 serinové proteázy
		<b>NS3</b>	70	multi-funkční protein, serin proteasový komplex s NS2B; RNA helikáza, RNA replikace; triptofosfatázová aktivita
		<b>NS4A</b>	16	neznámá funkce
		<b>NS4B</b>	27	neznámá funkce
		<b>NS5</b>	103	methyl transferázová aktivita; RdRp (RNA dependentní RNA polymeráza)
11 000 b				
3' UTR				

**Obr. 1.2** Schéma genomu klíšťové encefalidity s funkcí jednotlivých proteinů (shrnutí v: Lindebach *et* Rice, 2003)

Otevřený čtecí rámeček (ORF) všech flavivirů je ohraničený 5' UTR (untranslated regions) netranslatovanou oblastí (asi 130 nukleotidů) a 3' UTR netranslatovanou oblastí (400-700 nukleotidů). RNA v těchto oblastech tvoří sekundární struktury, které pravděpodobně napomáhají při amplifikaci, translaci a balení viru (Gritsun *et al.*, 1997).

### **Ekologické a epidemiologické charakteristiky VKE infekce**

V přirozeném prostředí je virus klíšťové encefalidity přenášen v cyklu zahrnujícím klíšťata jako přenašeče viru a obratlovce jako jeho hostitele, a proto je epidemiologie VKE úzce spjata s ekologií a biologií klíšťat, jejich oblastmi rozšíření a obdobími jejich aktivity. Tyto faktory jsou závislé převážně na klimatických podmínkách (teplotě, vlhkosti, vegetaci), které se vyskytují pouze ve specifických geografických zónách, poskytujících bezbariérové rozšíření klíšťat, a které tvoří

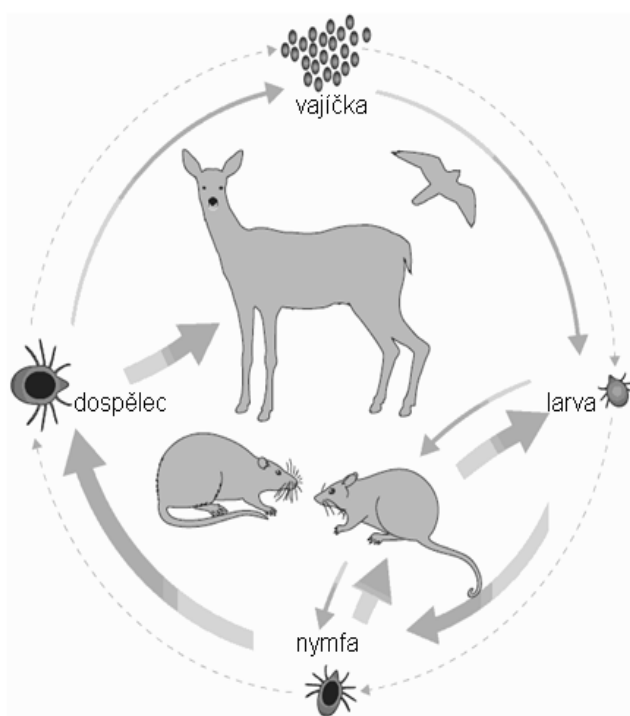


přínejmenším 20 000 - 30 000 přírodních ohnisek infekce VKE napříč severní polokoufí od Evropy po Japonsko (Korenberg *et* Kovalskii, 1999).

Nejčastějšími přenašeči VKE jsou tyto dva druhy klíšťat: *Ixodes persulcatus* jako vektor subtypu sibiřského a dálnovýchodního (Levkovitch *et al.*, 1967) a *Ixodes ricinus* jako hlavní vektor evropského subtypu VKE (Grešíková *et* Nosek, 1981).

Pokud je klíště jednou infikováno virem, zůstává nakaženo po celý život a přenáší virus na další dosud neinfikovaná klíšťata při společném sání na malých hlodavcích. Ačkoli také další obratlovci jako jsou ptáci, vysoká zvěř a koně slouží jako hostitelé viru, nehrají tak důležitou roli při přenosu viru mezi klíšťaty jako drobní hlodavci. Bylo dokonce experimentálně zjištěno, že kopytnatci nejsou kompetentní hostitelé pro přenos viru zpět na sající klíšťata (Labuda *et al.*, 2002). Role člověka jako hostitele VKE je zcela náhodná. Virus se ale velmi dobře adaptoval na klíšťata, a to jak na jejich fyziologické vlastnosti, tak i na jejich chování (Nuttall *et al.*, 1994).

S ohledem na délku životního cyklu klíštěte je klíště hlavním rezervoárem viru (Kožuch *et al.*, 1990). Persistence VKE v klíšťatech je umožněna transstadiálním a transovariálním přenosem (Obr.1.3). Klíšťata obecně mohou být infikována virem KE tzv. viremickým nebo neviremickým způsobem. V prvním případě saje klíště na hostiteli, který v daném okamžiku prodělává virémii. V druhém případě dochází k šíření viru z infikovaného na neinfikované klíště při současném sání dvou a více jedinců na téže hostiteli bez prokazatelného vzniku virémie v hostitelském organismu (Obr. 1.3; Labuda *et al.*, 1996).



**Obr.1.3** Cirkulace VKE v přírodě (upraveno dle Linquist *et* Vapalahti, 2008). Přerušovaná čára zobrazuje různá vývojová stádia klíštěte v cyklu (ve směru hodinových ručiček od vrcholu: vajíčka, larva, nymfa, a dospělec). Klíště potřebuje v každém stadiu krev, aby mohlo přejít do následujícího stadia. Plné čáry prezentují přítomnost viru. Tloušťka šipek znázorňuje pravděpodobnost přenosu viru (shrnutí v Linquist *et* Vapalahti, 2008)

V Evropě se začíná klíštěcí aktivita zvyšovat začátkem jara, kdy teplota vystoupí nad 6°C a obvykle trvá do listopadu, kdy teplota poklesne (Süss, 2003). Pro střední Evropu byly zaznamenány dvě období nejvyšší aktivity klíšťat a to v časném a pozdním létě (Kräusler, 1981). Frekvence výskytu klíšťové encefalitidy je však vázána na volnočasové aktivity během letních měsíců, navzdory podprůměrné aktivitě klíšťat (Süss, 2003).

Prevalence VKE v Evropě je vysoce endemická a pohybuje se mezi 0,1% - 5% klíšťat. Prevalence u nasátých jedinců se zvyšuje až k 10% (Süss *et al.*, 2004). Přítomnost protilátek u obratlovcích hostitelů je zapříčiněna opakovaným vystavením klíšťatům, tyto protilátky jsou citlivým indikátorem VKE v přírodě. Sledování odlehých oblastí a matematické modelování nám poskytuje vylepšené metody pro zmapování rizikových oblastí VKE a umožňuje předpovídat nová evropská ohniska (Sumilo *et al.*, 2007).

### **Přenos na člověka a klinické projevy**

Klíšťová encefalitida v Evropě patří mezi obvykle mírné choroby s nízkou úmrtností (Grešíková *et al.*, 1972). K běžnému přenosu infekce na člověka může dojít přísátím infikovaného klíštěte nebo požitím nepasterizovaného mléka infikovaného savce, do kterého je virus také sekretován (Grešíková, 1958; Blaškovič, 1954).

Inkubační doba první fáze klíšťové encefalitidy je kolem 8 dní od přísátí klíštěte (Kaiser, 1999). Projev příznaků trvá u první fáze kolem 5 dnů, mezi první a druhou fází se nachází 7 denní bezpříznakový interval. Během první fáze virémie se objevují symptomy jako horečka, únava, malátnost, bolest hlavy a bolest celého těla (Mickiene *et al.*, 2002). Ve druhé fázi se mohou objevit středně těžké meningitidy až těžké encefalitidy, které mohou být doprovázeny myelitidami a páteřním ochrnutím. V této fázi jsou neurologické symptomy z principu neodlišitelné od ostatních forem akutních virových meningoencefalitid (Mickiene *et al.*, 2002).

Konzistentní zjištění existence postencefalitického syndromu znázorňuje Tabulka 1.1, zahrnující dvě prospektivní studie (Tomažič *et al.*, 1996; Mickiene *et al.*, 2002), zaznamenávající přetrvávající symptomy po 6-12 měsících a jednu retrospektivní studii po 47 měsících (Haglund *et al.*, 1996). Neurologická dysfunkce spojená s mírným až drtivým dopadem na kvalitu života se projevila ve 30%.

**Tabulka 1.1** Neurologické následky v rekonvalescenci pacientů po infekci virem klíšťové encefalidity evropského subtypu (shrnutí v: Haglund *et al.*, 2003)

	<u>Haglund <i>et al.</i></u> (1996)	<u>Tomažič <i>et al.</i></u> (1996)	<u>Mickiene <i>et al.</i></u> (2002)
<b><u>Základní informace</u></b>			
Počet pacientů	143	492	133
Počet pacientů bez dalšího sledování (%)	20,3	6	15
Doba sledování (median)	47 měsíců	6 měsíců	12 měsíců
Skupina s následky	35,7%	26,1%	46,2%
<b><u>Symptomy</u></b>			
Bolesti hlavy	10%	22,6%	20,5%
Méně významné neuropsychiatrické poruchy	25%	..	..
Poruchy soustředění	..	15,2%	15,4%
Poruchy paměti	..	..	19,7%
Ztráta čichu	1%	..	..
Poruchy zraku a sluchu	4 / 7%	..	..
Emocionální nestabilita	..	..	18,8%
Zvýšený pocit únavy	..	21,7%	..
Parkinsonova choroba	1%	..	..
Pocit slabosti, změna citlivosti	3%	..	..
Přecitlivělost na světlo a zvuk	3%	..	..
Mentální porucha	..	1,4%	..
Poruchy vědomí	..	0,2%	..
Zvýšená potivost	..	5,5%	..
Poruchy vnímání s bolestmi	..	11,2%	..
Ataxie a tremor	13%	10,2%	14,5%
Bolesti zad, končetin	4%	..	..
Spinální nervové paralýzy	3%	2,2%	6,0%
Smrt	1,4%	0,2%	0,8%
.. = údaj neuveden			

Z tabulky 1.1 vyplývá poměrně špatná prognóza infekce klíšťové encefalidity vzhledem k trvalým následkům. Prognóza infekce je úzce spojena s průběhem infekce a hostitelskými faktory, avšak následky encefalidity jsou přímo úměrné poškození mozkové tkáně. Jsou známy tři hlavní mechanismy. Prvním mechanismem je poškození neuronů způsobené přímo virem, druhým mechanismem je imunopatologické působení hostitelského imunitního systému a konečně třetím mechanismem je kombinace obou předchozích, to jest přímé poškození neuronů a imunopatologická odpověď (Chambers *et al.*, 2003; King *et al.*, 2007; Růžek *et al.*, 2009).

## **1.2 Faktory rezistence hostitele vůči infekci flaviviry**

Mnoho studií ukazuje, že vnímavost k dané virové infekci může být ovlivněna mnoha hostitelskými faktory, z nichž význam má genetická výbava, věk, pohlaví, výživa a imunologická výbava, stejně jako faktory virulence daného patogena (Brinton, 1997). Protože infekce viry způsobuje poškození nebo smrt organismu, vytváří tak selekční tlak na populaci hostitele. Z tohoto důvodu se očekává zvýšená frekvence alel snižujících vnímavost k virové infekce v populaci hostitele. Koevoluce viru a jeho hostitele vedoucí ke snížení patogenity zvyšuje pravděpodobnost přežití, jak u hostitele, tak u daného viru (Brinton, 1997; Brinton *et* Nathanson, 1981).

### **1.2.1 Genetická rezistence vůči infekci flaviviry**

Genetická rezistence vůči infekcím vyvolaným viry z čeledi *Flaviviridae* byla u myší poprvé objevena v roce 1920. Postupně bylo zjištěno, že za rezistenci je zodpovědný autosomálně dominantní znak. Rezistentní alela se vyskytovala u divoce žijících kmenů myší po celém světě, zatímco u laboratorních kmenů nebyla přítomna.

U rezistentních zvířat infikovaných flaviviry se virus sice množí, ale nedochází k tak vysoké produkci viru, jako je tomu u myší k infekci více vnímavých, myší bez autosomálně dominantního znaku v dané alele. Projev rezistence je stálý a nevyžaduje produkci interferonu. Gen rezistence vůči infekci zástupci čeledi *Flaviviridae* (*Flv*), byl objeven pomocí klonovacích metod a definovaný jako *Oas1b*. Vnímavé myši produkují vadný protein *Oas1b*. Způsoby, jakými produkt genu *Flv* ovlivňuje rezistentní fenotyp, nejsou dosud přesně známy (Samuel, 2002).

Největší část studií hostitelské genetické rezistence bylo provedeno na myším a kuřecím modelu s přihlédnutím ke schopnosti tvořit inbrední kmeny (Bang, 1978).

Byly popsány myší geny kontrolující rezistenci k odlišným typům virů (Bang, 1978; Brinton, 1997; Brinton *et* Nathanson, 1981; Brinton *et al.*, 1984; Casanova *et al.*, 2002; Skamene, 1985; Skamene *et al.*, 1980). Každý z těchto zaznamenaných rezistentních genů nalezených u myší se projevuje jako unikátní a obvykle kontroluje rezistenci jedné skupiny virů. Avšak jediný lokus, mající vliv na průběh flavivirové infekce u myší, zodpovídal za průběh infekce již na intracelulární úrovni. Tento rezistentní flavivirový lokus byl pojmenován *Flv* (Green, 1989).

## Počáteční objevy

Rezistence vůči infekci flaviviry byla objevena ve dvacátých letech dvacátého století. Vzhledem k nevyjasněné taxonomii virů v té době, byla rezistence znovu popisována na základě experimentů s různými viry, načež až posléze se ukázalo, že všechny tyto patří do stejného rodu *Flavivirus* v rámci čeledi *Flaviviridae*.

Příkladem může být u myši pozorovaná rezistence vůči viru žluté zimnice zaznamenaná před více než padesáti lety (Sawyer *et* Lloyd, 1931), kde se ukázalo, že rezistence je vázána dědičným faktorem (Lynch *et* Hughes, 1936).

Sabin pracující s myšmi kmene PRI (PRInceton) dokázal, že rezistentní autosomálně dominantní gen neposkytuje rezistenci pouze v případě viru žluté zimnice, ale také pro mnoho dalších flavivirů. Studium myšního kmene PRI dokonce umožnilo zjistit, že flavivirová rezistence k virem vyvolaným infekcím je kontrolována dominantní alelou samostatného autosomálního genu. Bylo také dokázáno, že mladé myši (1 až 3 týdny) byly více vnímavé k infekci než myši dospělé. Pokud byl myším intracerebrálně injikován flavivirus s vyšší virulencí, jako je virus francouzské neurotropní žluté zimnice, nebo virus japonské encefalitidy (JEV), dochází k překonání rezistence a úhynu myši, podobně jako je tomu u myši k infekci více vnímavých (Sabin, 1952 a,b).

## Původ genu *Flv*

Jak již bylo zmíněno, gen *Flv* se téměř nevyskytoval u inbredních kmenů laboratorních myší (Darnell *et al*, 1974a). Ukázalo se však, že genetická rezistence vůči flavivirům je častým znakem u několika druhů a poddruhů v rámci rodu *Mus* (Sangster *et* Shellam, 1986; Bonhomme *et* Guenet, 1989). Ze stejného rodu pocházely i dosavadní inbrední kmeny laboratorních myší skládající se z mozaiky genomů druhu *Mus musculus* a poddruhů *domesticus*, *castaneus*, a *molossinus* (Bonhomme *et al*, 1987), která však mohla reprezentovat myší populaci chudou na geny zodpovídající za rezistenci vůči flavivirům. Od šedesátých let dvacátého století však začaly vznikat nové inbrední kmeny odvozené přímo z divokých kmenů myší (Bonhomme *et* Guenet, 1989). Tyto myši pak poskytovaly potenciální zdroj rezistentních genů, které nebyly přítomny u dosavadních laboratorních kmenů.

**Tabulka 1.2** Vnímavost laboratorních myší a divokých kmenů k flavivirům (shrnutí dle Brinton *et Perelygin*, 2003).

Typ myši	Počet testovaných myší	Inokulovaný virus	Mortalita (%)
A/J	10 <sup>a</sup>	17D-YF	100
AKR/J	8 <sup>a</sup>	17D-YF	88
BALB/cJ	10 <sup>a</sup>	17D-YF	100
B10D2/J	26 <sup>a</sup>	17D-YF	100
C3H/He	38 <sup>a</sup>	17D-YF	100
C3H/RV	34 <sup>a</sup>	17D-YF	0
C57BL/6J	9 <sup>a</sup>	17D-YF	100
C57BL/10J	5 <sup>a</sup>	17D-YF	100
DBA/2J	5 <sup>a</sup>	17D-YF	100
SJL/J	10 <sup>a</sup>	17D-YF	90
Swiss/J	5 <sup>a</sup>	17D-YF	100
SWR/J	10 <sup>a</sup>	17D-YF	90
F1 ( <i>M.m.domesticus</i> x C3H/He)	91 <sup>a</sup>	17D-YF	45
F2 (F1 X C3H/He)	41 <sup>a</sup>	17D-YF	17
<i>M.m. domesticus</i>			
Devonshire, CA	5 <sup>a</sup>	17D-YF	0
La Puente, CA	5 <sup>a</sup>	17D-YF	0
Maryland	10 <sup>a</sup>	17D-YF	20
Soledad, CA	5 <sup>a</sup>	17D-YF	0
CASA/Rk	13 <sup>b</sup>	MVE-OR2	15
	14 <sup>b</sup>	17D-YF	0
CAST/Ei	5 <sup>b</sup>	MVE-OR2	0
	3 <sup>b</sup>	17D-YF	0
MOLD/Rk	20 <sup>b</sup>	MVE-OR2	100
	26 <sup>b</sup>	17D-YF	4
C3H/HeJ	9 <sup>b</sup>	MVE-OR2	100
	10 <sup>c</sup>	MVE-OR155	100
	44 <sup>c</sup>	MVE-OR156	95
C3H/RV	14 <sup>b</sup>	MVE-OR2	0
	10 <sup>c</sup>	MVE-OR155	10
	8 <sup>c</sup>	MVE-OR156	0
<i>M. caroli</i> , Thajsko	16 <sup>c</sup>	MVE-OR156	25
<i>M. cookii</i> , Thajsko	12 <sup>c</sup>	MVE-OR156	0
<i>M. m. domesticus</i> (CLA), USA	20 <sup>c</sup>	MVE-OR156	100
<i>M. m. domesticus</i> (JJD), USA	9 <sup>c</sup>	MVE-OR155	44
<i>M. m. molossinus</i> (MOLO), Japonsko	5 <sup>c</sup>	MVE-OR155	100
	9 <sup>c</sup>	17D-YF	0
<i>M. m. musculus</i>			
Dánsko	20 <sup>c</sup>	MVE-OR156	60
Československo	10 <sup>c</sup>	17D-YF	90
<i>M. spicilegus</i> , Jugoslávie	17 <sup>c</sup>	MVE-OR156	0
<i>M. spretus</i> , Španělsko	20 <sup>c</sup>	MVE-OR156	80

<sup>a</sup> Darnell *et al.* (1974a); <sup>b</sup> Sangster *et al.* (1993); <sup>c</sup> Sangster *et al.* (1998).

Obě alely genu pro flavivirovou rezistenci byly široce rozptýleny v populaci divokých myší ve Spojených státech a Austrálii. Divoké rezistentní myši odchycené v Marylandu (Virginia) byly kříženy s inbredním, k infekci vnímavým kmenem C3H/HeJ. U generace F1 a F2 byla testována rezistence vůči flavivirům a výsledky potvrdily, že rezistence je skutečně kontrolována jednou autosomálně dominantní alelou (Darnell *et al.*, 1974a). Ukázalo se také, že u divokých myší *Mus musculus*, odchycených v různých částech Austrálie, je rezistentní gen rozšířen v heterozygotní podobě (Sangster *et Shellam*, 1986). Protilátky proti flavivirům nebyly před očkováním nalezeny v žádném z těchto dvou případů (Darnell *et al.*, 1974a; Sangster *et Shellam*, 1986).

Rezistentní alela *Flv* byla velmi rozšířená v populaci *M. musculus domesticus* v Austrálii, a tak tomu bylo i u populace *M. musculus musculus* v Dánsku, *M. musculus molossinus* (MOLO) v Japonsku, *M. spretus* ve Španělsku, *M. spicilegus* v Jugoslávii, a *M. caroli* a *M. cooki* v Thajsku (Sangster *et al.*, 1998) (Tabulka 1.2). Zajímavé je, že všechny *M. musculus musculus* (kmen CZI-O) z České a Slovenské republiky byly k flavivirovým infekcím vnímavé. Díky těmto studiím bylo také zjištěno, že heterozygotní jedinci nepřežijí, ale pouze zpomalí infekci po intracerebrálním naočkování dvou virulentních kmenů MVEV (virus australské encefalitidy; Murray Valley encephalitis virus) - OR155 a OR156. Infekci atenuovaným kmenem MVEV OR2 heterozygotní jedinci přežívají.

Inbrední kmene odvozené od divokých jedinců odlišného druhu rodu *Mus* byly také testovány na flavivirovou rezistenci (Sangster *et Shellam*, 1986; Sangster *et al.*, 1993). Přestože kmene CASA/Rk a CAST/Ei odvozené od *M. musculus castaneus* se projevovaly stejnými rezistentními znaky jako kmen PRI s *Flv* rezistentní alelou (*Flv<sup>r</sup>*), byla jejich rezistence pouze podobná rezistenci způsobenou *Flv<sup>r</sup>*. Tento rezistentní fenotyp u MOLD/Rk kmene odvozený od divokého kmene *M. musculus molossinus* se odlišoval od *Flv<sup>r</sup>*. U těchto myší nedocházelo po intracerebrálním naočkování atenuovaného kmene žluté zimnice 17D-YFV (Yellow fever virus) k rozvoji infekce, ale po naočkování MVEV se infekce rozvíjela (Sangster *et al.*, 1993). Tato alela formující minoritní rezistenci byla označena jako *Flv<sup>mr</sup>*, znovu objevena byla jako gen *Wnv* při pokusech s virem západního Nilu (West Nile virus) (Mashimoto *et al.*, 2002).

Vysoká frekvence alely rezistence u divoké *Mus* populace je ukazatelem toho, že přítomnost *Flv<sup>r</sup>* je vyvolána důsledkem selekčního tlaku.



## **Virová specifita fenotypu alely *Flv<sup>r</sup>***

Virová rezistence daná *Flv<sup>r</sup>* alelou je specifická pro flaviviry a byla prokázána u celé řady z nich. Z komáry přenášených flavivirů například u infekcí způsobených WNV (Darnell *et al.*, 1974a; Mashimo *et al.*, 2002; Sabin, 1954), dengue (Sabin, 1954), YFV (Darnell *et al.*, 1974a; Lynch *et Hughes*, 1936; Sabin, 1952a; Sangster *et Shellam*, 1986), JEV (Sabin, 1954), MVEV (Sangster *et Shellam*, 1986) a virus Kunjin, virus Alfuy a virus Kokobera (Shellam *et al.*, 1998).

Z flavivirů přenášených klíšťaty byly testovány například louping ill (Webster, 1923) a zástupci dálnovýchodního subtypu viru klíšťové encefalidity (Casals *et Schneider*, 1943). Rezistentní a vnímavé kmeny se projevovaly shodnou vnímavostí k virům z různých čeledí, jako například arenavirů - lymfotická choriomeningitida (Sabin, 1954); tří bunyavirů – horečka Rift-Valley, horečka sandfly (Sabin, 1954) a infekce virem Kununurra (Shellam *et al.*, 1998); picornavirů - poliovirus (Sabin, 1954); rhabdovirů – virus vztekliny (Sabin, 1954); dvou herpesvirů – virus herpes simplex (Sabin, 1954) a myší cytomegalovirus (Shellam *et al.*, 1998).

## **Charakteristika *Flv<sup>r</sup>* fenotypu**

Homozygotně dominantní myši v genu *Flv<sup>r</sup>* jsou obvykle rezistentní vůči flavivirovému onemocnění, avšak nejsou rezistentní vůči infekci těmito viry. Rozvoj infekce též závisí na množství očkováného viru a způsobu očkování. Tyto dva faktory výrazně ovlivňují dopad choroby na hostitele.

Minimální požadované množství viru způsobující smrt myši je u rezistentních myší vyšší, než u myší k infekci více vnímavých. Například homozygotně dominantní myši v genu *Flv<sup>r</sup>* jsou zcela rezistentní vůči intracerebrálnímu naočkování neředěným vakcinačním kmenem žluté zimnice 17D-YFV, kdy kongenní kmeny vnímavých myší vykazovaly 100% mortalitu už při zředění viru  $10^{-2}$  (Darnell *et al.*, 1974a). Po intracerebrálním naočkování  $10^3$ LD<sub>50</sub> MVEV byl titr viru v mozku druhý den po očkování podobný, jak u rezistentních, tak u vnímavých myší, ale v dalších dnech se titr u vnímavého kmene zvýšil více než tisícinásobně ve srovnání s rezistentním kmenem (Urosevic *et al.*, 1997b). Všechny vnímavé myši naočkované MVEV zemřely do šestého dne, ale rezistentní myši infekci přežily a titr viru v jejich mozcích začal po šestém dni klesat. Množství celkové virové RNA v mozkové tkáni bylo znatelně vyšší u vnímavých myší ve srovnání s mozky rezistentních myší (Urosevic *et al.*, 1997b). Z dat je zřejmé, že u myší s genem rezistence *Flv<sup>r</sup>* je replikace flavivirů snížena.

## **Imunitní odpověď a fenotypový projev $Flv^r$**

Jak již bylo výše zmíněno, fenotypový projev genu  $Flv^r$  je zodpovědný za rezistenci vůči flavivirům na intracelulární úrovni, avšak bez neporušeného imunitního systému je přítomnost rezistentní alely zcela zanedbatelná.

Kinetika a počátek antivirové imunitní odpovědi je u vnímavých a rezistentních zvířat podobný. Přítomnost antivirových protilátek v séru rezistentních myší po naočkování Banzí virem byla o tři dny opožděna ve srovnání s vnímavými kongenními kmeny, avšak vrchol titru protilátek byl osmý den po infekci stejný u obou zvířat (Jackoby *et al.*, 1980). Po ošetření rezistentních zvířat cyclohemixidinem, který zabránil účinku antivirových protilátek, všechna rezistentní zvířata zemřela.

Virově specifická T-buněčná cytotoxická aktivita byla detekována do šesti dnů po infekce virem Banzí, vrchol titru se objevil osmý den, a byl zjistitelný až do šestnáctého dne od infekce (Sheets *et al.*, 1979). Neobjevily se žádné rozdíly ani v době působení cytotoxické imunity, ani v jejím rozsahu při porovnání rezistentních a vnímavých zvířat.

Tato data napovídají, že daná buněčná a protilátková imunita specificky nepřispívá k  $Flv^r$  rezistentnímu fenotypu.

## **Studie flavivirové rezistence na rezistentních a vnímavých buněčných kulturách**

Flavivirová rezistence není kontrolována na úrovni, kdy se virus váže na receptor na povrchu buňky, nebo při vstupu do hostitelské buňky.

Srovnatelné množství buněk z rezistentních a vnímavých fibroblastů bylo infikováno WNV a sledováno pomocí imunofluorescence (Darnell *et* Koprowski, 1974b). Ovšem, na všech rezistentních buňkách primárních kultur připravených z mozku, plic, ledvin, fibroblastů a peritoneálních makrofágů byl pozorován nižší titr viru (Darnell *et* Koprowski, 1974b; Goodman *et* Koprowski, 1962a,b; Silvia *et al.*, 2001; Vanio, 1963a,b; Webster *et* Johnson, 1941).

Z výše zmíněných zjištění je patrné, že virová rezistence  $Flv^r$  by mohla být kontrolována na úrovni replikace samotného viru. Pro přiblížení replikace viru u rezistentních a vnímavých buněk byla použita kvantitativní analýza molekul virové RNA (vRNA) s kladnou a zápornou polaritou. V podstatě jde o srovnání množství plus a mínus řetězců vRNA, kdy řetězec s kladnou polaritou je uvolňován z replikačních komplexů, zatímco řetězec se zápornou polaritou je přítomen pouze uvnitř replikačního komplexu. Analýza MVEV RNA v mozcích rezistentních myší ukázala, že kladný

řetězec vRNA je zastoupen v nižších koncentracích než je tomu u mozkových buněk vnímavých myší (Urosevic *et al.*, 1997b). Interpretace těchto dat ukázala, že *Flv<sup>r</sup>* alela redukuje výnosnost replikace flavivirové RNA (Urosevic *et al.*, 1997b).

### **Mapovní *Flv* genu na chromosomu 5**

*Flv* lokus byl nalezen pomocí kongenních kmenů (viz tabulka I.) C3H/RV a C3H/HeJ, které současně nesly rozdílné alely *Ric<sup>r</sup>* a *Ric<sup>s</sup>*, umístěné na chromosomu 5, lokus *Ric*. Tento lokus kontroluje rezistenci vůči *Rickettsia tsutsugamushi* (Jerrells *et Osterman*, 1981).

Později bylo zjištěno, že druhý chromosom 5 se liší mezi myšími kmeny C3H/RV a C3H/HeJ současně v lokusu *rd*, který je blízce spojen s lokusem *Ric* (Groves *et al.*, 1980; Lyon *et Kirby*, 1993). Defektní *rd* alela na *rd* lokusu způsobovala degeneraci žlutého sítnicového pigmentu (Bowes *et al.*, 1989). Díky těmto objevům byla zjištěna přítomnost zdravé divoké alely u kmene C3H/RV a defektní *rd* alela u C3H/HeJ. Rozdíly mezi kongenními kmeny C3H u *rd* a *Ric* alely jsou pravděpodobně výsledkem společné dědičnosti těchto alel vázané na vyselektovaný gen *Flv<sup>r</sup>* (Flaherty, 1981). Pro zmapování polohy genu *Flv* byly použity čtyři markery: *Pgm-1*, *Eta-1* (obdoba lokusu *Ric*), *rd* a *Gus-s* (Sangster *et al.*, 1994). Následně byly navrženy primery pro 20 mikrosatelitních markerů, které byly zmapovány v oblasti myšího chromosomu 5. Ty pak byly použity pro bližší zmapování *Flv* lokusu (Urosevic *et al.*, 1993, 1995, 1997a).

Lidský chromozom 7 a 12 obsahuje homologní geny k oblasti, kde se nachází *Flv* na myším chromosomu 5 (Lyon *et Kirby*, 1993).

### **Klonování genu *Flv* a identifikace *Flv* jako *Oas1b***

Gen *Flv* byl rozpoznán díky prvnímu nalezení všech genů v oblasti markeru D5Mit159 na chromosomu 5 a díky porovnání sekvence mRNA transkribované z každého z těchto genů u rezistentních a vnímavých kongenních kmenů myší a buněk (Perelygin *et al.*, 2002). Genomové klony pokrývající oblast větší než 700 kb na myším chromosomu 5 byly vybrány z bakteriální knihovny (BAC) na základě použití sondy připravené podle markerové sekvence D5Mit159 a ze sond sestavených podle terminálních sekvencí z vybraných BAC klonů. Dílčí cDNA byly osekvenovány. Pozice těchto genů na chromosomu 5 byla následně potvrzena v genomové myší databázi Celera porovnáním cDNA sekvencí. Na tomto podkladě byly posléze navrženy nové primery podle databáze Celera k identifikaci 12 nových transkriptů na myším

chromosomu 5. Jeden z dalších nalezených genů byl *Oas1h* (Kakuta *et al.* 2002). Ve zkoumané oblasti (>700kb) na chromosomu 5 bylo nalezeno 22 genů, zahrnujících 10 lokusů kódujících 2`-5` oligonadenylát syntetázy (*Oas*) (Perelygin *et al.*, 2002).

Zatímco lidská genová rodina OAS byla dobře charakterizována, Perelygin *et al.* (2002b) byl první, kdo charakterizoval myši *Oas* genovou rodinu. Před touto studií bylo identifikováno pouze 5 z 12 myších *Oas* genů. Tato genová rodina je u myši vícenásobně zastoupena (12 genů) ve srovnání s lidskou genovou rodinou (4 geny), obzvláště s přihlédnutím k mnohonásobné duplikaci genu *Oas1*.

Kritéria při identifikaci *Flv* lokusu jsou založena na charakteristikách rezistentního fenotypu: geny se vyskytují poblíž markeru D5Mit159 na chromosomu 5; mRNA z *Flv<sup>r</sup>* alely je trvale transkribována a její exprese je tkáňově nespecifická; rezistentní alela C3H.PRI-*Flv<sup>r</sup>* a alela vnímavého kmene C3H/He se od sebe odlišují mutací, která ovlivňuje expresi nebo funkčnost *Flv* produktu a zároveň tato mutace ukazuje úplnou fenotypovou korelaci pro všechny rezistentní a vnímavé myši kmeny (Brinton *et Perelygin*, 2003). Posledním kritériem identifikace je, že daná exprese produktu *Flv<sup>r</sup>* musí být dominantní znak a musí negativně ovlivňovat flavivirovou replikaci (Brinton *et Perelygin*, 2003).

Každý z 22 genů z oblasti *Flv* byl amplifikován pomocí RT-PCR z kongenních flavivirově rezistentních a vnímavých myších kmenů, sekvenován a porovnán. Sekvence byly z velké části genů shodné, lišily se pouze v „tiché“ (silent) substituci mezi oběma kmeny. Jednotlivé báze se nejvíce lišily v oblasti *Oas1b* cDNA kongenních C3H.PRI-*Flv<sup>r</sup>* a C3H/He myších kmenů, tyto odlišnosti nezpůsobí změnu aminokyseliny, avšak C820T tranzice vyúsťuje k předčasnému vzniku stop kodonu u vnímavého C3H/He kmene. *Oas1b* protein z myšího kmene C3H/He postrádá 30% z C-terminální sekvence ve srovnání s kmenem C3H.PRI-*Flv<sup>r</sup>* (Perelygin *et al.*, 2002). Gen *Oas1b* je přítomen u 4 kmenů rezistentních myši v plné délce proteinu (BRVR, C3H.PRI-*Flv<sup>r</sup>*, CASA/Rk a CAST/Ei), u 5 vnímavých kmenů (129/SvJ, BALB/c, C3H/He, C57BL/6 a CBA/J) byl kódován identický zkrácený protein. Kmen myši MOLD/Rk, kmen s minoritní flavivirovou rezistencí, kódující proteinový produkt *Flv<sup>mr</sup>* se od *Flv<sup>r</sup>* nelišil délkou, ale 14 aminokyselinovými substitucemi. Protein *Oas1b* kmene MOLD/Rk obsahoval také alanin v pozici 65, jako tomu bylo u vnímavých myši. Flavivirově vnímavý fenotyp koreluje s C820T tranzicí v genu *Oas1b* u 10 studovaných myších kmenů. Na základě tohoto zjištění byl gen *Flv* identifikován jako gen *Oas1b* (Perelygin *et al.*, 2002).

### **Potenciální funkce rezistentní alely *Flv'* genu *Oas1b***

Všech 10 genů *Oas* je navzájem blízce spojeno a nachází se v distální části myšího chromosomu 5.

Protein *Oas1b* představuje krátká (40-47 kDa) 2'-5' oligoadenylát syntetáza. Všechny *Oas* proteiny obsahují 3 domény. Centrální doména je konzervovaná transferáza, zatímco N- a C- terminální doména jsou unikátní a liší podle velikosti *Oas* (krátká 40-47kDa; střední 85-86 kDa; dlouhá 126 kDa). Funkční znak identifikovaný u krátké 2'-5' oligoadenylát syntetázy zahrnuje N- terminální LxxxP motiv. Tento motiv je nezbytný pro aktivitu oligoadenylát syntetáz (Ghosh *et al.*, 1997a) a P-smyčku, u které se předpokládá tvorba dvojvlákna RNA (dsRNA) (Saraste *et al.*, 1990). Další motiv potřebný pro správné fungování myší 2'-5' oligoadenylát syntetázy je DAD Mg<sup>2+</sup> (Yamamoto *et al.*, 2000). Motiv P-smyčky u *Oas1b* obsahuje deleci 4 aminokyselin u vnímavé i rezistentní alely, tato delece se nevyskytuje u žádné jiné myší 2'-5' oligoadenylát syntetázy (Perelygin *et al.*, 2002).

C-terminální konec obsahuje CKF motiv, který je potřebný k tertamerizaci malých forem lidských 2'-5' oligoadenylát syntetáz (Ghosh *et al.*, 1997b). Homotetramery krátkých forem *Oas* proteinů zůstávají inaktivní až do interakce s dsRNA. Po aktivaci katalyzují syntézu 2'-5' oligoadenylátu (2-5A) z ATP. 2-5A indukuje aktivaci dimerizací RNázy L. Aktivovaný dimer RNázy L přednostně odstraňuje adenin-uracyl a uracyl-uracyl dinukleotidy po rozpletení dsRNA (Wreschner *et al.*, 1981). Protein *Oas1b* u vnímavých myší obsahuje poškozený C- terminální konec, kde chybí CKF motiv, a proto tento protein není schopný tvořit homotetramery.

*Oas1b* proteiny se u rezistentních a vnímavých myší odlišují také v jednobázové substituci v doméně P-smyčky, která ovlivňuje specifitu RNA vazby.

Je ovšem možné, že k degradaci vRNA pomocí RNázy L přispívá jiný produkt *Oas1* genu, který je aktivní 2-5A syntetázou, ale pak neobjasňuje virově specifický efekt produktu *Flv'* genu. Protein *Oas1b* z rezistentní buňky může mít pouze dodatečné funkce, které ovlivňují virovou replikaci (Samuel, 2002; Urosevic, 2003).

### **Je genetická flavivirová rezistence interferon dependentní?**

Prvé studie na produkci interferonu typu I (INF-I = INF- $\alpha$ ;- $\beta$ ) a efektu flavivirové rezistence, provedené na modelu geneticky vnímavých a kongenních rezistentních kmenů myší, poskytly kontroverzní výsledky (Hanson *et al.*, 1969; Brinton *et al.*, 1982).

Hanson a spolupracovníci pracovali s virem západního Nilu (WNV) a dospěli k závěru, že virus v rezistentních kmenech myší způsobuje zvýšení antivirové odpovědi nadprodukcí INF-I (Hanson *et al.*, 1969). Navzdory tomu, výsledky Brintonovy skupiny vedly k odlišnému tvrzení. Brinton pracoval s virem žluté zimnice, jímž byly infikovány rezistentní a vnímavé kongenní kmeny myší, které byly před inokulací ošetřeny specifickými protilátkami proti INF-I. Bohužel se neprokázala žádná výrazná změna ve zdravotním stavu myší ani v titru viru v mozkové tkáni (Brinton *et al.*, 1982; Brinton *et Perelygin*, 2003). Dokonce bylo zjištěno, že produkce INF-I v pokusech *in vitro* a *in vivo* infekcí WNV byly konzistentně nižší u rezistentních kmenů, avšak inhibující efekt ekvivalentního množství exogenního INF-I byl lehce vyšší u rezistentních buněk než u buněk vnímavých (Hanson *et al.*, 1969; Darnell *et Koprowski*, 1974b).

Rezistence řízená genem *Flv* by potom také mohla být dodatečně zvýšena vnitrobuněčnou RNázovou aktivitou. Toto navýšení by mohlo být následkem ošetření INF-I, které stimuluje OAS/RNase L cestu (Urošević, 2003).

Zatímco působení INF-I může zlepšit efekt *Flv<sup>r</sup>* pomocí up-regulace cesty OAS/RNáza L, nemusí úbytek INF-I nezbytně znamenat ztrátu efektu rezistentního genu, pokud nedojde k úplnému vyřazení RNázové aktivity (Urošević, 2003).

## 1.2.2 Imunitní odpověď a flavivirová rezistence

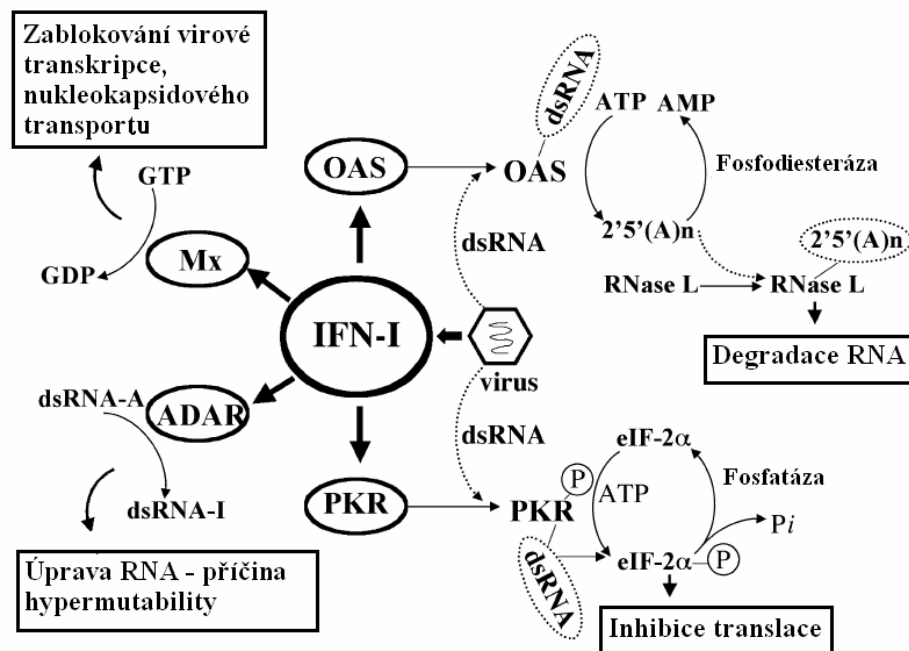
Při výzkumu imunitní odpovědi hostitele vůči flavivirům a její role v patogenezi bylo podáno mnoho klinických a experimentálních důkazů pro vzájemný vztah mezi ochranou proti flavivirům a přítomností virově specifických protilátek, ale molekulární ani vnitrobuněčná podstata dosud nebyla zcela objasněna.

### Vrozená imunitní odpověď

#### Interferony

Role interferonů má v obraně proti flavivirové infekci nezanedbatelný význam. Pravděpodobně prvními buňkami produkujícími interferony typu I (INF- $\alpha$ ;- $\beta$ ) v odpovědi na flavivirovou infekci, a tudíž prvními buňkami inicializujícími antivirovou odpověď, jsou v kůži přítomné dendritické buňky (Libraty *et al.*, 2001).

INF-I může indukovat několik paralelních antivirových kaskád v buňce (Obr.1.4) zahrnujících čtyři hlavní faktory: dsRNA („double strand“ = dvouvláknovou) dependentní proteinkinázu (PKR), 2`-5` oligoadenylát syntetázu (OAS) proteinové rodiny/ ribonukleázy L (RNázy L) (viz výše), adenosindeaminázu (ADAR) a Mx proteiny (Urosevic, 2003; Anderson *et Rahl*, 2002; Diamond *et Harris*, 2001; Diamond *et al.*, 2000).



**Obr. 1.4** Schéma hlavních antivirových drah spouštěných interakcí viru s INF-I (upraveno dle: Urosevic, 2003).

Myši trpící nedostatkem INF-I nebo jejich receptorem vykazují zvýšenou vnímavost k infekci flaviviry (Johnson *et Roehring*, 1999).

Role interferonu typu II (INF II = INF  $-\gamma$ ) v ochraně proti flavivirům je méně objasněna. Tento cytokin má mnoho efektů vůči hostitelské buňce napadené flaviviry. Přinejmenším zahrnuje indukci zánětlivé reakce a antivirových molekul, jako je oxid dusnatý, a zvýšení fagocytózy makrofágů přes zvýšení exprese Fc receptorů. Hraje důležitou roli v souvislosti s T pomocnými lymfocyty (Th1) virově specifickou imunitní odpovědí pro kontrolu infekce encefalickými viry (shrnuto v: Chambers *et Diamond*, 2003).

Ukázalo se, že flaviviry jsou schopné snížit některé interferon-dependentní antivirové mechanismy (Diamond *et al.*, 2000). Mechanismus, jakým je tento antivirový efekt omezen, zůstává dosud neobjasněn. Stejně tak je otázkou, zda INF I hrají významnou roli pouze jako spouštěče vnitrobuněčné obrany, nebo zda jejich hlavní vliv na průběh flavivirové infekce je skrze imunoregulační funkce buněčné imunity.

### **Makrofágy**

Aktivace makrofágů a modulace jejich efektorových funkcí je základní částí patogeneze flavivirových infekcí (Spain-Santana *et al.*, 2001). Obranná imunitní funkce v podobě odpovědi makrofágů představuje produkci cytokinů a prezentaci antigenu buňkám buněčné (T) a protilátkové (B) imunitní odpovědi (Kulkarni *et al.*, 1991). Fagocytická aktivita makrofágů vyúsťuje ve zvýšenou virémii, neuroinvasivitu viru a těžkou encefalitidu (Ben-Nathan *et al.*, 1996; Zisman *et al.*, 1971). Vlivem produkce zánětlivých mediátorů (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8,...) a akumulací makrofágů dochází v těchto místech k poškození tkáně (Atrasheuskaya *et al.*, 2003). Chování makrofágů je fundamentální pro patogenezi flavivirové choroby, ovšem jejich chování je určeno především produkcí zánětlivých stimulantů (viz INF II) na buněčné úrovni.

### **NK („natural killer“) buňky**

NK buňky lyzují buňky napadené virem uvolněním cytotoxických granul obsahujících perforin a granzymi, nebo navázáním se na apoptosu-iniciující receptor na povrchu buňky (Orange *et al.*, 2002). Byly provedeny *in vivo* studie s virem Langat, WNV a VKE. Při infekci myši těmito viry docházelo k aktivaci a náhlému potlačení aktivity NK buněk (Vargin *et Semenov*, 1986). Tento jev byl však vysvětlen skutečností, že flaviviry mají mechanismus, kterým se mohou před NK buňkami



maskovat a to skrze zvýšení exprese MHC i na povrch napadené buňky (King *et* Kesson, 1988).

## **Komplement**

Komplement inhibuje viry hned několika mechanismy (Volanakis, 2002), počínaje lýzou obalených virových částic a virem infikovaných buněk pomocí C5-C9 membránu napadajícího komplexu; zbavení se viru z oběhu po opsonizaci proteolytickými fragmenty C3, C3b a C3bi, následovaného proniknutím do buněk, které exprimují receptor pro komplement; a C3-usnadněná absorpce antigenu a jeho prezentace makrofágy a dendritickými buňkami (Ochsenbein *et* Zinkernagel, 2000) během připravování imunitní odpovědi T a B lymfocytů (Ochsenbein *et al.*, 1999).

## **Získaná imunita**

Role protilátkové a buněčné imunitní odpovědi během patogeneze flavivirové infekce byly studovány na různých modelech zahrnujících aktivní a pasivní imunizaci v běžných a v imunodeficientních kmenech myši a buněk. Mozaika porozumění základním mechanismům obrany proti akutní encefalitidě začíná dávat smysl.

## **Protilátková imunita – B lymfocyty**

Protilátková odpověď na E a NS1 protein, zahrnující mnoho epitopů, včetně neutralizujících protilátek proti E proteinu i protilátek proti NS1 virovému proteinu, může zabránit vzniku fatální encefalitidy, jak již bylo demonstrováno při mnoha pasivních a aktivní imunizačních experimentech na zvířecím modelu (Diamond *et al.*, 2003; Gould *et al.*, 1987; Putnak *et* Schlesinger, 1990).

Mechanismus protilátkami řízené obrany proti flavivirové infekci zahrnuje přímou neutralizaci vazbou na receptor (Crill *et* Roehrig, 2001), zablokování rozbalení viru (Gollins *et* Porterfield, 1984), a Fc receptor závislé pučení viru přes retikuloendoteliární systém (Heinz, 1986; Roehrig *et al.*, 1989). NS1 protilátková neutralizace byla také zdokumentována (Cane *et* Gould, 1988; Puntak *et* Schlesinger, 1990). Předpokládá se, že protilátky proti NS1 zprostředkovávají lýzi virem infikovaných buněk, které exprimují tento protein na svém povrchu (Schlesinger *et al.*, 1990). Ačkoliv se neutralizující funkce protilátek považuje pouze za obranný mechanismus (Markoff, 2000), je tento proces pravděpodobně doplněn efektorovou

funkcí vrozeného a získaného imunitního systému, která hraje roli v kontrole infekce a je méně snadno demonstrovatelná.

Myši postrádající B lymfocyty, a tedy i protilátky, jsou více vnímavé k flavivirovým infekcím a encefalitidám (Diamond *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2001).

Flavivirová infekce typicky vyvolává IgM odpověď, která může často přetrvávat po dlouhé období (Monath, 1971). A to i přestože experimentálně zjištěná počáteční IgM odpověď k encefalickým virům si může udržet proměnlivou neutralizační aktivitu a obrannou kapacitu (Diamond *et al.*, 2003).

Zatímco role intenzivní IgM odpovědi může poskytovat trvalou neutralizující aktivitu, je mnohem důležitější aktivace komplement-dependentní cesty zahrnující programovanou virově specifickou B a T buněčnou odpověď. Podstata IgG protilátek pak zahrnuje široké spektrum uplatnění, včetně inhibice hemaglutinace, komplement fixace a neutralizace viru (Chambers *et al.*, 2003).

V každém případě, anamnestická protilátková odpověď se ukazuje být stěžejní v obraně proti encefalickým virům ve směru imunizace a tvorbě nových modelů, které figurují při pasivní protilátkové vakcinaci (Konishi *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2001).

### **Buněčná imunita - T lymfocyty**

Buněčná imunita jasně přispívá ke kontrole virové infekce v experimentálních zvířecích modelech, ale liší se v závislosti na zaměření výzkumu a ve vztahu k virulenci daného patogena. Myši postrádající T buňky selhávají při tvorbě obranné imunity po subletálním vystavení kmenu viru žluté zimnice (Bradish *et al.*, 1980).

Role virově specifických CD4<sup>+</sup> T buněk při flavivirové encefalitidě není dostatečně objasněna, přestože experimentální modely ukazují potřebu takovýchto buněk v obraně proti akutním chorobám. Některé z cytotoxických T buněčných odpovědí na infekce dengue a JEV jsou zahrnuté v CD4<sup>+</sup> buňkách a jsou pravděpodobně řízeny Fas/FasL interakcemi, které mají význam pro možnou imunopatologickou odpověď jak v perifériích, tak v centrální nervové soustavě (shrnutí v: Chambers *et al.*, 2003).

Mnoho posledních studií se zabývalo objasněním role CD8<sup>+</sup> T buněk ve flavivirových infekcích. Flavivirově specifické CD8<sup>+</sup> T buňky mají mnoho efektorových funkcí, včetně cytotoxické aktivity a produkce INF-II (Liu *et al.*, 1989). Kvantifikování CD8<sup>+</sup> T buněčné odpovědi vůči infekci žluté zimnice u pokusných myši

(van der Most *et al.*, 2002) odhaluje aktivaci imunodominantních epitopů a je podporováno pozorováním, že u myši postrádajících CD8<sup>+</sup> znak neprobíhá dostatečná likvidace infekce z centrálního nervového systému (Liu *et Chambers*, 2001). Některé studie s virem australské encefalitidy (Lincon Luna *et al.*, 2002), virem dengue (Rothman *et Ennis*, 1999), virem západního Nilu (Wang *et al.*, 2003) a virem klíšťové encefalitidy (Růžek *et al.*, 2009) naznačují, že cytotoxicita zprostředkovaná CTL (cytotoxickými T lymfocyty) přispívá k rozvoji patogeneze infekce flaviviry.

Ačkoliv výzkum postupuje stále rychlejšími a delšími kroky vpřed, efektorové vlastnosti T buněk a jejich role v obraně proti flavivirům jsou stále otázkou.

### **1.2.3. Ostatní faktory**

Navzdory všem zjištěním, na věku závislá rezistence vůči flavivirům v oblastech endemických pro lidské choroby, je rezistence silně ovlivněna efektem imunizace a opakujícími se inaparentními infekcemi s homologním nebo heterologním virem. Důsledkem takovýchto kumulativních imunitních odpovědí pak může být zvýšená obrana nebo zmírnění průběhu choroby (Kurane, 2002; Solomon *et Vaughn*, 2002). Je však stále otázkou, v jaké míře, a hlavně v jakém stádiu, je organismus připraven na první střetnutí s „nepřítelem“ .

Experimentálně doložené svědectví, které se týká predispozice nervového systému k patogenezi encefalitidy při infekci JEV, je ve své podstatě pediatrikou záležitostí. Je založeno na faktu, že arboviry mají sklon k rychlému rozšíření v nervové tkáni mladých hlodavců, a to pokud možno co nejdříve, než dojde k rozvoji rezistence, která je zde představována omezenou replikací viru v neuronech, jako důsledek diferenciací a zrání těchto neuronů (Hase *et al.*, 1993).

Další studie na myším modelu, tentokrát s virem Sinbis, ukázala, že rozdílná exprese genů v neurálních buňkách mladých a starších myší zodpovídá za rezistenci vázanou na stáří jedince. Geny účastníci se tohoto procesu zahrnovaly regulátory apoptózy, na interferon reagující geny a jiné druhy regulace, které jsou řízeny vývojem (Labrada *et al.*, 2002).

Anderson a Hanson (1974) sledovali rozdíly ve vnímavosti myší k flavivirové infekci u dospělých myších samců a samic po inokulaci encefalitou St. Louis. Vnímavost myších samic byla téměř shodná s vnímavostí samců ve stáří dvou měsíců, ovšem ve stáří tří a čtyř měsíců došlo u samic k poklesu mortality (Andersen *et Hanson*, 1974). Zdá se, že genetické faktory, hormonální efekt a proces stárnutí může ovlivnit rezistenci vůči flavivirům.

Koexistence infekce jiného agens může také ovlivnit rezistenci vůči flavivirovým encefalitidám (Azad *et al.*, 2003; Pavri *et al.*, 1975; Hayashi *et Arita*, 1977). Tento fakt hraje důležitou roli nejen ve výzkumu a je třeba uvědomit si možné následky v experimentálních pokusech, kdy může docházet ke vzniku oportunních chorob a interferencím s přítomným agens.

Další vliv na flavivirovou rezistenci mohou mít *OAS* geny účastníci se aktivace RNase L (viz výše). Mechanismus propojující rezistenci s geny není zcela znám a mohl

by zodpovídat i za jiné potencionální funkce *OAS* proteinů na vnitrobuněčné úrovni při virovém napadení (Samuel, 2002).

## **2. Cíle práce**

1. Vypracovat kritickou literární rešerši zaměřenou na faktory resistance hostitele vůči infekci flaviviry.
2. Infikovat soubor rekombinantních kongenních myší virem klíšťové encefalitidy; zaznamenat mortalitu myší a střední dobu přežití, stanovit titr viru ve vybraných orgánech v různých časových intervalech po infekci.
3. Infikovat soubor imunologicky odlišných kmenů myší virem KE; stanovit titr viru ve vybraných orgánech v různých časových intervalech po infekci.

### 3. Materiál a Metody

#### Myši

Myši s rozdílnou imunologickou výbavou, Balb/c a C57Bl/6 kmeny myší byly původně získány z laboratoří Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany). CD8 $\alpha$ -knockout myši, odvozené z kmene C57Bl/6 (CD8<sup>-/-</sup>; kmen B6.129S2-Cd8a<sup>tm1Mac</sup>), byly získané z The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). SCID myši (C.B17/Irc-scid) odvozené od kmene Balb/c pocházely původně z laboratoří Charles River Laboratories (Sulzfeld, Germany). Tyto myši byly umístěny v plastových nádobách s podestýlkou ze sterilních dřevěných hoblin v gnotobiologických izolátorech (BEM Znojmo, Czech Republic) se vzdušnými filtry. Myši měly k dispozici vodu a sterilní granulovanou potravu *ad libitum*. Pro pokus bylo použito 12 dospělých (6-8 týdnů starých) myších samic z každé skupiny.

Myši s rozdílnou genetickou výbavou, rekombinantní kongenní kmeny (RCS- „Recombinant Congenic Strains“) byly získány křížením Balb/c-c-STS/Dem (CcS/Dem) řady. Původně vzniklých 20 CcS/Dem kmenů nese různou, náhodnou kombinaci 12,5% genů z kmene STS/A a 87,5% genů z Balb/cHeA kmene (Démant, 1986). V pokusech byly použity kmeny myší STS, Balb/c, CcS3, CcS5, CcS7, CcS9, CcS12, CcS15, CcS 16 a CcS18, které byly laskavě poskytnuty doc. Marií Lipoldovou, CSc., vedoucí Oddělení molekulární a buněčné imunologie, Ústavu molekulární genetiky AVČR v Praze na základě dohody o spolupráci. Myši byly infikovány virem KE ve stáří 18-22 týdnů, vzhledem k důležitosti kompletně vyvinutých aspektů imunitního systému. V pokusech u myší s rozdílnou genetickou výbavou byly použity myši obou pohlaví.

Pro stanovení střední doby přežití v pokuse s rekombinantními kongenními kmeny bylo použito 18 myší (CcS3 – 5 myší; CcS5 – 6 myší; CcS9 – 3 myši; STS – 10 myší; Balb/c – 9 myší), ostatní kmeny nebyly zahrnuty vzhledem k celkovému počtu myší a významnosti experimentu. Pro stanovení titru viru v orgánech byly použity rekombinantní kongenní kmeny CcS3, CcS5, CcS12, CcS18 a parentální kmeny Balb/c a STS.

Vzhledem k níže uvedeným skutečnostem (přítomnost infekce myšího noroviru) jsou uveřejněny výsledky z předpokusů pro stanovení střední doby přežití zahrnující 49

myší v zastoupení: CcS3 – 6 myší; CcS5 – 9 myší; CcS7 – 6 myší; CcS12 – 6 myší; CcS15 – 8 myší; CcS16 – 6 myší, Balb/c – 8 myší.

Kmeny Balb/c, C57Bl/6 a CD8<sup>-/-</sup> a rekombinantní kongenní kmeny myší CcS3, CcS5, CcS7, CcS9, CcS12, CcS15, CcS16, CcS18, včetně parentálních kmenů STS a Balb/c, byly umístěny v experimentálních „specific-pathogen free“ podmínkách v plastových nádobách s podestýlkou z dřevěných hoblin. V experimentální místnosti byla udržována konstantní teplotou 22 °C a 65% vlhkost vzduchu.

## **Virus**

V pokusech prováděných na myších s různou genetickou výbavou, byl použit virus KE, kmen Hypr. Kmen Hypr je český prototypový kmen viru klíšťové encefalitidy, původně izolovaný z krve desetiletého dítěte, u kterého byla zjištěna infekce virem klíšťové encefalitidy v roce 1953 na území České republiky. 20% suspenze viru byla udržována ve zmrazené podobě (-70°C) a pasážována v mozcích sajících myšek (přesný počet pasáží není znám).

V pokusech, kde byly použity kmeny s různou genetickou výbavou, byl myším inokulován evropský prototypový kmen viru klíšťové encefalitidy, Neudoerfl. Tento kmen byl izolován z klíštěte *Ixodes ricinus* v Rakousku roku 1971 a jeho vlastnosti byly dobře popsány, včetně odhalení celé genomové sekvence a stanovení trojrozměrné struktury jeho obalového proteinu E (Rey *et al.*, 1995). V pokusu byla použita 4. mozková pasáž viru. Virus byl uchováván při teplotě -70°C.

## **Buněčné linie**

Pro plakovou titraci byla použita buněčná linie PS (“porcine kidney stable”; prasečí ledvina) (Inoue *et al.*, 1962). Tyto buňky byly kultivovány v médiu L15 (Leibowitz) (Sigma) s přídavkem 3% prekolostrálního telecího séra (PTS), 1% antibiotik a antimykotik (Sigma; penicilin, streptomycin, amphotericin B) a 1% glutaminu při 37°C. Pasáž byla prováděna suchou trypsinizací.

## **Plaková titrace**

Titř viru, vyjádřený v plakotvorných jednotkách (PFU, angl. Plaque forming units), byl stanovován metodou plakové tirace (de Madrid *et Porterfield*, 1969). Pro plakovou titraci byly použity 24 jamkové panely. Testované vzorky byly naředěny desítkovou řadou v kultivačním mediu. Poté bylo do každé jamky přidáno 300 µl



buněčné suspenze v množství 1,1-1,4 x 10<sup>5</sup> buněk (koncentrace 4-5 x 10<sup>5</sup> buněk/ml) a obsah panelu byl řádně promíchán. Buňky byly inkubovány při 37°C v atmosféře 0,5% CO<sub>2</sub>. Po 4 hodinách byly buňky převrstveny 400 µl přelivu (roztok 1,5% karboxymethylcelulóza a 2x koncentrovaného kultivačního média v poměru 1:1). Vše bylo inkubováno po dobu 4-5 dní za teploty 37°C v prostředí 0,5% CO<sub>2</sub>. Vzniklé plaky byly vizualizovány barvením, kdy byly panely nejprve promyty ve fyziologickém roztoku a živé buňky byly obarveny roztokem naftalenové černě (1 g naftalenové černě, 60 ml ledové kyseliny octové, 13,6 g octanu sodného, doplněno do 1 l destilované vody).

### **Infekce**

Myši ve všech částech pokusů byly inokulovány subkutánně. Myši lišící se imunologickou výbavou byly inokulovány množstvím 100 pfu virového kmene Hypr, myši lišící se genetickou výbavou množstvím 10<sup>4</sup> pfu kmene Neudoerfl. Myši použité v předpokuse pro střední dobu přežití byly infikovány 10<sup>3</sup> pfu kmenem Neudoerfl.

### **Odběr a příprava vzorků**

Odběr vzorků u myší s rozdílnou imunologickou výbavou byl prováděn ve čtyřech intervalech: 1., 3., 6., a 8. den p.i. Odběr vzorků u myší s rozdílnou genetickou výbavou byl prováděn ve třech intervalech: 3., 7. a 11. den p.i.

Při dosažení daného časového bodu byly 3 myši z každé skupiny anestetizovány (inhalační anestetikum diethylether) a humánně usmrceny cervikální dislokací. Byly jim odebrány vzorky krve, slezina a mozek. Krev byla ponechána stát 15 minut při pokojové teplotě za účelem sedimentace koagula. Z následně stočeného vzorku bylo odebráno krevní sérum, které bylo zamraženo (-70°C) pro pozdější zpracování plakovou titrací. Orgány byly zváženy. Následně byly homogenizovány v předchlazené třecí misce za vzniku 20% (w/v) suspenze a klarifikovány centrifugací (13 tisíc otáček/min). Odebraný supernatant byl zmražen (-70°C) pro pozdější zpracování plakovou titrací. Veškeré vzorky byly během přípravy a následných pokusů uchovávány na ledu.

### **Stanovení střední doby přežití**

Pokus, kdy byla sledována střední doba přežití u myší s rozdílnou genetickou výbavou, trval 29 dní. Počet přežívajících myší byl zaznamenáván denně ve stejnou dobu po celou dobu pokusu.

### **Vyhodnocení výsledků**

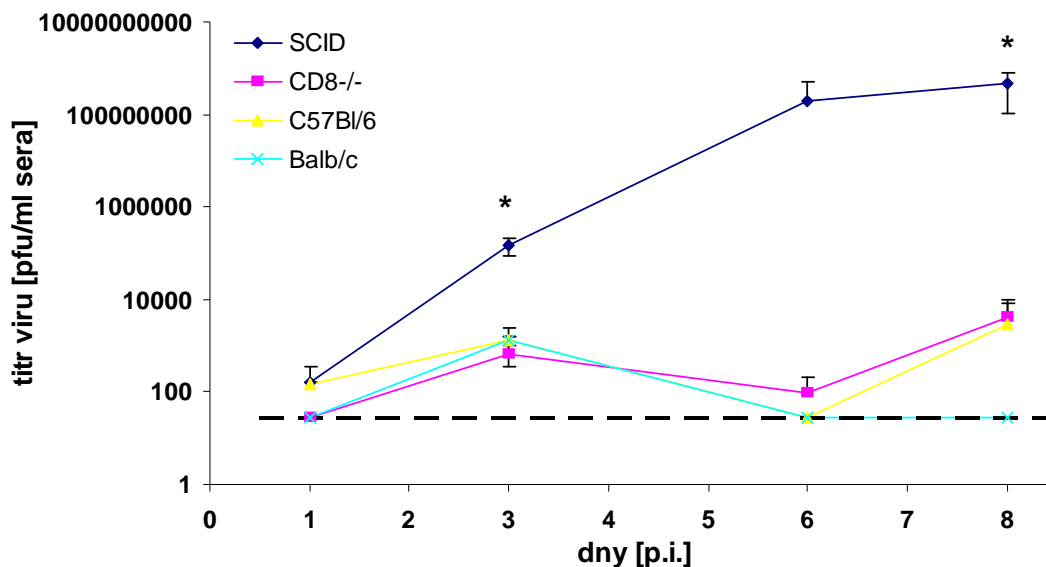
Statistická významnost výsledků titru viru v orgánech byla vyhodnocována programem Statistica (StatSoft CR, Praha, verze 8.) pomocí analýzy variance (Fischer LSD Post Hoc test). U hodnot, které nevykazovaly normální rozdělení, byla data zlogaritmována. Výsledky, jejichž hladina významnosti  $p$  je menší než 5%, byly považovány za signifikantní a jsou v grafech označeny hvězdičkou. Data získaná při zjišťování střední doby přežití byla vyhodnocena „Survival Analysis“.

## 4. Výsledky

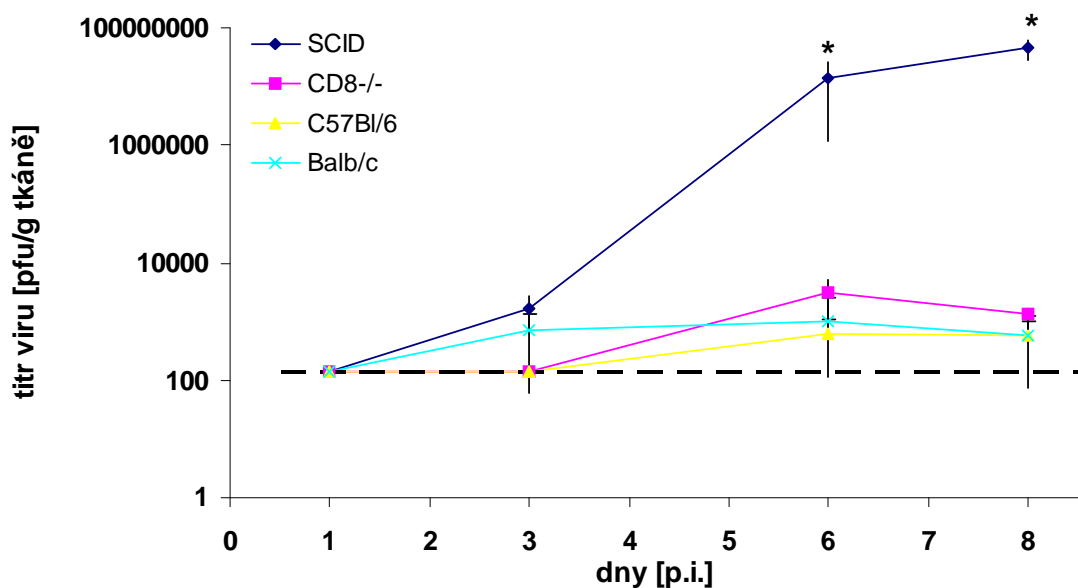
### Dynamika množení viru u myší s rozdílnou imunologickou výbavou

Skupiny myší SCID,  $CD8^{-/-}$ , C57Bl/6 a Balb/c byly subkutánně inokulovány 100 pfu prototypového neurovirulentního kmenu Hypr. Kmen myší se závažnou kombinovanou imunodeficiencí (SCID) je srovnáván s kompetentním kmenem myší Balb/c. Myši postrádající  $CD8^{+}$  buňky jsou označovány jako  $CD8^{-/-}$  a jsou kmenem odvozeným od C57Bl/6 myší, a proto jsou tyto kmeny použity pro srovnání důležitosti role buněk  $CD8^{+}$  při infekci VKE.

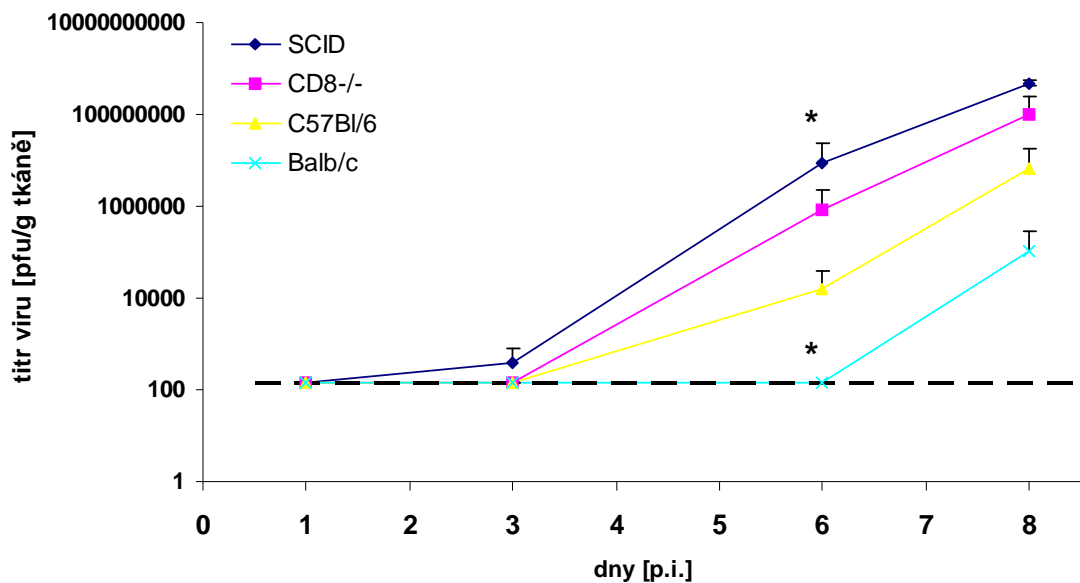
V krvi, slezině a mozku (Obr. 4.1; Obr. 4.2; Obr. 4.3) byl pozorovatelný průběh virémie, kdy u myší  $CD8^{-/-}$ , C57Bl/6 a Balb/c docházelo k nástupu virémie a následnému poklesu titru působením imunitního systému, rozdíly mezi těmito skupinami nejsou signifikantní. Signifikantní rozdíl byl však pozorován u kmene SCID, prokazujícího se dlouhotrvajícím, stále se zvyšujícím množstvím viru ve srovnání s ostatními kmeny. Hodnoty množství viru v krvi (3. a 8. den p.i.) a ve slezině (6. a 8. den p.i.) byly mnohem vyšší v porovnání s ostatními kmeny (Obr. 4.1; 4.2). V mozkové tkáni (Obr.4.3) byl signifikantní rozdíl pozorován mezi SCID a Balb/c myšmi 6. den p.i.. Nízká virémie se u všech kmenů projevuje ve 3. dni p.i. K opětovnému zvýšení titru viru pak došlo u kmenů  $CD8^{-/-}$  a C57Bl/6 8. den p.i. v krvi (Obr. 4.1).



**Obr. 4.1** Graf závislosti množství VKE (pfu/ml) v krevním séru na čase po inokulaci. Přerušovaná čára znázorňuje spodní detekční mez. Každý bod reprezentuje průměr ze tří myší. Výsledky, jejichž hladina významnosti  $p$  je menší než 5%, byly považovány za signifikantní a jsou v grafu označeny hvězdičkou.



**Obr. 4.2** Graf závislosti množství VKE (pfu/g) ve slezině na čase po inokulaci. Přerušovaná čára znázorňuje spodní detekční mez. Každý bod reprezentuje průměr ze tří myší. Výsledky, jejichž hladina významnosti  $p$  je menší než 5%, byly považovány za signifikantní a jsou v grafu označeny hvězdičkou.



**Obr. 4.3** Graf závislosti množství VKE (pfu/g) v mozku na čase po inokulaci. Přerušovaná čára znázorňuje spodní detekční mez. Každý bod reprezentuje průměr ze tří myší. Výsledky, jejichž hladina významnosti  $p$  je menší než 5%, byly považovány za signifikantní a jsou v grafu označeny hvězdičkou.

#### Dynamika množení viru u myší s rozdílnou genetickou výbavou

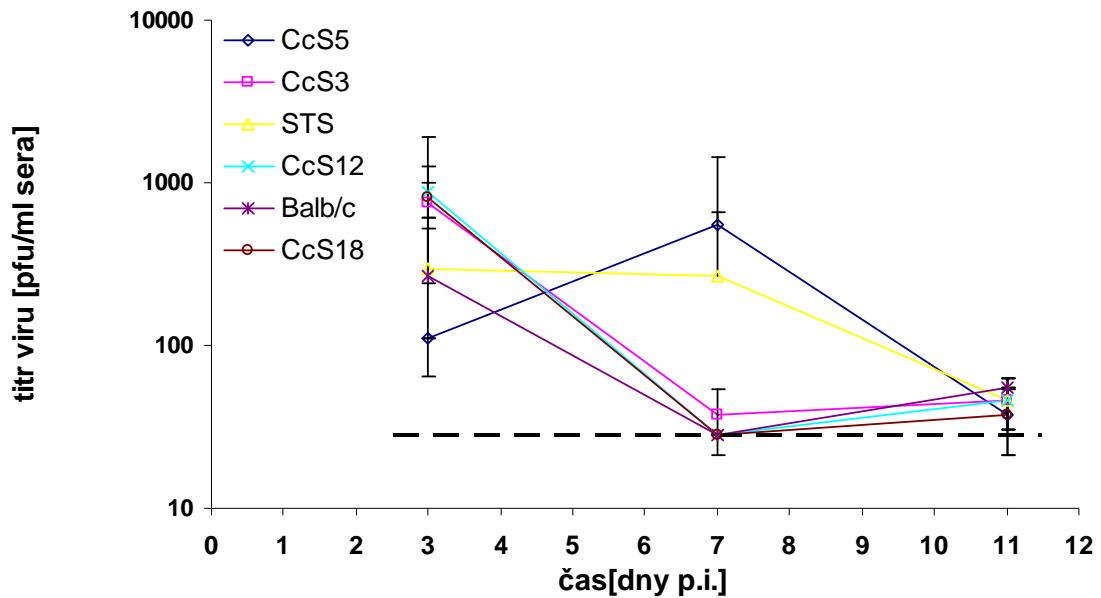
Rekombinantní kongenní kmeny (CcS3, CcS5, CcS9, CcS12 a CcS18), včetně parentálních kmenů myší (Balb/c, STS), byly subkutánně inokulovány VKE kmenem Neudoerfl, dávkou  $10^4$  pfu.

Kmeny myší - CcS3, CcS5, CcS9, CcS12 a CcS18 byly pozitivně testovány na přítomnost myšího noroviru, pozitivita 3 + ze 4 možných (AnLab Ltd.; Praha, Česká republika). Tato skutečnost je patrná i na průkaznosti rozdílů mezi skupinami v níže uvedených grafech (Obr.4.4; Obr.4.5; Obr.4.6; Obr.4.7). Myší norovirus však nebyl přítomen u parentálních kmenů – Balb/c a STS.

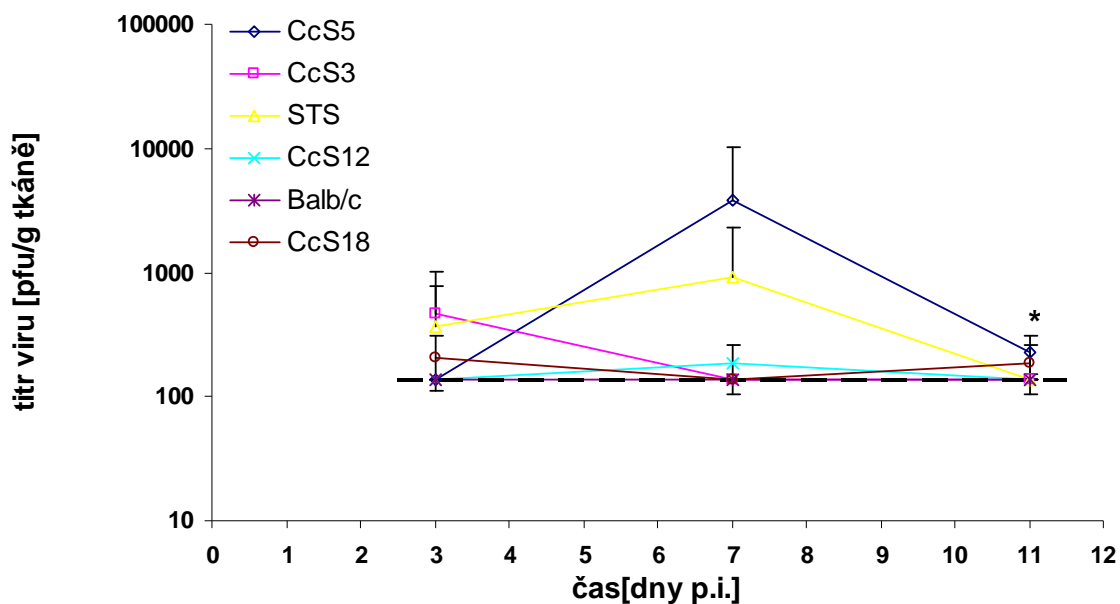
Množení viru v krvi a slezině myší STS kmene mělo odlišný průběh od ostatních skupin, se zřetelem na kmen CcS5, kde vrchol titru viru byl způsoben jednou odlehlou hodnotou ze tří pozorování. Vrchol titru viru u kmene STS se objevil kolem 3. dne p.i. a přetrvával téměř až do 7. dne p.i. Titr viru ve slezině měl pak vrchol v 7. den p.i. 7. den p.i. byl u STS kmene detekován virus i v mozkové tkáni. V kontrastu k STS myším stojí kmen Balb/c, kde virémie proběhla před 3. dnem p.i., ve stejnou dobu byl virus detekován i ve slezině, a mozková tkáň byla napadena podstatně dříve než tomu bylo u

kmene STS, tato data korespondují s výsledky získanými v pokusech se střední dobou přežití (Obr.4.7; Obr.4.8).

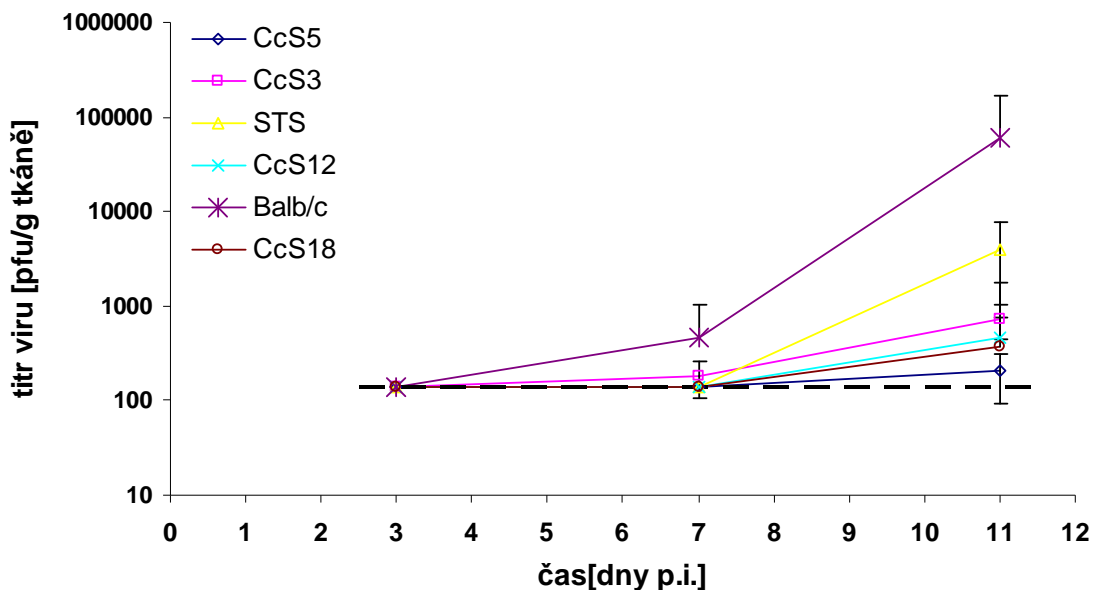
V naměřených hodnotách titru VKE v následujících třech grafech byla průkazná pouze jedna skupina myší - CcS5 - 11. den p.i.(Obr.4.5).



**Obr. 4.4** Graf závislosti množství VKE (pfu/ml) v krevním séru na čase po inokulaci. Přerušovaná čára znázorňuje spodní detekční mez. Každý bod reprezentuje průměr ze tří myší, kromě odběrů ze 3. dne p.i. u kmenů CcS12 a CcS18 a v případě 7. dne u kmene CcS18, kde byly použity vždy dvě myši z daného kmene. Při tomto pokusu nebylo dosaženo výsledků, jejichž hladina významnosti  $p$  by byla menší než 5%.



**Obr. 4.5** Graf závislosti množství VKE (pfu/g) ve slezině na čase po inokulaci. Přerušovaná čára znázorňuje spodní detekční mez. Každý bod reprezentuje průměr ze tří myší, kromě odběrů ze 3. dne p.i. u kmenů CcS12 a CcS18 a v případě 7. dne u kmene CcS18, kde byly použity vždy dvě myši z daného kmene. Výsledky, jejichž hladina významnosti  $p$  je menší než 5%, byly považovány za signifikantní a jsou v grafu označeny hvězdičkou (skupina myší CcS5 se v tomto bodě signifikantně lišila od skupin CcS3, STS, CcS12 a Balb/c).



**Obr. 4.6** Graf závislosti množství VKE (pfu/g) v mozku na čase po inokulaci. Přerušovaná čára znázorňuje spodní detekční mez. Každý bod reprezentuje průměr ze tří myší, kromě odběrů ze 3. dne p.i. u kmenů CcS12 a CcS18 a v případě 7. dne u kmene CcS18, kde byly použity vždy dvě myši z daného kmene. Při tomto pokusu nebylo dosaženo výsledků, jejichž hladina významnosti  $p$  by byla menší než 5%.

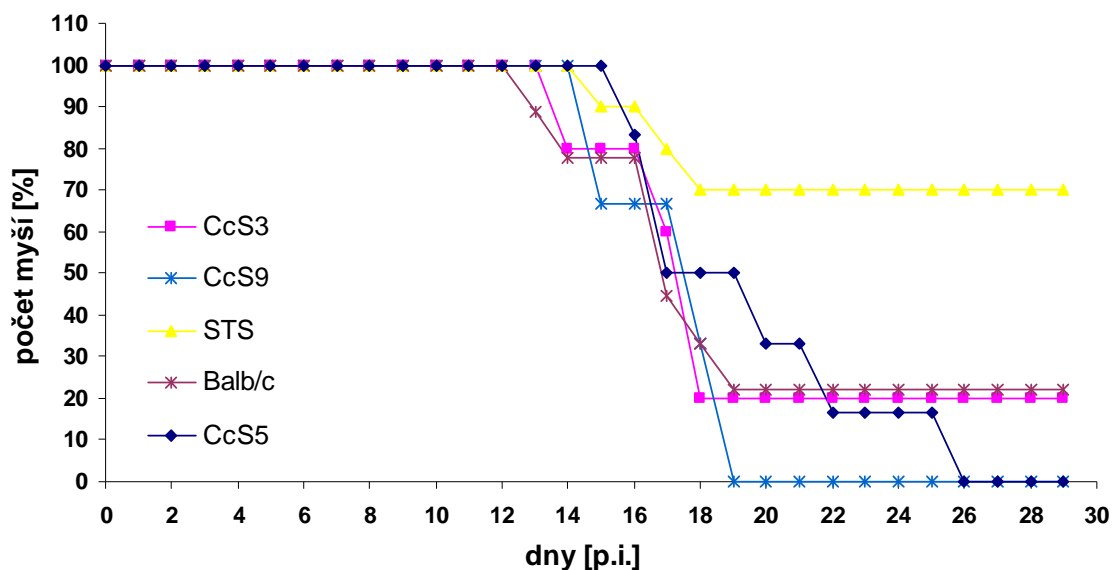
#### **Střední doba přežití myší s rozdílnou genetickou výbavou**

Následující grafy (Obr.4.7; Obr.4.8) znázorňují mortalitu myší v závislosti na dnech po inokulaci. Z důvodu přítomnosti myšího noroviru ve skupinách uváděných v Obr.4.7 jsou uvedena data získaná v přípravném pokuse Obr.4.8. Tato data byla získána před výskytem infekce myšího noroviru v chovu.

Střední doby přežití, jejich směrodatné odchylky a počet přeživších myší jsou uvedeny vždy pod příslušným grafem (Obr.4.7; Obr.4.8) v tabulkách (Tabulka 4.1; Tabulka 4.2).

V rámci souboru rekombinantních kongenních kmenů myší nebyla pozorována plná rezistence k infekci virem klíšťové encefalitidy. Nejmírněji probíhala infekce u kmene CcS3 (Obr.4.7; Obr.4.8) a STS (Obr.4.7).



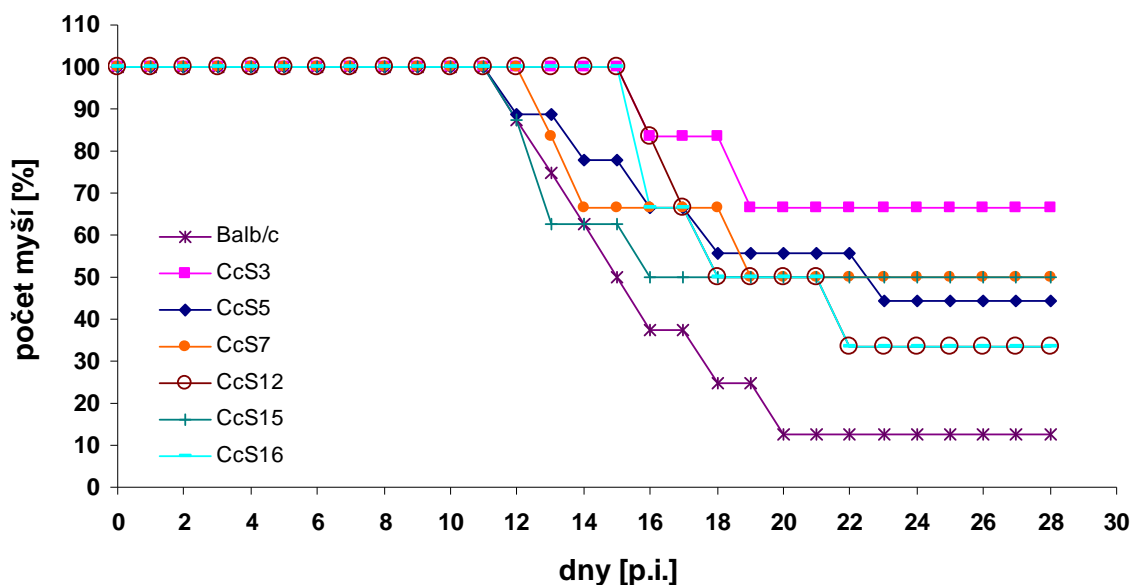


**Obr. 4.7** Graf závislosti přežívání myší infikovaných VKE na dnech po inokulaci. Pokus proběhl bezprostředně v období před objevením infekce myšího noroviru v chovu, nutno pro tento pokus uvažovat jeho možný vliv na střední dobu přežití. Přežití STS myší v tomto pokusu bylo odlišné od ostatních skupin, avšak vzhledem k nízkému počtu myší v dalších skupinách není možné provést směrodatnou statistickou analýzu.

**Tabulka 4.1** Tabulka středních dob přežití myších kmenů uvedených v grafu: Obr.4.7.

Délka trvání pokusu 29 dní.

Kmen myší	CcS5	CcS3	CcS9	STS	Balb/c
Střední doba přežívání [dny]	18,7	18,4	16,3	23,9	18,4
Směrodatná odchylka [dny]	± 3,8	± 6,1	± 2,1	± 6,7	± 6,3
Počet myší, které přežily / celkový počet myší	0/6	1/5	0/3	7/10	2/9



**Obr. 4.8** Graf závislosti přežívání myši infikovaných VKE na dnech po inokulaci. Získaná data pochází z předpokusu, proto se zde nepředpokládá vliv myšího noroviru. Výsledků, jejichž hladina významnosti  $p$  je menší než 5% ( $p < 0,05$ ), bylo dosaženo pro rozdíly středních dob přežití mezi kmeny Balb/c - CcS3 a Balb/c - CcS16.

**Tabulka 4.2** Tabulka středních dob přežití myších kmenů uvedených v grafu: Obr.4.8. Výsledky, jejichž hladina významnosti  $p$  je menší než 5%, byly považovány za signifikantní a jsou v tabulce označeny hvězdičkou. Délka trvání pokusu 28 dní.

Kmen myší	Balb/c*	CcS3*	CcS5	CcS7	CcS12	CcS15	CcS16*
Střední doba přežívání [dny]	16,1	24,2	21,1	21,2	20,8	20,3	22,8
Směrodatná odchylka [dny]	± 5,5	± 6,0	± 7,2	± 7,8	± 5,9	± 8,4	± 6,0
Počet myší, které přežily / celkový počet myší	1/8	4/6	4/9	3/6	2/6	4/8	2/6

## 5. Diskuze

### Patogeneze KE u hostitelů s odlišnou genetickou výbavou

Průběh KE u lidí zahrnuje komplex zánětlivých procesů, skládajících se z úzce propojených elementů buněčné a protilátkové imunity (Gelpi *et al.*, 2006). Významné zánětlivé infiltráty v CNS (centrální nervový systém), pozorované při fatálních případech KE, byly převážně složeny z T-lymfocytů, makrofágů a mikroglíí. B lymfocyty se v CNS vyskytovaly jen vzácně (Gelpi *et al.*, 2005).

Buněčná imunita chrání sice CNS před infekcí, ale v okamžiku kdy patogen invaduje do CNS nastane situace, kdy cytotoxická aktivita začne zhoršovat průběh nemoci (Dorries, 2001). Cytotoxické CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty interagují s MHC třídou I („main histocompatibility complex“ – hlavní histokompatibilní komplex) a uvolňují granzymy B, serinovou proteázu, která způsobí smrt cílové buňky indukci apoptózy nebo nekrózy (Budihardjo *et al.*, 1999). Některé vědecké skupiny během svých pokusů také zjistily, že při nedostatku cytotoxických efektorových funkcí (*Fas* ligandu a perforinů) nedochází ke vzniku flavivirových encefalitid (Lincon Luna *et al.*, 2002). Cytotoxické buňky CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty značně zvyšují neurální poškození CNS v případě KE (Gelpi *et al.*, 2006).

Ačkoliv se imunopatologie flavivirových encefalitid jeví být primárně řízena CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty, není přesně známá role virově specifických CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů, přestože některé pokusy nasvědčují na nezastupitelnou potřebu těchto buněk během akutní infekce (Chambers *et al.*, 2003). Předpokládá se, že CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty konrolují virovou infekci přes aktivaci odpovědi B a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytů, produkcí zánětlivých a antivirových cytokinů, přímými cytotoxickými efekty na infikované buňky a podporou paměťové funkce B lymfocytů (Sitati *et al.*, 2006). *In vivo* studie Sitatiové a Diamonda z roku 2006 poukazují na nepostradatelnou úlohu CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů v omezení patogeneze při infekci virem západního Nilu. Dle této studie dochází u myší postrádajících CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty ke zvýšení perzistence viru a v neposlední řadě ke zvýšení mortality. Navzdory tomu nebyla zjištěna zvýšená mortalita u myší postrádajících CD4<sup>+</sup> T-lymfocyty v případě viru žluté zimnice (Liu *et al.*, 2001) ani viru dengue (Shresta *et al.*, 2004).

V případě CD8<sup>-/-</sup> myší po infekci vysokou dávkou virem západního Nilu mortalita poklesla ze 100% (imunokompetentní myši) na 82%; myši, které podlely, navíc měly výrazně delší střední dobu přežití oproti imunokompetentním myším. CD8-

deficientní myši měly však přesto signifikantně vyšší titr viru v mozku v průběhu celého trvání pokusu. To poukazuje na to, že imunopatologický účinek  $CD8^+$  T-lymfocytů má významnou úlohu i v případě infekce virem západního Nilu (Wang *et al.*, 2003). Ale v okamžiku, kdy byla použita menší dávka viru, se zdálo, že efekt  $CD8^+$  T-lymfocytů je opačný, totiž, že primárně zprostředkovává likvidaci viru (Wang *et al.*, 2003), což je ve shodě i s další studií (Shrestha *et al.*, 2004). Zdá se tedy, že to, zda  $CD8^+$  T-lymfocyty vykazují imunopatologickou či obrannou úlohu, je determinováno řadou faktorů, mezi které patří mj. dávka viru a jeho virulence.

Výsledky získané z pokusů na myších kmenem lišících se imunologickou výbavou nasvědčují zjištění, že  $CD8^+$  T-lymfocyty sice přispívají k odstraňování VKE z organismu, nicméně současně vykazují imunopatologické účinky. Na úlohu těchto buněk při odstraňování viru poukazuje fakt, že po infekci myši dávkou 100 pfu VKE, byly titry viru signifikantně vyšší u SCID kmene v porovnání s ostatními kmeny, a to jak v krvi, tak i ve slezině a v mozkové tkáni. Podobně tomu bylo i v případě infekce viru západního Nilu (Wang *et al.*, 2003). Nicméně na druhou stranu, navzdory vysokým titrům viru v orgánech, byla u SCID kmene pozorována vyšší střední doba přežití po infekci VKE oproti ostatním kmenům myši a pouze mírné histopatologické změny v mozkové tkáni (Růžek *et al.*, 2009). Vysoký titr viru v mozkové tkáni pozorovaný u těchto myši byl výrazně vyšší v porovnání s kmenem Balb/c, proto se nepředpokládá, že by titr viru přímo ovlivňoval střední dobu přežití nebo patologii (Růžek *et al.*, 2009). Z ostatních výsledků vedoucích k závěru limitovaného významu  $CD8^+$  T lymfocytů při odstraňování VKE z organismu, je nutné zmínit malý rozdíl titru viru v krvi, slezině a mozku mezi  $CD8^{-/-}$  a C57Bl/6 kmeny myši. Z našich výsledků je patrné, že  $CD8^+$  T-lymfocyty mají pouze malý vliv na potlačení infekce.

Získané výsledky v případě našich jiných experimentů s VKE (Růžek *et al.*, 2009), však poukazují na roli  $CD4^+$  T lymfocytů jako buňky potlačující infekci VKE a  $CD8^+$  T lymfocytů jako buňky podléjící se na imunopatologii VKE.

### **Patogeneze KE u hostitelů s odlišnou imunologickou výbavou**

Studium patogeneze KE v rekombinantních kmenech myši bylo provedeno z toho důvodu, abychom byli schopni odpovědět na otázku, zda za průběh infekce VKE zodpovídá jeden gen nebo zda je odpověď výsledkem polygenního působení.

Protože Balb/c a STS kmeny poskytují kombinaci poměrně různorodého genetického materiálu, byly vybrány pro vznik rekombinantí kongenní řady (Démant *et*

Hart, 1986). Tyto myši byly původně určeny pro studium nádorů tlustého střeva (Groot *et al.*, 1992). Dárcovský kmen STS (12,5% genomu) byl k nádorům rezistentní, zatímco genom příjemce (87,5% genomu) Balb/c vysoce inklinoval k vývoji adenomů a adenokarcinomů (Moen, 1991). Řady RCS („Recombinant Congenic Strains“) jsou ovšem vhodné pro studium různých biologických procesů (imunitní odpověď, metabolismus, atd.) stejně jako ke studiu mnoho patologických stavů (autoimunita, infekce, arteroskleróza, atd.). Další výhoda spočívá ve skutečnosti, že každý RCS kmen představuje inbrední linii, která může být využita při fokusaci daného genu (Groot *et al.*, 1992). O vhodnosti zahrnutí CcS/Dem řady do studie patogeneze klíšťové encefalidity se lze přesvědčit při pohledu na grafy zobrazující závislost přežívání parentálních kmenů myší na čase (Obr.4.7; Obr.4.8) a na průběhu infekce (Obr.4.4, Obr.4.5, Obr.4.6). Přežívání STS dárcovského kmene (12,5% genomu) se jeví jako nejdelší, současně v kombinaci s nejnižší mortalitou, zatímco přežívání u kmene příjemce (87,5% genomu) Balb/c je doba přežívání nízká. Díky této vlastnosti můžeme předpokládat rozdělení genů v jednotlivých liniích podle významnosti daného genu na průběh infekce VKE. Zatímco gen *Flv* zřejmě zodpovídá za vnímavost, nebo rezistenci organismu, celkový průběh infekce je řízen komplexem dějů a reakcí, které se navzájem ovlivňují. Proto hledáme další geny, které by mohly v případě klíšťové encefalidity zodpovídat za celkový průběh infekce, včetně hostitelské antivirové, cytokinové, humorální a buňečné odpovědi.

Při objevení genu *Flv* se rezistentní alela nevyskytovala u běžných laboratorních kmenů myší (Darnell *et al.*, 1974a), ale vzhledem ke schopnosti tvořit inbrední linie hrály zásadní roli při nalezení rezistentního genu. Jedním z vnímavých kmenů, zahrnutých ve studiích, zabývajících se flavivirovou rezistencí, byl i kmen Balb/c. Tento kmen se projevil 100% mortalitou na infekci viru atenuovaného kmene žluté zimnice 17D-YFV (Tabulka 1.2). S ohledem na vlastnosti, jako je schopnost tvořit inbrední linie a zvýšená vnímavost k flavivirovým infekcím, je laboratorní kmen Balb/c uplatněn i v naší studii. Jako protipól zde figuruje kmen STS, který představuje rezistentní kmen myši a tedy i potenciální zdroj rezistentních genů. Proto lze přežívání STS kmene myši považovat za nejzajímavější a nejvýznamější zjištění vzhledem k vysoké odlišnosti od ostatních skupin (Obr. 4.7). Stejný kontrast ve vnímavosti a rezistenci u parentálních kmenů CcS/Dem řady byl pozorován při infekci leishmáníemi (Lipoldová *et al.*, 2000). Na druhou stranu je stále přítomna otázka, zda danou rezistenci STS kmene vůči VKE nezapříčinil důsledek kumulativních imunitních odpovědí (Kurane, 2002; Solomon *et*

Vaughn, 2002), jako reakce na předcházejí infekci jiným patogenem, v našem případě myším norovirem.

Za jedince nakažené myším norovirem jsou v naší studii považovány všechny myši v pokusech s RCS kmeny, kde probíhalo měření titru viru (Obr.4.4; Obr.4.5; Obr.4.6), mimo parentální kmeny, jejichž výsledky testu na myší norovirus byly negativní. Současně se za nakažené myši mohou považovat některé skupiny zahrnuté v pokuse pro stanovení střední doby přežití (Obr.4.7), odlišující se od výsledků získaných v předpokuse (Obr.4.8), jako je například kmen CcS3.

Kmen CcS3 se odlišoval od ostatních kmenů vysokou střední dobou přežití (Obr.4.8). Titr viru u tohoto kmene se nejvíce podobal průběhu množení viru u Balb/c myši. Ale podobal se mu i v případě pokusu se střední dobou přežití v grafu Obr.4.7, který je zcela kontrastní ke zjištění, že kmen CcS3 dosahoval nejvyšších hodnot pro střední dobu přežití v předpokuse Obr.4.8. Za původce tohoto rozdílu může být považována infekce myším norovirem, která mohla způsobit oslabení myši tohoto kmene.

Klíšťová encefalitida v populaci hostitelů, včetně lidí, má široké spektrum klinických projevů a průběhu - od zcela mírných inaparentních nákaz až po těžké neuroinfekce vedoucí k trvalému postižení nebo dokonce smrti jedince. Tudíž zde existuje určitá pluralita, kterou jsme se pomocí souboru geneticky odlišných kmenů myši snažili napodobit. A i v tomto případě jsme pozorovali určité odlišnosti v průběhu infekce (aniž by byly sledovány klinické ukazatele - teplota, pokles hmotnosti těla – na tyto faktory bude naše studie zaměřena v budoucnu) - čistě na základě míry množení viru v různých orgánech a na základě určení střední doby přežití a mortality. S mírnou nadsázkou by z tohoto pohledu mohla infekce myším norovirem být potenciálně přínosná. Snažíme-li se popsat skutečný vliv patogena za přírodních podmínek, pak musíme brát v úvahu i působení více než jednoho patogena.

Důležité je poukázat na skutečnost, že projev jednoho genu ovlivňující rezistenci například jako *Flv'* není charakterizován pouze samotným genem, ale další řadou faktorů. Tyto faktory mohou být jak hostitelské (genetická výbava, imunologická výbava, věk, pohlaví, adt.) tak i faktory vnější jako je virulence patogena nebo dokonce interference dvou a více patogenů (Azard *et al.*, 2003; Parvi *et al.*, 1975; Hayashi *et Arita*, 1977) jako tomu bylo v našem případě. Role věku a pohlaví mohla také mít svůj význam (Andersen *et Hanson*, 1974). Ačkoliv z prvních pokusů nebyl patrný rozdíl

v úmrtnosti mezi samci a samicemi, nejsme schopni vzhledem k nedostatečným počtům myší říci, že by vliv pohlaví byl v našich pokusech zcela zanedbatelný.

## 6. Závěr

- ❖ Infikovali jsme soubor imunologicky odlišných kmenů myší virem KE, stanovili jsme titr viru v krvi ve slezině a v mozku v různých časových intervalech po infekci. Výsledky získané z těchto pokusů nasvědčují zjištění, že  $CD8^+$  T lymfocyty sice přispívají k odstraňování VKE z organismu, nicméně současně vykazují imunopatologické účinky.
- ❖ Soubor rekombinantních kongenních myší byl infikován virem klíšťové encefalidity; byla sledována mortalita myší a střední doba přežití a stanoven titr viru v krvi, slezině a mozku v různých časových intervalech po infekci. Zjistili jsme že CcS/Dem řada je vhodná ke studiu rezistence proti KE. I geneticky shodní jedinci se mohou za přirozených podmínek lišit v odpovědi na infekci KE.



## 7. Literatura

- Andersen, A. A., and Hanson, R. P. (1974).** Influence of sex and age on natural resistance to St. Louis encephalitis virus infection in mice. *Infection and Immunity* 9:1123-1125.
- Anderson, J. F., and Rahl, J. J. (2002).** Efficiency of interferon alpha-2b and ribavirin against West Nile virus in vitro. *Emerging Infectious Diseases* 8:107-108.
- Atrasheuskaya, A. V., Fredeking, T. M., and Ignatyev, G. M. (2003).** Changes in immune parameters and their correction in human cases of tick-borne encephalitis. *Clinical and Experimental Immunology* 131:148-154.
- Azard, R., Gupta, R. K., Kumar, S., Pandey, C. M., Prasad, K. N., Husain, N., and Husain, M. (2003).** Is neurocysticercosis a risk factor in coexistent in transcranial disease, An MRI-based study. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 74:359-361.
- Bang, F.B. (1978).** Genetics of resistance of animals to viruses. I. Introduction and studies in mice. *Advances in Virus Research* 23:269-348.
- Blaškovič, D. (1954).** The epidemic of Encephalitis in the Rožnava Natural Focus of Infection. Publ. House of Slovak Academy of Science. Bratislava, p. 265.
- Ben-Nathan, D., Huitiga, I., Lustig, S., van Rooijen, N., and Kobiler, D. (1996).** West Nile virus neuroinvasion and encephalitis induced by macrophage depletion in mice. *Archives of Virology* 141:459-469.
- Bonhomme, F., and Guenet, J. L. (1989).** The wildhouse mouse and its relatives. In: Lyon, M. F., and Searle, A. G. eds. *Genetic variants and strains of the laboratory mouse*. Oxford University Press, Oxford. p. 649-662.
- Bonhomme, F., Guenet, J. L., Dod, B., Moriwaki, K., and Bulfield, G. (1987).** The polyphyletic origin of laboratory inbred mice and their rate of evolution. *Biological journal of the Linnean Society*. Linnean Society of London 30:51-58.
- Bowes, C., Dancinger, M., Kozak, C. A., and Farber, D. B. (1989).** Isolation of a candidate cDNA for the gene causing retinal degeneration in the rd mouse. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 86:9722-9726.
- Bradish, C. J., Fitzgeorge, R., and Titmuss, D. (1980).** The responses of normal and athymic mice to infections by togaviruses: strain differentiation in active and adoptive immunization. *Journal of General Virology* 46:255-265.

- Brinton, M. A., and Nathanson, N. (1981).** Genetics determinants of virus susceptibility: Epidemiology implications of murine models. *Epidemiologic Reviews* 3:115-139.
- Brinton, M. A., Arnheiter, H., and Haller, O. (1982).** Interferon independence of genetically controlled resistance to flaviviruses. *Infection and Immunity* 36:284-288.
- Brinton, M. A., Blank, K. J., and Nathanson, N. (1984).** Host genes that influence susceptibility to viral diseases. In: Notkins, A. L., and Oldstone, N. B. A., eds. *Concepts in Viral Pathogenesis*. Springer-Verlag, New York. p. 71-78.
- Brinton, M. A. (1997).** Host susceptibility to viral disease. In: Nathanson, N., ed. *Viral pathogenesis*. Lippincott-Raven, Philadelphia. p. 303-328.
- Brinton, M. A., and Pereygin, A. A. (2003).** Flavivirus genetic resistance. *Advances in Virus Research* 60:43-85.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. (1999).** Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15:269-219.
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G., Brandt, W. E. (1989).** Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralisation test with polyclonal antisera. *Journal of General Virology* 70 (Pt 1), 37-43.
- Cane, P. A., and Gould, E. A. (1988).** Reduction of yellow fever virus mouse neurovirulence by immunization with a bacterially synthesized nonstructural protein (NS1) fragment. *Journal of General Virology* 69:1241-1246.
- Casanova, J.-L., Schurr, E., Abel, L. and Skamene, E. (2002).** Forward genetics of infectious diseases: immunological impact. *Modern Trends in Immunology* 23:469-472.
- Casals, J., and Schneider, H. A. (1943).** Natural resistance and susceptibility to Russian spring-summer encephalitis in mice. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) 54:201-202.
- Chambers, T. J., and Diamond, M. S. (2003).** Pathogenesis of flavivirus encephalitis. *Advances in Virus Research* 60:278-342.

- Charrel, R. N., Zaki, A. M., Attoui, H., Fakeeh, M., Billoir, F., Yousef, A. I., de Chesse, R., De Micco, P., Gould, E. A., de Lamballerie, X. (2001).** Complete coding sequence of the Alkhurma virus, a tick-borne flavivirus causing severe hemorrhagic fever in humans in Saudi Arabia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 287: 445-461.
- Crill, W. D., and Roehrig, J. T. (2001).** Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *Journal of Virology* 75:7769-7773.
- Darnell, M. B., Koprowski, H., and Lagerspetz, K. (1974a).** Genetically determined resistance to infection with group B arboviruses. I. Distribution of the resistance gene among various mouse populations and characteristics of gene expression in vivo. *Journal of Infectious Diseases* 129:240-247.
- Darnell, M. B., and Koprowski, H. (1974b).** Genetically determined resistance to infection with group B arboviruses. II. Increased production of interfering particles in cell cultures from resistant mice. *Journal of Infectious Diseases* 129:248-256.
- de Madrid, A. T., and Porterfield, J. S. (1969).** A simple micro-culture method for the study of group B arboviruses. *Bulletin of the World Health Organization* 40:113 - 121.
- Demicheli, V., Graves, P., Pratt, M., Jefferson, T. (2000).** Vaccines for preventing tick-borne encephalitis. *Cochrane database of systematic reviews* 2:CD0009777.
- Démant, P., and Hart, A. A. M. (1986).** Recombinant Congenic Strains – A New Tool for Analyzing Genetic Traits Determined by More Than One Gene. *Immunogenetics* 24:416 – 422.
- Diamond, M. S., Roberts, T., Edgil, D., Lu, B., Ernst, J., and Harris, E. (2000).** Modulation of dengue virus infection in human cells by alpha, beta and gamma interferons. *Journal of Virology* 74:4957-4966.
- Diamond, M. S., and Harris, E. (2001).** Interferon inhibits dengue virus infection by preventing translation of viral RNA through PKR-independent mechanism. *Virology* 289:297-311.
- Diamond, M. S., Shrestha, B., Marri, A., Mahan, D., and Engle, M. (2003).** B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *Journal of Virology* 77:2578-2586.
- Dorries, R. (2001).** The role of T-cell-mediated mechanisms in virus infections of the nervous system. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 253:219-245.

- Flaherty, L. (1981).** Congenic strains. In: Foster, H. L., Small, J. D., and Fox, J. G. eds. The mouse in biomedical research. History, genetics and wild mice. Academic Press, New York. 1:215-222.
- Gelphi, E., Preusser, U., Garzuly, F., Holzmann, H., Heinz, F. X., and Budka, H. (2005).** Visualization of Central European Tick-Borne Encephalitis Infection in Fatal Human Cases. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64:506-512.
- Gelphi, E., Preusser, M., Laggner, U., Garzuly, F., Holzmann, H., Heinz, F. X., and Budka, H. (2006).** Inflammatory response in human tick-borne encephalitis: analysis of postmortem tissue. *Journal of NeuroVirology* 12:322-327.
- Ghosh, A., Desai, S. Y., Sarkar, S. N., Ramaraj, P., Ghosh, S. K., Bandyopadhyay, S., and Sen, G. C. (1997a).** Effects of mutating specific residues present near the amino terminus of 2'-5' oligoadenylate synthetase. *Journal of Biological Chemistry* 272:15452-15458.
- Ghosh, A., Sarkar, S. N., Ramaraj, P., Guo, W., Bandyopadhyay, S., and Sen, G. C. (1997b).** Enzymatic activity of 2'-5' oligoadenylate synthetase is impaired by specific mutations that affect oligomerization of the protein. *Journal of Biological Chemistry* 272:33220-33226.
- Gollins, S. W., and Porterfield, J. S. (1984).** Flavivirus infection enhancement in macrophages: Radioactive and biological studies on the effect of antibody on viral fate. *Journal of General Virology* 65:1261-1272.
- Goodman, G. T., and Koprowski, H. (1962a).** Macrophages as a cellular expression of inherited natural resistance. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 48:160-165.
- Goodman, G. T., and Koprowski, H. (1962b).** Study of mechanism of innate resistance to virus infection. *Journal of Comparative Physiology A* 59:333-373
- Gould, E. A., Buckley, A., Groeger, B. K., Cane, P. A., and Doenhoff, M. (1987).** Immune enhancement of yellow fever virus neurovirulence for mice: Studies of mechanisms involved. *Journal of General Virology* 68:3105-3112.
- Grard, G., Moureau, G., Charrel, R. N., Lemasson, J. J., Gonzalez, J. P., Gallian, P., Gritsun, T. S., Holmes, E. C., Gould, E. A., and de Lamballerie, X. (2006).** Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology* 36: 80-92.

- Green, M. C. (1989).** Catalogue of mutant genes and polymorphic loci. In: Lyon, M. F., and Searle, A. G. eds. Genetic variants and strains of the laboratory mouse. Oxford University Press, Oxford. p. 12-403.
- Grešíková, M. (1958).** Excretion of the tick-borne encephalitis virus in the milk of subcutaneously infected cows. *Acta Virologica* 2:188.
- Grešíková, M., Nosek, J. (1981).** Arbovírusy v Československu, Veda, Bratislava, p. 34.
- Grešíková, M., Weidrová, K., Nosek, J., Rajčáni, J. (1972).** Experimental pathogenicity of tick-borne encephalitis virus for dogs. *Acta Virologica* 16:336.
- Gritsun, T. S., Venugopal, K., Zanotto, P. M., Mikhailov, M. V., Sall, A. A., Holmes, E. C., Polkinghorne, I., Frolova, T. V., Pogodina, V., Lashkevich, A., Gould, E. A. (1997).** Complete sequence of two tick-borne flaviviruses isolated from Siberia and the UK: analysis and significance of the 5' and 3'-UTRs. *Virus Research* 49:27-39.
- Groves, M. G., Rosenstreich, D. L., Taylor, B. A., and Osterman, J. V. (1980).** Host defences in experimental scrub typhus: mapping the gene that controls natural resistance in mice. *Journal of Immunology* 125:1395-1399.
- Groot, P. C., Moen, C. J. A., Dietrich, W., Stoye, J. P., Lander, E. S., and Démant, P. (1992).** The recombinant congenic strains for analysis of multigenic traits: genetics composition. In: Lyon, M. F., Searle, A. G., eds. Genetics Variants and Strains of the Laboratory Mouse. 3rd ed., Oxford University Press, Oxford. 2826-2835
- Haglund, M., Forsgren, M., Lindh, G., Lindquist, L. (1996).** A 10-year follow-up study of tick-borne encephalitis in the Stockholm area and a review of the literature: need for a vaccination strategy. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 28:217-224.
- Haglund, M., Günther, G. (2003).** Tick-borne encephalitis-pathogenesis, clinical course and long-term follow-up. *Vaccine* 21:S1/11-S1/18.
- Hanson, B., Koprowski, H., Baron, S., Buckler, C. E. (1969).** Interferon-mediated natural resistance of mice to arboB virus infection. *Microbios* 1B: 51-68.
- Hase, T., Dubois, D. R., Summers, P. L., Downs, M. B., and Ussery, M. A. (1993).** Comparison of replication rates and pathogenicities between the SA14 parent and SA14-14-2 vaccine strains of Japanese encephalitis virus in mouse brain neurons. *Archives of Virology* 13:131-143.

- Hayashi, K., and Rita, T. (1977).** Experimental double infection of Japanese encephalitis virus and herpes simplex virus in mouse brain. *The Japanese Journal of Experimental Medicine* 47:9-13.
- Heinz, F. X. (1986).** Epitope mapping of flavivirus glycoproteins. *Advances in Virus Research* 31:103-168.
- Heinz, F. X., Collet, M. S., Purcell, R. H., Gould, E. A., Howard, C. R., Houghton, M., Moormann, R. J. M., Rice, C. M., Thiel, H. J. (2000).** Family Flaviviridae. In: van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E., Estes, M. K., Lemon, S., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeogch, D., Pringle, C. R., Wickner, R. B. eds. *Virus Taxonomy*. In: *Proceedings of the 7th International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, Ca. p. 859-878.
- Inoue, Y. K., Ogura R. (1962).** Studies on Japanese B encephalitis virus. 3. Propagation and assay of Japanese B encephalitis virus in a stable line of porcine kidney cells. *Virology* 16: 205-207.
- Jackoby, R. O., Bhatt, P. N., and Schwartz, A. (1980).** Protection of mice from lethal flaviviral encephalitis by adoptive transfer of splenic cells from donors infected with live virus. *Journal of Infectious Diseases* 141:617-624.
- Jerrells, T. R., and Osterman, J. V. (1981).** Host defenses in experimental scrub typhus: inflammatory response of congenic C3H mice differing at the Ric gene. *Infection and Immunity* 31:1014-1022.
- Johnson, A. J., and Roehrig, J. T. (1999).** New mouse model for dengue virus vaccine testing. *Journal of Virology* 73:83-86.
- Kaiser, R. (1999).** The clinical and epidemiological profile of tick-borne encephalitis in southern Germany 1994-98: a prospective study of 656 patients. *Brain* 122:2067-2078.
- Kakuta, S., Shibata, S., and Iwakura, Y. (2002).** Genomic structure of the mouse 2'-5' oligoadenylat synthetase gene family. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 22:981-993.
- King, N. J. C., Getts, D. R., Getts, M. T., Rana, S., Shrestha, B., Kesson, A. M. (2007).** Immunopathology in flavivirus infections. *Immunology and Cell Biology* 85:33-42.
- King, N. J. C., and Kesson, A. M. (1988).** Interferon-independent increases in class I major histocompatibility complex antigen expression follow flavivirus infection. *Journal of General Virology* 69:2535-2543.

- Korenberg, E. I., Kovalevski, Y. V. (1999).** Main features of tick-borne encephalitis eco-epidemiology in Russia. *Zentralblatt für Bakteriologie: International Journal of Medical Microbiology* 289:525-539.
- Kožuch, O., Labuda, M., Lysý J., Weismann, P., Krippel, E. (1990).** Longitudinal study of natural foci of central European encephalitis virus in west Slovakia. *Acta Virologica* 34:537-544.
- Konishi, E., Yamaoka, M., Win, K.-S., Kurane, I., Takada, K., and Mason, P. W. (1999).** The anamnestic neutralizing antibody response is critical for protection of mice from challenge following vaccination with a plasmid encoding the Japanese encephalitis virus pre-membrane and envelope genes. *Journal of Virology* 73:5527-5534.
- Kräusler, J. (1981).** 23 years of TBE in the district of Neunkirchen (Austria). In: Kunz, C., ed. *Tick-borne encephalitis*. Vienna, Austria: Facultas. 6-12.
- Kulkarni, J. B., Müllbacher, A., and Blanden, R. V. (1991).** Functional analysis of macrophages, B cells and splenic dendritic cells as antigen-presenting cells in West Nile virus-specific murine T-lymphocyte proliferation. *Immunology and Cell Biology* 69:71-80
- Kurane, I. (2002).** Immune responses to Japanese encephalitis virus. In: Mackenzie, J. S., Barrett, A. D. T., and Deubel, V., eds. *Japanese Encephalitis and West Nile Viruses*. Springer-Verlag, Berlin. p. 91-104.
- Labrada, L., Liang, X. H., Zheng, W., Johnston, C., and Levine, B. (2002).** Age-dependent resistance to lethal alphavirus encephalitis in mice: Analysis of gene expression in the central nervous system and identification of a novel interferon-inducible protective gene, mouse ISG12. *Journal of Virology* 76:688-703.
- Labuda, M., Austyn, J., Žuffová, E., Kožuch, O., Fuchsberger, N., Lysý, J., Nuttall, P.A. (1996).** Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* 19:357-366.
- Labuda, M., Eleckova, E., Lickova, M., Sabo, A. (2002).** Tick-borne encephalitis virus foci in Slovakia. *International Journal of Medical Microbiology* 291(suppl 33):43-47.
- Levkovitch, E. N., Pogodina, V. V., Zasuchina, G. D., Karpovich, L. G. (1967).** In: *Viruses of the Tick-Borne Encephalitis Virus Complex*. Medicine, Moscow. p.240-245.

- Libraty, D. H., Pichyangkul, S., Ajariyakhajorn, C., Endy, T. P., Ennis, F. A. (2001).** Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: Enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. *Journal of Virology* 75:3501-3508.
- Lincon Luna, R. M., Lee, E., Mullbacher, A., Bladen, R. V., Langman, R., and Lobings, M. (2002).** Lack of both Fas ligand and perforin protects from flavivirus-mediated encephalitis in mice. *Journal of Virology* 76:3202-3211.
- Lindenbach, B. D., and Rice, Ch. M. (2003).** Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research* 59:23-61.
- Lindquist, L., Vapalathi, O. (2008).** Tick-borne encephalitis. *Lancet* 371:1861-1871.
- Lipoldová, M., Svobodová, M., Krulová, M., Havelková, H., Badalová, J., Nohýnková, E., Holáň, V., Hart, A. A. M., Volf, P., Démant, P. (2000).** Susceptibility to *Leishmania major* infection in mice: multiple loci and heterogeneity of immunopathological phenotypes. *Genes and Immunity* 1:200-206.
- Liu, Y., King, N., Kesson, A., Bladen, R. V., and Müllbacher, A. (1989).** Flavivirus infection up-regulates the expression of class I and Class II major histocompatibility antigens on and enhances T cell recognition of astrocyte in vitro. *Journal of Neuroimmunology* 21:157-168.
- Liu, M. L., and Hsu, C. Z. (1998).** Japanese encephalitis virus is transported across the cerebral blood vessels by endocytosis in mouse brain. *Cell and Tissue Research* 293:389-394.
- Liu, T., and Chambers, T. J. (2001).** Yellow fever virus encephalitis: Properties of the brain-associated T-cell response during virus clearance in normal and gamma interferon-deficient mice and requirement for CD4<sup>+</sup> lymphocytes. *Journal of Virology* 75:2107-2118.
- Lynch, C. J., Hughes, T. P. (1936).** The inheritance of susceptibility to yellow fever encephalitis in mice. *Genetics* 21:104-112.
- Lyon, M. F., and Kirby, M. C. (1993).** Mouse chromosome atlas. *Mouse Genom* 91:40-80.
- Mandl, C. W. (2005).** Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Research* 111:161-174.



- Mashimoto, T., Lucas, M., Simon-Chazottes, D., Frenkiel, M. P., Montagutelli, X., Ceccaldi, P. E., Deubel, V., Guenet, J. L., and Despres, P. (2002).** AAA nonsense mutation in the gene encoding 2'-5'-oligoadenylate synthetase/L1 isoform is associated with West Nile virus susceptibility in laboratory mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 99:11311-11316.
- Markoff, L. (2000).** Points to consider in the development of surrogate for efficacy of novel Japanese encephalitis virus vaccines. *Vaccine* 18(Suppl. 2):26-32.
- Mickiene, A., Laiskonis, A., Günter, G., Vene, S., Lundkvist, A., Lindquist, L. (2002).** Tick-borne encephalitis in an area of high endemicity in Lithuania: disease severity and long-term prognosis. *Clinical Infectious Disease* 35:650-658.
- Monath, T. P. (1971).** Neutralizing antibody responses in the major immunoglobulin classes to yellow fever 17D vaccination of humans. *American Journal of Epidemiology* 93:122-129.
- Murphy, F. (1980).** Togavirus morphology and morphogenesis. In: Schlesinger, R. W. ed. *The Togaviruses. Biology, Structure, Replication.* Academic Press, New York. p. 241-316.
- Nuttall, P. A., Jones, L. D., Labuda, M., Kaufman, W. R. (1994).** Adaptations of arboviruses to ticks. *Journal of Medical Entomology* 31:1-9.
- Ochsenbein, A. F., Pinschewer, D. D., Odermatt, B., Carroll, M. C., Hengartner, H., and Zinkernagel, R. M. (1999).** Protective T cell-independent antiviral antibody responses are dependent on complement. *The Journal of Experimental Medicine* 90:1165-1174.
- Ochsenbein, A. F., and Zinkernagel, R. M. (2000).** Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunology Today* 21(12):624-630.
- Orange, J. S., Fasset, M. S., Koopman, L. A., Boyson, J. E., and Strominger, J. L. (2002).** Viral evasion of natural killer cells. *Nature Immunology* 3:1006-1012.
- Pan, C. W., Chen, H. W., Huang, H. W., and Tao, M. H. (2001).** Protective mechanism induced by a Japanese encephalitis virus DNA vaccine: Requirement for antibody but not CD8<sup>+</sup> cytotoxic T-cell responses. *Journal of Virology* 75:11457-11463.
- Pavri, K. M., Ghalsaai, G. R., Dastur, D. K., Goverdhan, M. K., and Lalitha, V. S. (1975).** Dual infections of mice: visceral larva migrans and sublethal infection with Japanese encephalitis virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 69:99-110.

- Perelygin, A. A., Scherbik, S. S., Zhulin, I. B., Stockman, B. M., Li, Y., and Brinton, M. A. (2002).** Positional cloning of the murine flavivirus resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 99:9322-9327.
- Putnak, J. R., and Schlesinger, J. J. (1990).** Protection of mice against yellow fever virus encephalitis by immunization with a vaccinia virus recombinant encoding the yellow fever virus non-structural proteins, NS1, NS2a and NS2b. *Journal of General Virology* 71:1697-1702.
- Rey, F. X., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C., Harrison, S. C. (1995).** The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375:291-298.
- Rice, C. M., Lenches, E. M., Eddy, S. R., Shin, S. J., Sheets, R. L., and Strauss, J. H. (1985).** Nucleotide sequence of yellow fever virus: Implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* 229:726-733.
- Roehrig, J. T., Hunt, A. R., Johnson, A. J., and Hawkes, R. A. (1989).** Synthetic peptides derived from the deduced amino acid sequence of the E-glycoprotein of Murray Valley encephalitis virus elicit antiviral antibody. *Virology* 171:49-60.
- Rothman, A. L., and Enis, F. A. (1999).** Immunopathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Virology* 257:1-6.
- Růžek, D., Salát, J., Palus, M., Gritsun, T. S., Gould, E. A., Dyková, I., Skallová, A., Jelínek, J., Kopecký, J., Grubhoffer, L. (2009).** CD8<sup>+</sup> T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology* 384:1-6.
- Sabin, A. B. (1952a).** Genetic, hormonal and age factors in natural resistance to certain viruses. *Annals of the New York Academy of Science* 54:936-944
- Sabin, A. B. (1952b).** Nature of inherited resistance to viruses affecting the nervous system. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 38:540-546
- Sabin, A. B. (1954).** Genetic factors affecting susceptibility and resistance to virus diseases of the nervous system. *Research Publications: Association for Research in Nervous and Mental Disease* 33:57-67
- Samuel, C. E. (2002).** Host genetic variability and West Nile virus susceptibility. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 99:11555-11557.

- Sangster, M. Y., and Shellam, G. R. (1986).** Genetically controlled resistance to flaviviruses within the house mouse complex of species. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 127:313-318.
- Sangster, M. Y., Heliam, D. B., Mackenzie, J. S., Shellam, G. R. (1993).** Genetic studies of Flavivirus resistance in inbred starins derived from wild mice: evidence for new resistance allele at the Flavivirus resistance locus (Flv). *Journal of Virology* 67:340-347.
- Sangster, M. Y., Urosevic, N., Mansfield, J. P., Mackenzie, J. S., and Shellam, G. R. (1994).** Mapping the Flv locus controlling resistance to flaviviruses on mouse chromosome 5. *Journal of Virology* 68:448-452.
- Sangster, M. Y., Mackenzie, J. S., and Shellam, G. R. (1998).** Genetically determined resistance to flavivirus infection in wild *Mus musculus domesticus* and other taxonomic groups in the genus *Mus*. *Archives of Virology* 143:697-715.
- Saraste, M., Sibbald, P. R., and Wittinghofer, A. (1990).** The P-loop: a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 15:430-434.
- Sawyer, W. A., and Lloyd, W. (1931).** The use of mice in tests of immunity against yellow fever. *Journal of Experimental Medicine* 54:533-555
- Schlesinger, J. J., Brandriss, M. W., Putnak, J. R., and Walsh, E. E. (1990).** Cell surface expression of yellow fever virus non-structural glycoprotein NS1: Consequences of interaction with antibody. *Journal of General Virology* 71:593-599.
- Sheets, P., Schwartz, A., Jackoby, R. O., and Bhatt, P. N. (1979).** T cell-mediated cytotoxicity for L292 fibroblasts infected with Banzi virus (Flavivirus). *Journal of Infectious Diseases* 140:384-391
- Shellam, G. R., Sangster, M. Y., and Urosevic, N. (1998).** Genetic control of host resistance to flavivirus infection in animals. *Revue, scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 17:231-248.
- Shresta, S., Kyle, J. L., Snider, H. M., Basavapatna, M., Beatty, P.R., and Harris, E. (2004).** Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. *Journal of Virology* 78:2701-2710.
- Shrestha, S., and Diamond, M. S. (2004).** Role CD8<sup>+</sup> T cells in control West Nile infection. *Journal of Virology* 78:8312-8321.

- Silvia, O. J., Shellam, G. R., and Urosevic, N. (2001).** Innate resistance to flavivirus infection in mice controlled by Flv is nitric oxide-independent. *Journal of General Virology* 82:603-607.
- Sitati, E. M., and Diamond, M. S. (2006).** CD4<sup>+</sup> T-cell Responses Are Required for Clearance of West Nile Virus from the Central Nervous System. *Journal of Virology* 80:12060-12069.
- Skamene, E., Kongshavn, P. A. L., and Landy, M. (eds.) (1980).** Genetics Control of Natural Resistance to Infection and Malignancy. Academic Press, New York.
- Skamene, E. (ed.) (1985).** Genetic Control of Host Resistance to Infection and Malignancy. A. R. Liss, New York.
- Solomon, T., and Vaughn, D. W. (2002).** Pathogenesis and clinical features of Japanese encephalitis and West Nile infections. In: Mackenzie, J. S., Barrett, A. D. T., and Deubel, V., eds. Japanese Encephalitis and West Nile viruses. Springer Verlag, Berlin. p. 171-194.
- Spain-Santana, T. A., Margilin, S., Ennis, F. A., and Rothman, A. L. (2001).** MIP-1 alpha and MIP-1 beta induction by dengue virus. *Journal of Medical Virology* 65:324-330.
- Sumilo, D., Asokliene, L., Bormane, A., Vasilenko, V., Golovljova, I., Randolph, S. E. (2007).** Climate change cannot explain the upsurge of tick-borne encephalitis in the Baltics. *PLoS ONE* 2:e500.
- Süss, J. (2003).** Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine* 21:S19-35.
- Süss, J., Schrader, C., Falk, U., and Wohanka, N. (2004).** Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany: epidemiological data, development of risk areas and virus prevalence in field-collected ticks and in ticks removed from humans. *International Journal of Medical Microbiology* 293:S69-79.
- Tomažič, J., Pikelj, F., Schwartz B., Kunze, M., Kraigher, A., Matjasic, M., Lesnicar, G., Gorisek, J., Kunz, C., and the Slovenian TBE Study Group (1996).** The clinical features of tick-borne encephalitis in Slovenia. A study of 492 cases in 1994. *Antibiotic Monitor* 12(4May):115-120.
- Urosevic, N., Sangster, M. Y., Mansfield, J. P., Mackenzie, J. S., and Shellam, G. R. (1993).** Flavivirus resistance (Flv<sup>r</sup>) gene in mice: mapping studies. *Arbovirus Research in Australia* 6:130-134.

- Urosevic, N., Mansfield, J. P., Mackenzie, J. S., and Shellam, G. R. (1995)** Low resolution mapping around the flavivirus resistance locus (Flv) on mouse chromosome 5. *Mammalian Genome* 6:454-458.
- Urosevic, N., Mann, K., Hodgetts, S. I., and Shellam, G. R. (1997a)**. The use of microsatellites in high-resolution genetic mapping around the mouse flavivirus resistance locus (Flv). *Arbovirus Research in Australia* 7:296-299.
- Urosevic, N., van Maanen, M., Mansfield, J. P., Mackenzie, J. S., and Shellam, G. R. (1997b)**. Molecular characterization of virus-specific RNA produced in the brains of flavivirus-susceptible and -resistant mice after challenge with Murray Valley encephalitis virus. *Journal of General Virology* 78:23-29.
- Urosevic, N. (2003)**. Is flavivirus resistance interferon type I-independent? *Immunology and Cell Biology* 81:224-229.
- Vanio, T. (1963a)**. Virus and hereditary resistance in vitro. I. Behavior of West Nile (E-101) virus in the cultures prepared from genetically resistant and susceptible strains of mice. *Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiæ Fennicæ* 41:(Suppl. 1) 1-24.
- Vanio, T. (1963b)**. Virus and hereditary resistance in vitro. II. Behavior of West Nile (E-101) virus in the cultures prepared from challenged resistant, challenged back-cross and nonchallenged susceptible mice. *Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiæ Fennicæ* 41:(Suppl. 1) 25-35.
- van der Most, R. G., Harrington, L. E., Giuggio, V., Mahar, P. L. and Ahmed, R. (2002)**. Yellow fever virus 17D envelope and NS3 proteins are major targets of the antiviral T cell response in mice. *Virology* 296:117-124.
- Vargin, V. V., and Semenov, B. F. (1986)**. Changes of natural killer cell activity in different mouse lines by acute and asymptomatic flavivirus infection. *Acta Virologica* 30:303-308.
- Volanakis, J. E. (2002)**. The role of complement in innate and adaptive immunity. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 266:41-56.
- Wang, Y., Lobigs, M., Lee, E., Müllbacher, A. (2003)**. CD8<sup>+</sup> T cells mediate recovery and immunopathology in West Nile virus encephalitis. *Journal of Virology* 77:13323-13334.
- Webster, L. T. (1923)**. Microbic virulence and host susceptibility in mouse typhoid infection. *Journal of Experimental Medicine* 37:231-244.

- Webster, L. T., and Johnson, M. S. (1941).** Comparative virulence of St. Louis encephalitis virus cultured with brain tissue from innately resistant mice. *Journal of Experimental Medicine* 74:337-344.
- Wreschner, D. H., McCauley, J. W., Skehel, J. J., and Kerr, I. M. (1981).** Interferon action: Sequence specificity of the ppp(A<sub>2</sub>'p)nA-dependent ribonuclease. *Nature* 289:414-417.
- Yamamoto, Y., Sono, D., and Sokawa, Y. (2000).** Effects of specific mutations in active site motifs of 2',5'-oligoadenylate synthetase on enzymatic activity. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 20:337-344.
- Zisman, B., Wheelock, E. F., and Allison, A. C. (1971).** Role of macrophages and antibody in resistance of mice against yellow fever virus. *Journal of Immunology* 107:236-243.

## 8. Přílohy

Separát publikace:

Růžek, D., Salát, J., Palus, M., Gritsun, T.S., Gould, E.A., Dyková, I., Skallová, A., Jelínek, J., Kopecký, J., Grubhoffer, L. 2009. CD8<sup>+</sup> T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology* 384, 1-6.

příloha je tvořena materiálem, který je předmětem copyrightu a je archivován v tištěné podobě ve Společné knihovně Akademie věd a Přírodovědecké fakulty JU.